

Université de Montréal

Implication des canaux  $K^+$  dans les processus de réparation de  
l'épithélium respiratoire sain et fibrose kystique

Par  
Nguyen Thu Ngan Trinh

Département de Médecine, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales

Juillet 2009

© Nguyen Thu Ngan Trinh, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Implication des canaux  $K^+$  dans les processus de réparation de  
l'épithélium respiratoire sain et fibrose kystique

Présenté par :  
Nguyen Thu Ngan Trinh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Céline Bergeron

Président-rapporteur

Dre Emmanuelle Brochiero

Directrice de recherche

Dr Simon Rousseau

Membre du jury

## **Résumé**

La pathologie de la fibrose kystique (FK) est causée par des mutations du gène codant pour le canal  $\text{Cl}^-$  CFTR. Au niveau respiratoire, cette dysfonction du transport transépithélial de  $\text{Cl}^-$  occasionne une altération de la composition et du volume du liquide de surface des voies aériennes. Une accumulation de mucus déshydraté favorise alors la colonisation bactérienne et une réponse inflammatoire chronique, entraînant des lésions épithéliales sévères au niveau des voies aériennes et des alvéoles pouvant culminer en défaillance respiratoire.

Le principal objectif de mon projet de maîtrise était d'étudier les processus de réparation de l'épithélium alvéolaire sain, l'épithélium bronchique sain et FK à l'aide d'un modèle *in vitro* de plaies mécaniques. Nos résultats démontrent la présence d'une boucle autocrine EGF/EGFR contrôlant les processus de migration cellulaire et de réparation des lésions mécaniques. D'autre part, nos expériences montrent que l'EGF stimule l'activité et l'expression des canaux  $\text{K}^+$   $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{KvLQT1}$  et  $\text{KCa3.1}$  des cellules épithéliales respiratoires. L'activation de ces canaux est cruciale pour les processus de réparation puisque la majeure partie de la réparation stimulée à l'EGF est abolie en présence d'inhibiteurs de ces canaux. Nous avons également observé que les cellules FK présentent un délai de réparation, probablement causé par un défaut de la réponse EGF/EGFR et une activité/expression réduite des canaux  $\text{K}^+$ .

Nos résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes de régulation des processus de réparation de l'épithélium sain et FK. De plus, ils ouvrent de nouvelles options thérapeutiques visant à promouvoir, à l'aide d'activateurs de canaux  $\text{K}^+$  et de facteurs de croissance, la régénération de l'épithélium respiratoire chez les patients atteints de FK.

### **Mots clés :**

canaux  $\text{K}^+$ , EGF, fibrose kystique (FK), lésions épithéliales, processus de réparation, transport ionique et liquidien

## **Abstract**

The cystic fibrosis pathology (CF) is caused by mutations of the gene coding for the Cl<sup>-</sup> channel, CFTR. In the lungs, the dysfunction of transepithelial ion transport leads to an alteration of airway surface liquid volume and composition. Dehydrated mucus accumulation then favors chronic bacterial colonisation and inflammatory response, inducing severe epithelial injuries in the airways and the alveoli and then, respiratory failure.

The main objective of my master degree project was to study normal alveolar, normal and CF bronchial epithelia repair processes using an *in vitro* model of mechanical wound-healing. Our results reveal the presence of an EGF/EGFR autocrine loop that controls cell migration and wound-healing. Our results show also that EGF signaling stimulate K<sub>ATP</sub>, K<sub>v</sub>LQT1 and K<sub>Ca</sub>3.1 K<sup>+</sup> channel activity and expression in epithelial cells. K<sup>+</sup> channel activation is crucial for repair processes since K<sup>+</sup> channel inhibitors prevent most of EGF-stimulated wound-healing. We also observed that CF cells present delayed repair processes, probably caused by an EGF signaling defect and reduced K<sup>+</sup> channel activity and expression.

Our results allow us to better understand the regulatory mechanisms of normal and CF epithelial repair processes. Furthermore, our results open to new therapeutic options that promote, with K<sup>+</sup> channel activators and growth factors, respiratory epithelium regeneration in CF patients.

### **Keywords:**

K<sup>+</sup> channel, EGF, cystic fibrosis (CF), epithelial injury, repair processes, ion and fluid transport



2.3) Le transport des ions et des fluides.....	p 25
2.3.1) Le canal CFTR.....	p 28
2.3.1.1) Clonage et structure du canal CFTR.....	p 28
2.3.1.1.1) Domaines transmembranaires (MSD).....	p 29
2.3.1.1.2) Domaines de liaison de l'ATP (NBD).....	p 30
2.3.1.1.3) Domaine régulateur (domaine R).....	p 31
2.3.1.2) Mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR.....	p 32
2.3.1.3) Mécanismes de régulation du canal CFTR.....	p 33
2.3.1.4) Localisation du canal CFTR.....	p 35
2.3.1.5) Fonctions du canal CFTR.....	p 36
2.3.2) Le canal ENaC.....	p 37
2.3.2.1) Structure du canal ENaC.....	p 37
2.3.2.2) Régulation du canal ENaC.....	p 38
2.3.2.3) Fonctions du canal ENaC.....	p 38
2.3.3) La pompe Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase.....	p 40
2.3.4) Les aquaporines.....	p 40
2.3.5) Les canaux K <sup>+</sup> .....	p 41
2.3.5.1) Classes de canaux K <sup>+</sup> .....	p 41
2.3.5.1.1) Canaux K <sup>+</sup> Kv et KCa.....	p 42
2.3.5.1.2) Canaux K <sup>+</sup> à 4 STM et 2 pores.....	p 42
2.3.5.1.3) Canaux K <sup>+</sup> Kir.....	p 44
2.3.5.2) Fonctions des canaux K <sup>+</sup> .....	p 44
2.3.5.2.1) Échange gazeux.....	p 44
2.3.5.2.2) Stabilité alvéolaire.....	p 45
2.3.5.2.3) Réparation épithéliale.....	p 45
2.3.5.2.4) Réponse inflammatoire.....	p 46
2.3.5.2.5) Contrôle du transport transépithélial ionique et liquidien.....	p 47
2.3.5.3) Régulation des canaux K <sup>+</sup> .....	p 48
3) Pathologie de la fibrose kystique.....	p 49
3.1) Incidence de la maladie.....	p 49

3.2) Classes de mutations.....	p 49
3.2.1) Classe I – ARN tronqué.....	p 50
3.2.2) Classe II – dégradation de protéines immatures.....	p 51
3.2.3) Classe III – dysfonction du canal.....	p 52
3.2.4) Classe IV – activité réduite du canal.....	p 52
3.2.5) Autre classe de mutations.....	p 53
3.3) Relation génotype-phénotype.....	p 53
3.4) Pathologie respiratoire.....	p 55
3.4.1) Transport ionique dans la fibrose kystique.....	p 55
3.4.2) Cycle infection-inflammation.....	p 57
3.4.2.1) Susceptibilité à l’infection et/ou l’inflammation.....	p 59
3.4.3) Lésions et remodelage dans la fibrose kystique.....	p 61
3.5) Thérapies et traitements pour la fibrose kystique.....	p 62
<b>Chapitre 2 – Hypothèses de travail.....</b>	<b>p 69</b>
<b>Chapitre 3 – Résultats publiés et contribution aux articles.....</b>	<b>p 73</b>
3.1) Involvement of $K_{ATP}$ and $K_vLQT1$ $K^+$ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes.....	p 77
3.2) EGF and $K^+$ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair.....	p 90
3.3) Molecular diversity and function of $K^+$ channels in airway and alveolar epithelial cells.....	p 105
<b>Chapitre 4 – Discussion-Perspectives.....</b>	<b>p 116</b>
1) Modèle de plaie mécanique.....	p 116

1.1) Limitations de notre modèle de plaie mécanique.....	p 118
1.1.1) Processus de réparation.....	p 118
1.1.2) Environnement cellulaire.....	p 118
1.1.2.1) Interaction épithélio-mésenchymateuse dans les processus de réparation.....	p 119
1.1.3) Environnement inflammatoire et facteurs de croissance.....	p 119
1.2) Modèles alternatifs.....	p 120
2) Rôle des facteurs de croissance dans les processus de réparation.....	p 121
2.1) Rôle du EGF dans les processus de réparation.....	p 121
2.1.1) Boucle autocrine de l'EGF.....	p 122
2.2) Rôle des autres ligands du EGFR dans les processus de réparation.....	p 124
2.3) Rôle d'autres facteurs dans les processus de réparation.....	p 124
2.3.1) Rôle d'autres facteurs de croissance dans les processus de réparation.....	p 124
2.3.2) Rôle de l'inflammation dans les processus de réparation.....	p 125
3) Rôle des canaux $K^+$ dans les processus de réparation.....	p 126
3.1) Mécanisme de couplage entre l'EGFR et les canaux $K^+$ .....	p 128
3.2) Rôles multiples des canaux $K^+$ .....	p 131
4) Retard réparation de l'épithélium FK.....	p 133
4.1) Causes du retard de réparation FK.....	p 134
4.1.1) Différence entre les lignées cellulaires : profils génétiques.....	p 134
4.1.2) Absence du canal CFTR.....	p 135
4.1.3) Infections et inflammation chroniques.....	p 135
 <b>Chapitre 5 – Conclusion.....</b>	 p 139
 <b>Bibliographie.....</b>	 p 141



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Anatomie du système respiratoire.....	p 1
<b>Figure 2.</b> Coupe histologique de la cavité nasale.....	p 2
<b>Figure 3.</b> Histologie de la trachée.....	p 3
<b>Figure 4.</b> Ramifications de l'arbre bronchique.....	p 5
<b>Figure 5.</b> Évolution histologique de l'épithélium respiratoire.....	p 6
<b>Figure 6.</b> Schéma de la barrière alvéolo-capillaire.....	p 7
<b>Figure 7.</b> Structure et histologie alvéolaire.....	p 8
<b>Figure 8.</b> Mécanismes de défense et mouvement ciliaire.....	p 11
<b>Figure 9.</b> Schéma de la réponse immune.....	p 13
<b>Figure 10.</b> Schéma d'une lésion épithéliale.....	p 15
<b>Figure 11.</b> Processus de réparation.....	p 17
<b>Figure 12.</b> Modèle du phénomène de migration cellulaire.....	p 18
<b>Figure 13.</b> Structure et activation du récepteur EGFR.....	p 21
<b>Figure 14.</b> Sécrétion de Cl <sup>-</sup> durant le développement.....	p 24
<b>Figure 15.</b> Transport transépithélial alvéolaire.....	p 25
<b>Figure 16.</b> Transport transépithélial des voies aériennes.....	p 26
<b>Figure 17.</b> Structure du canal CFTR.....	p 28
<b>Figure 18.</b> Structure du pore du canal CFTR.....	p 28
<b>Figure 19.</b> Structure du dimère de NBD.....	p 29
<b>Figure 20.</b> Mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal CFTR.....	p 31
<b>Figure 21.</b> Phosphorylation du domaine R par PKA.....	p 33
<b>Figure 22.</b> Structure du canal ENaC.....	p 36
<b>Figure 23.</b> Modèle de résorption d'œdème pulmonaire par ENaC.....	p 38
<b>Figure 24.</b> Diversité moléculaire des canaux K <sup>+</sup> de l'épithélium respiratoire.....	p 40
<b>Figure 25.</b> Tableau descriptif des canaux K <sup>+</sup> de l'épithélium respiratoire.....	p 42
<b>Figure 26.</b> Mutations du CFTR.....	p 49
<b>Figure 27.</b> Conséquences de la délétion F508.....	p 50
<b>Figure 28.</b> Schéma du transport des voies aériennes saines et fibrose kystique.....	p 55

<b>Figure 29.</b> Options thérapeutiques.....	p 61
<b>Figure 30.</b> Options thérapeutiques alternatives.....	p 64
<b>Figure 31.</b> Cellules ATII en culture primaire.....	p 115
<b>Figure 32.</b> Modèle de la boucle autocrine de l'EGF.....	p 121
<b>Figure 33.</b> Modèle de l'implication des canaux $K^+$ dans les processus de réparation.....	p 125
<b>Figure 34.</b> Modèle de couplage entre la voie EGF/EGFR et les canaux $K^+$ .....	p 128

## Sigles et abréviations

**ΔF508** : délétion du résidu phénylalanine 508

**A (acide aminé)** : alanine

**Å** : angström

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

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

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire

**ADP** : adénosine diphosphate

**AE2** : échangeur d'anion 2 (*anion exchanger*)

**AMP** : adénosine monophosphate

**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique

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

**AQP** : aquaporine

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**ATI** : cellule alvéolaire de type I

**ATII** : cellule alvéolaire de type II

**ATP** : adénosine triphosphate

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

**Br<sup>-</sup>** : ion bromure

**c-Crk** : kinase liée au cycle cellulaire (*cell cycle related kinase*)

**C-terminal** : carboxy-terminal

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

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** : concentration de calcium intracellulaire

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

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

**CAP** : protéine associée au CFTR (*CFTR associated protein*)

**CBAVD** : absence bilatérale des canaux déférents (*congenital bilateral absence of vas deferens*)

- CCR2B** : récepteur chimiokine CC 2B (*CC chemokine receptor 2B*)
- CCSP** : protéine sécrétrice des cellules de Clara (*Clara cell secretory protein*)
- CFTR** : régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (*cystic fibrosis transmembrane regulator*)
- Cl<sup>-</sup>** : ion chlorure
- CLC** : canal chlore (*chloride channel*)
- CNG** : canal sensible aux nucléotides cycliques (*cyclic nucleotide-gated channel*)
- CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone
- D (acide aminé)** : aspartate
- DPC** : diphénylamine-2-carboxylate
- EGF** : facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)
- EGFRs ou erB**: récepteur de l'EGF (*EGF receptors*)
- ERK** : kinase régulée par un signal extracellulaire (*extracellular signal-regulated kinases*)
- ENaC** : canal sodique épithélial (*epithelial Na<sup>+</sup> channel*)
- F (acide aminé)** : phénylalanine
- FAK** : kinase d'adhésion focale (*focal adhesion kinase*)
- FGF** : facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*)
- FK** : fibrose kystique
- G (acide aminé)** : glycine
- GPCR** : récepteur couplé aux protéines G (*G protein-coupled receptor*)
- Grb-2** : protéine liée à un récepteur de facteur de croissance (*growth factor receptor bound protein 2*)
- GSH** : glutathion
- H (acide aminé)** : histidine
- H<sup>+</sup>** : proton
- H<sub>2</sub>O** : eau
- HB-EGF** : facteur de croissance épidermique se liant à l'héparine (*heparin-binding epidermal growth factor*)
- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : anion bicarbonate
- HGF** : facteur de croissance des hépatocytes (*hepatocyte growth factor*)

**HSC** : canal cationique hautement sélectif (***h**ighly **s**elective **c**ation **c**hannel*)  
**I** : ion iodure  
**IκB** : inhibiteur κB  
**ICAM-1** : molécule d'adhésion intercellulaire 1 (***i**nter**c**ellular **a**dhesion **m**olecule **1***)  
**IgE** : immunoglobuline E  
**IFNγ** : interféron-γ  
**IL-X** : interleukine  
**K (acide aminé)** : lysine  
**K<sup>+</sup>** : ion potassium  
**[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>** : concentration de potassium intracellulaire  
**K<sub>ATP</sub>** : canal potassique sensible à l'ATP  
**KCa (canal)** : canal potassique activé par le calcium  
**Kb** : kilobase  
**kDa** : kilodalton  
**KGF** : facteur de croissance des kératinocytes (***k**eratinocyte **g**rowth **f**actor*)  
**Kv (canal)** : canal potassique dépendant du voltage  
**L (acide aminé)** : leucine  
**LPA2-R** : récepteur de l'acide lysophosphatidique 2 (***L**ysop**h**osphatidic **a**cid **2** **r**eceptor*)  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**LTB4** : leucotriène B4  
**MAPK** : protéine kinase mitogène-activée (***m**itogen **a**ctivated **p**rotein **k**inase*)  
**MBL** : lectine liant le mannose (***m**annose-**b**inding **l**ectin*)  
**MCP-1** : protéine chimiotactique-1 des monocytes (***m**onocyte **c**hemotactic **p**rotein-**1***)  
**MMP** : métalloprotéinase matricielle (***m**atrix **m**etallo**p**roteinase*)  
**MSD** : domaines transmembranaires (***m**embrane-**s**panning **d**omain*)  
**MUC** : mucine  
**mV** : millivolt  
**N (acide aminé)** : asparagine  
**N-terminal** : amino-terminal  
**Na<sup>+</sup>** : ion sodium  
**Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase** : pompe sodium/potassium

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NBD** : domaines de liaison des nucléotides (*nucleotide binding domain*)  
**NEB** : cellules neuro-épithéliales pulmonaires (*neuro-epithelial bodies*)  
**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*)  
**NO** : oxyde nitrique  
**NSC** : canal cationique non-sélectif (*non-selective cation channel*)  
**NSAID** : anti-inflammatoires non-stéroïdiens (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)  
**ORCC** : canal chlore à rectification sortante (*outwardly rectified chloride channel*)  
**P (acide aminé)** : proline  
**P2Y<sub>2</sub>** : purinorécepteur  
**PAF** : récepteur du facteur d'activation des plaquettes (*platelet-activating factor*)  
**PCL** : liquide périciliaire (*periciliary liquid*)  
**PDGF** : facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)  
**PGE<sub>2</sub>** : prostaglandine E2  
**PI3K** : kinase 3-phosphatidylinositol (*phosphatidylinositol 3-kinase*)  
**PKA** : protéine kinase A  
**PKC** : protéine kinase C  
**PO<sub>2</sub>** : pression partielle d'oxygène  
**PP2A** : protéine phosphatase 2A  
**PRR** : récepteurs de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptor*)  
**pS** : picosiemens  
**PTB** : domaine de liaison de phosphotyrosine (*phospho-tyrosine binding*)  
**PTC** : codons stop prématurés (*premature termination codon*)  
**O<sub>2</sub>** : oxygène  
**Q (acide aminé)** : glutamine  
**R (acide aminé)** : arginine

**rhDNAase** : désoxyribonucléase humaine I recombinante (*recombinant human desoxyribonuclease*)

**RhoGTPase** : protéine GTPase Rho

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

**S (acide aminé)** : sérine

**SCN<sup>-</sup>** : ion thiocyanate

**SDRA** : syndrome de détresse respiratoire aigu

**SH2** : domaine d'homologie à Src 2 (*Src homology 2*)

**SNAP23** : protéine associée au synaptosome (*synaptosome-associated 23-kDa protein*)

**SP** : protéine du surfactant (*surfactant protein*)

**Src** : virus sarcome Rous (*Rous sarcoma virus*)

**STM** : segment transmembranaire des canaux potassiques

**SYN** : syntaxine

**TFF2** : facteur en trèfle (*trefoil factor family*)

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

**Th** : lymphocyte auxiliaire (*T-helper*)

**TM** : segment transmembranaire du canal CFTR

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

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

**UAVD** : absence unilatérale des canaux déférents (*unilateral absence of vas deferens*)

**VEGF** : facteur de croissance vasculaire endothélial (*vascular endothelial growth factor*)

**W (acide aminé)** : tryptophane

## Remerciements

Je voudrais remercier les membres de mon jury, le D<sup>re</sup> Céline Bergeron et le D<sup>r</sup> Simon Rousseau pour avoir gentiment accepté d'évaluer mon mémoire.

La réussite de ce projet est d'abord attribuable au D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero, qui m'a donné une chance et m'a aimablement accueilli dans son laboratoire. Elle a cru en mon potentiel et a su m'apprendre à repousser mes propres limites. Elle m'a soutenue et encouragée pendant toute la durée de ma maîtrise. Vous êtes une femme exceptionnelle 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. Certains sont même devenus plus que des collègues de travail. Anik, qu'aurai-je fait sans toi? Pour ta joie de vivre, ton soutien depuis toujours et ta grande amitié, je te remercie. Émilie, nous avons tous assisté à tes débuts, mais depuis tu es devenue une expérimentatrice et une jeune femme remarquable. Merci pour ta bonne humeur et ton amitié! Merci à Olivier, notre seul «gars», qui est toujours là pour défendre l'honneur des hommes! Enfin, pour vos 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. Ma belle princesse, Sydney, tu as toujours été une motivation d'aller plus loin et de croire en la vie. Et à la nouvelle petite arrivée, Eva, je t'aime déjà fort!! Je remercie mes sœurs et mes parents pour leur soutien constant et leur présence inestimable. Merci Maman pour ton amour! Merci Papa pour tes mots d'encouragement! Et merci «les filles» 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, Fred, THANK YOU! Your support and your presence meant more to me in the last few months than ever before. 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...

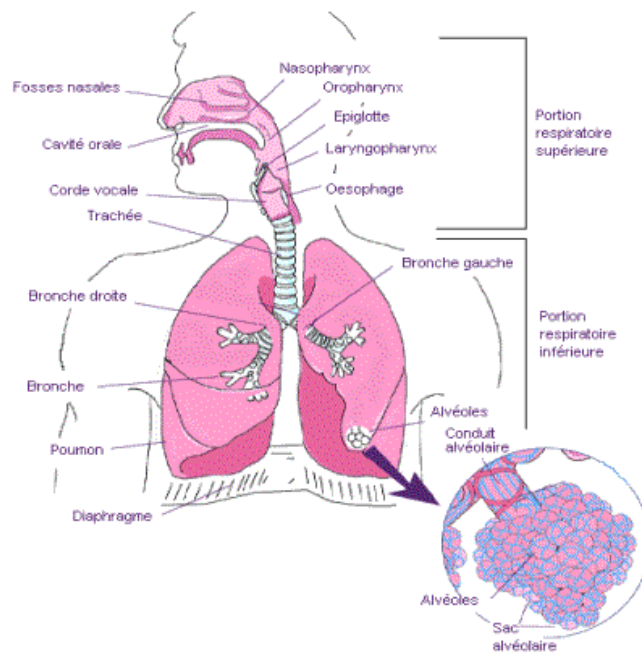
Merci à également à tous ceux et celles que j'aurais pu oublier!



## Chapitre 1 - Introduction

### 1) Anatomie et histologie du système respiratoire

Le système respiratoire est essentiel à la survie. Sa principale fonction est l'échange gazeux, soit l'élimination du dioxyde de carbone produit par la respiration cellulaire et l'oxygénation du sang, qui est ensuite redirigé vers les autres organes et tissus. L'air chargé d'oxygène entre, dans l'ordre, par le nez et passe par les fosses nasales, puis dans les différents segments du pharynx suivi par le larynx et la trachée pour finalement entrer dans l'arbre bronchique (**figure 1**). Le système respiratoire se sépare en deux parties : supérieure, soit du nez jusqu'au pharynx et inférieure, soit du larynx jusqu'aux embranchements les plus distaux du parenchyme pulmonaire (1).



**Figure 1. Anatomie du système respiratoire.** L'anatomie du système respiratoire se compose de la portion supérieure, soit du nez jusqu'au pharynx et inférieure, soit du larynx jusqu'aux embranchements les plus distaux du parenchyme pulmonaire. (Schéma tiré de Santé Canada).

Certains segments du système respiratoire servent à transporter, réchauffer et purifier l'air inspiré (zone de conduction), alors que d'autres constituent les sites où se font les échanges gazeux (zone respiratoire). Ainsi, l'anatomie et l'histologie des

différentes portions au long du système respiratoire se diversifient en fonction de leurs rôles, tel que nous le verrons dans les prochaines sections.

Il est à noter que le terme «épithélium respiratoire» désignera dans ce mémoire l'épithélium du système respiratoire supérieur et inférieur, soit des fosses nasales jusqu'aux alvéoles, alors que le terme «épithélium des voies aériennes» comprendra seulement la section des fosses nasales jusqu'aux bronchioles. Les termes «épithélium alvéolaire» et «épithélium bronchique» se référeront respectivement à l'épithélium des alvéoles et des bronches.

### **1.1) Le système respiratoire supérieur**

Le système respiratoire supérieur comporte les fosses nasales et les différents segments du pharynx, soit le nasopharynx, l'oropharynx et le laryngopharynx. L'épithélium pseudostratifié prismatique de la cavité nasale, qui repose sur une lamina propria, est composé de cellules ciliées, de cellules muqueuses et de cellules séreuses (**figure 2**). Ces dernières sécrètent respectivement du mucus contenant des enzymes antimicrobiennes et du liquide aqueux contenant les enzymes. Les cellules ciliées sont responsables du mouvement du mucus dans lequel sont piégés des particules inhalées indésirables.



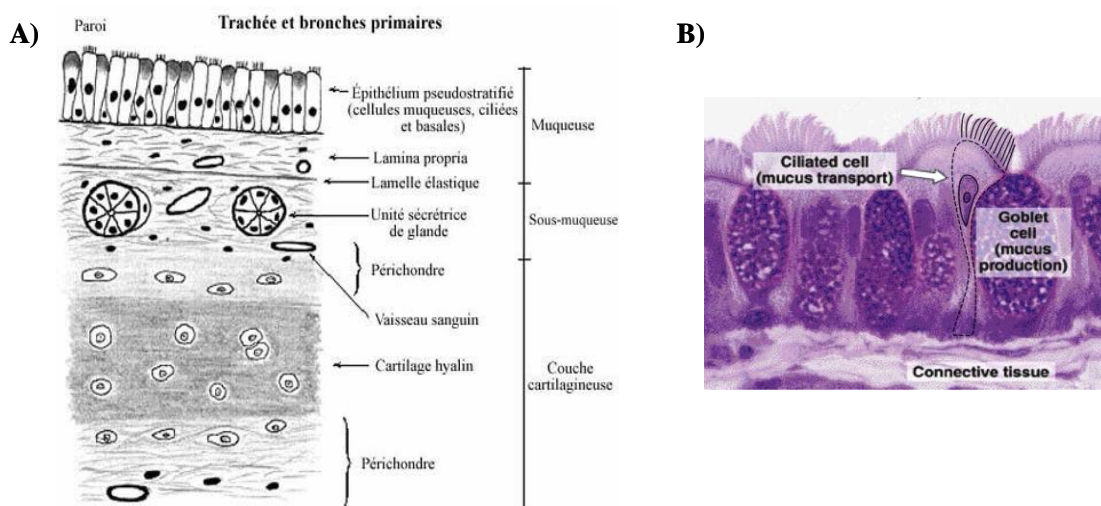
**Figure 2. Coupe histologique de la cavité nasale.** Coupe histologique de l'épithélium pseudostratifié prismatique de la cavité nasale qui montre des cellules ciliées et caliciformes. (Photo « *RESPIRATORY SYSTEM -- Nasal Respiratory Epithelium Goblet Cells* » de RC Wagner et de FE Hossler est tirée de la collection *Color Histology Images* du département de Sciences Biologiques de University of Delaware).

## 1.2) Le système respiratoire inférieur

### 1.2.1) Le larynx et la trachée

Le larynx, un conduit ostéo-cartilagineux rigide en forme d'entonnoir, est l'organe abritant les cordes vocales. L'épiglotte située dans le haut referme le larynx lors de la déglutition. Le larynx est constitué de cartilage hyalin et de glandes séro-muqueuses.

À la suite du larynx se trouve la trachée, un conduit flexible de 10 à 12 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre, qui se subdivise pour donner naissance aux deux bronches principales. La paroi de la trachée se compose de trois différentes couches, soit de l'extérieur vers l'intérieur : l'adventice, la sous-muqueuse et la muqueuse (**figure 3A**).



**Figure 3. Histologie de la trachée.** A) Coupe histologique schématisée de la paroi de la trachée et des bronches primaires composée de la muqueuse, la sous-muqueuse et la couche cartilagineuse. B) Coupe histologique de la muqueuse trachéale. (Photo tirée du manuel *Basic Histology: Text & Atlas* par Junqueira et Carneiro, p. 350, Figure 17-2)

La première couche est composée, du côté externe, de cartilage hyalin renforcé de 16 à 20 anneaux en forme de fer à cheval maintenus ensemble par des fibres élastiques. Ses propriétés élastiques procurent à la trachée la flexibilité nécessaire pour supporter les variations de pression lors du processus de respiration. Du côté interne, l'adventice est fait de nerfs, de vaisseaux sanguins, de glandes trachéales, mais plus principalement de tissu conjonctif lâche. Ce dernier, composé de protéoglycanes et de collagène mature, se

prolonge dans les tissus conjonctifs adjacents, soit les artères pulmonaires, le tissu péri-veineux ainsi que l'interstitium interlobulaire et pleural. Cette continuité du tissu conjonctif permet l'établissement d'une structure d'échafaudage pour les tissus conjonctifs plus fragiles du parenchyme. Enfin, le côté faisant face à l'œsophage, composé du muscle lisse trachéal et de tissu conjonctif, est souple afin de permettre à l'œsophage de se dilater au passage des aliments (1). La deuxième couche, la sous-muqueuse, est constituée de tissu conjonctif, de cartilage, de muscles et contient un grand nombre de glandes séro-muqueuses. Enfin, la dernière couche faisant face à la lumière trachéale est la muqueuse. Son épithélium, comme au niveau du larynx, est pseudostratifié prismatique cilié composé de cellules ciliées, caliciformes et basales (**figure 3B**).

Les cellules ciliées, environ cinq fois plus nombreuses que les cellules caliciformes, composent majoritairement l'épithélium trachéal. Elles ont un noyau basal, de nombreuses mitochondries apicales et des lysosomes. Les cellules ciliées, ancrées à la lame basale, s'étendent jusqu'à la lumière trachéale et forment une barrière imperméable grâce à leurs jonctions serrées créées par les desmosomes. Elles sont aussi bordées par de nombreuses microvillosités, importantes pour le transport transépithélial d'ions et de fluides. Chacune comporte de 200 à 250 cils, qui sont indispensables pour la clairance mucociliaire au niveau des voies respiratoires.

Les cellules caliciformes, caractérisées par des granules clairs aux électrons en microscopie de transmission, sécrètent des sulfomucines et des mucines neutres. Le mucus ainsi produit emprisonne et neutralise les particules inhalées et les évacue via le battement de cils des cellules ciliées (**voir section 2.2.1**).

Enfin, les cellules basales, petites et triangulaires sont ancrées à la membrane basale et ne voient jamais la lumière trachéale. Leur principale fonction est d'ancrer les cellules ciliées à la membrane basale, mais elles sont aussi impliquées dans la régénération de l'épithélium à la suite de lésions épithéliales par exemple (1).

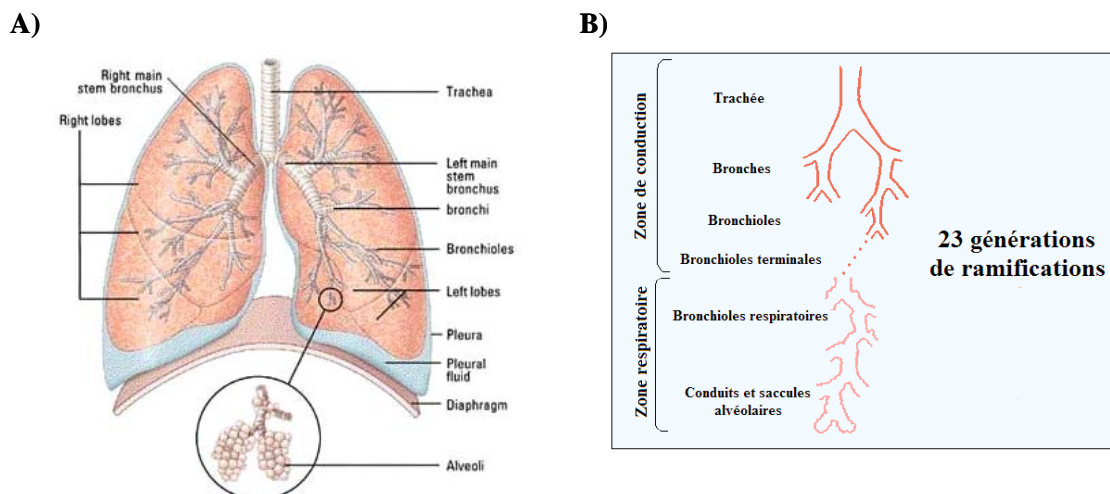
### **1.2.2) L'arbre bronchique**

Les deux poumons sont logés dans la cavité thoracique et la plèvre les enveloppe individuellement. Due à la position du cœur, le poumon gauche ne comporte que deux

lobes alors que celui de droite en possède trois. L'arbre bronchique s'étend des bronches principales aux alvéoles et se subdivise en 2 parties : la zone de conduction et la zone respiratoire. La zone de conduction comprend les bronches et les bronchioles alors que la zone respiratoire comprend les bronchioles respiratoires, les conduits et les saccules alvéolaires (**figure 4A**).

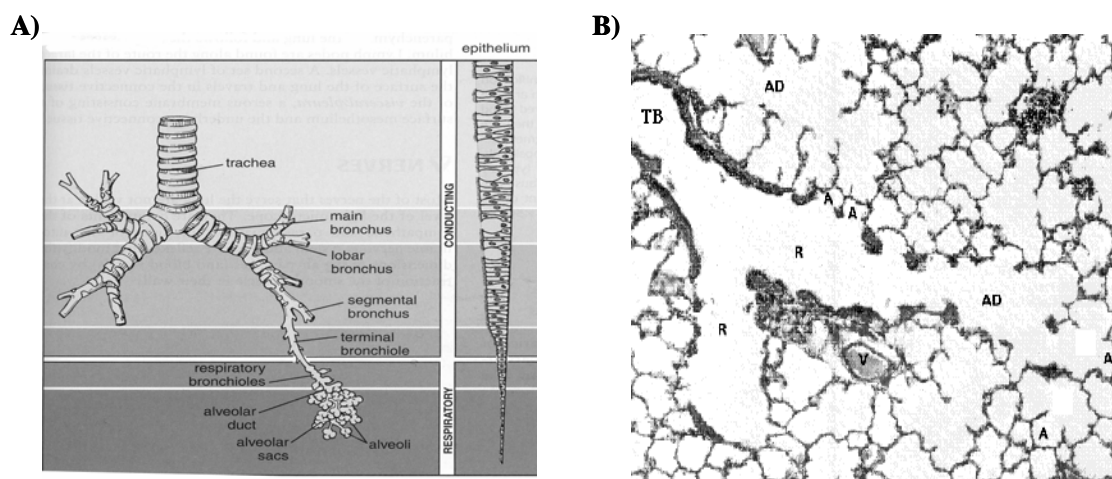
### **1.2.2.1) La zone de conduction**

Comme le système respiratoire supérieur, les bronches principales ont comme fonction de réchauffer, filtrer et saturer en vapeur d'eau l'air inspiré. Elles sont issues de la division de la trachée et s'enfoncent dans le hile des poumons. La bronche principale droite est plus large et courte que celle de gauche. Elles sont ensuite subdivisées en bronches secondaires, puis en bronches tertiaires et ainsi de suite, jusqu'aux bronchioles qui deviennent, en entrant dans les lobules pulmonaires, des bronchioles terminales. Les subdivisions totalisent 23 générations de ramifications des conduits aériens avec des diamètres décroissants (**figure 4B et 5A**).



**Figure 4. Ramifications de l'arbre bronchique.** **A)** Schéma représentant les ramifications de l'arbre bronchique. (*Schéma tiré de l'organisation Living donor Lung Transplant*) **B)** Schématisation de la ramification des voies aériennes et identification des segments de la zone de conduction (de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales) et de la zone respiratoire (des bronchioles respiratoires jusqu'aux conduits et saccules alvéolaires).

L'histologie de la zone de conduction varie à mesure que les conduits se ramifient (**figure 5**). La paroi des bronches proximales ressemble beaucoup à celle de la trachée, soit une couche fibro-cartilagineuse recouverte d'un épithélium pseudostratifié prismatique cilié. Cependant, il y a perte progressive du cartilage de soutien dans la ramification des bronches pour faire place à des plaques irrégulières de cartilage. À mesure que l'épithélium s'amincit au niveau des bronches terminales, l'épithélium pseudostratifié se transforme en épithélium cuboïde (épithélium simple) au niveau des bronchioles terminales (**figure 5A**). Une autre modification importante de l'histologie concerne les cellules ciliées. En effet, les cellules ciliées sont plus minces et de moins en moins nombreuses pour disparaître complètement dans les bronchioles terminales. D'autre part, les cellules caliciformes font progressivement place aux cellules de Clara. Ces dernières n'ont pas de cils. Elles sont prismatiques, mais en descendant dans l'arbre bronchique elles deviennent cuboïdes. Elles possèdent de nombreuses mitochondries, un réticulum endoplasmique lisse très développé et des granules de sécrétion contenant des anti-protéases et anti-oxydases spécifiques. Elles sont des cellules progénitrices, capables

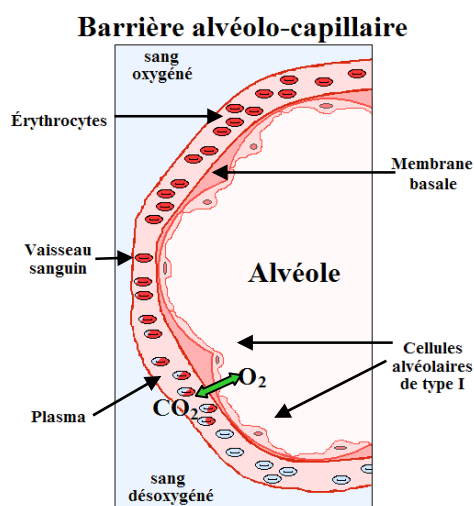


**Figure 5. Évolution histologique de l'épithélium respiratoire.** A) Schéma de l'évolution histologique de l'épithélium de la zone de conduction à la zone respiratoire. L'épithélium pseudostratifié prismatique cilié des voies aériennes s'amincit progressivement au long des ramifications pour devenir un épithélium cuboïde dans les bronchioles terminales. L'épithélium alvéolaire est composé de cellules alvéolaires de type I (ATI) et de type II (ATII). (Schéma tiré du cours *Histology D502* de *Indiana University Purdue University Indianapolis*) B) Coupe histologique de la zone de respiratoire montrant les bronchioles terminales et respiratoires, les conduits alvéolaires ainsi que les alvéoles.

de régénérer l'épithélium bronchiolaire, soit une fonction très importante qu'elles partagent avec les cellules alvéolaires de type II (ATII). Enfin, les fibres élastiques sont présentes tout au long de l'arbre bronchique. Au cours des ramifications, il y a apparition progressive du muscle lisse au niveau des bronches et aux segments subséquents. Ces deux composantes procurent aux bronches et ses ramifications la flexibilité nécessaire pour supporter les mouvements du processus de respiration (1).

### 1.2.2.2) La zone respiratoire

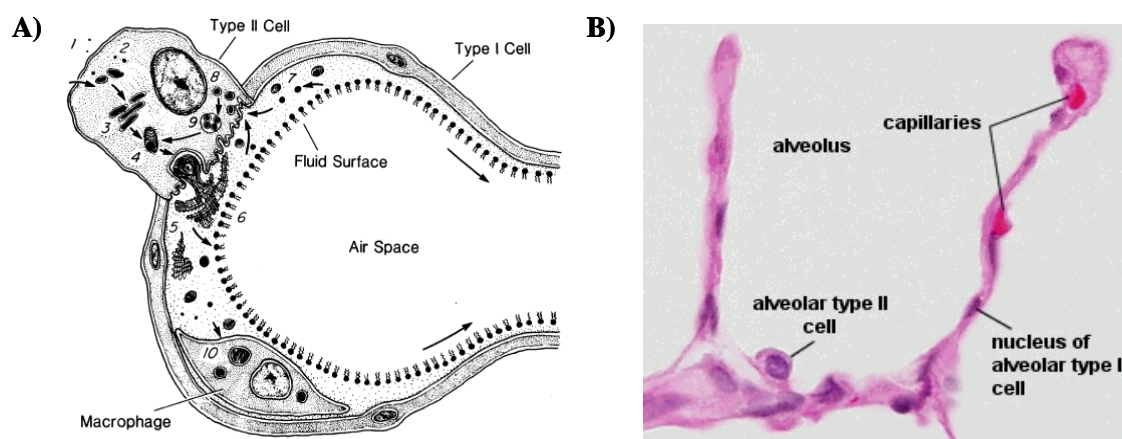
Le lobule pulmonaire est la plus petite structure visible à l'œil. Il se situe à l'extrémité descendante des bronchioles terminales, qui deviennent les bronchioles respiratoires. Ces dernières se prolongent en conduits alvéolaires pour se terminer en saccules alvéolaires, qui sont composés d'alvéoles, siège de l'échange gazeux. Cet important processus se produit au niveau de la membrane alvéolo-capillaire, soit l'endroit où la lame basale de la paroi des alvéoles entre en contact avec celle des capillaires sanguins (1; **figure 6**). Il y a dans le poumon environ 300 millions d'alvéoles enveloppées chacune d'un réseau de capillaires, donnant lieu à une surface d'échange extrêmement grande, soit d'environ 100 à 150 m<sup>2</sup>. La paroi des alvéoles est composée de cellules alvéolaires de type I et de type II (2,3; **figure 7**).



**Figure 6. Schéma de la barrière alvéolo-capillaire.** La barrière alvéolo-capillaire est l'endroit où la paroi des alvéoles entre en contact avec celle des capillaires sanguins permettant l'échange gazeux.

Les cellules alvéolaires de type I (ATI) constituent ~95% de la surface épithéliale alvéolaire (2,3). Ce sont de larges cellules squameuses à l'allure aplatie (**figure 7A**). Leur cytoplasme contient également des vésicules pinocytaires, ce qui suggère un transport transépithélial. Les cellules ATI forment une barrière à la diffusion des fluides grâce à leurs jonctions serrées (1). Cependant, elles démontrent une très grande perméabilité osmotique, puisqu'elles expriment des aquaporines (3; **voir section 2.3.4**). Les cellules ATI étaient précédemment connues pour avoir comme seule fonction l'échange gazeux. Plus récemment, des études ont démontré, via la mise en évidence de différents canaux ioniques, que les cellules ATI pouvaient aussi transporter des ions et des fluides (2,3).

Les cellules alvéolaires de type II (ATII) représentent moins de 5% des cellules alvéolaires en surface, mais représentent >95% de la population totale des cellules alvéolaires. Elles possèdent une allure plus cuboïde. Leur cytoplasme contient aussi un réticulum endoplasmique bien développé, un appareil de Golgi important, des corps lamellaires et neuroépithéliaux. Elles sont caractérisées surtout par la présence d'inclusions lamellaires cytoplasmiques, contenant le surfactant (1-3; **figure 7A**). Comme nous le verrons dans les sections suivantes, les cellules ATII remplissent plusieurs rôles : 1) elles synthétisent, sécrètent et recyclent le surfactant (**voir section**



**Figure 7. Structure et histologie alvéolaire.** A) Schéma de la structure d'une alvéole montrant les cellules alvéolaires de type I (ATI) et de type II (ATII), impliquées dans la production et la sécrétion de surfactant ainsi que les macrophages alvéolaires. (Image tirée de Hawgood & Clements, *J Clin Invest.* 1990) B) Coupe histologique d'une alvéole montrant les cellules ATI et ATII ainsi que des capillaires sanguins. (Photo tirée de School of Anatomy and Human Biology de University of Western Australia)



**2.1**), qui réduit la tension de surface et empêche l'affaissement des alvéoles, 2) elles transportent les ions et les fluides (**voir section 2.3**) et 3) elles jouent un rôle de cellules progénitrices (**voir section 2.2.3.3**). Les cellules ATII jouent un rôle particulièrement important dans la régénération épithéliale puisqu'elles sont capables de se différencier en cellules ATI lorsque celles-ci doivent être remplacées. Elles sont ainsi considérées comme une population de cellules souches (1,4).

## **2) Physiologie de l'épithélium respiratoire**

La fonction première des poumons est évidemment l'échange gazeux, qui assure l'approvisionnement en oxygène aux tissus ainsi que l'élimination du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) produit par la respiration cellulaire. Afin de maintenir le bon fonctionnement de ce phénomène vital, l'épithélium respiratoire a développé d'autres fonctions très importantes : la stabilité alvéolaire (**voir section 2.1**) au niveau de l'épithélium alvéolaire, les mécanismes de défense (**voir section 2.2**) ainsi que le transport ionique et liquidien (**voir section 2.3**). Ces mécanismes visent tous à préserver l'intégrité de l'épithélium respiratoire, pour que celui-ci puisse accomplir sa tâche la plus importante, soit la conduction et l'échange gazeux.

### **2.1) La stabilité alvéolaire**

Les cellules ATII de l'épithélium alvéolaire produisent du surfactant (**figure 7A**), une substance majoritairement composée de phospholipides (~80-90%), qui lui confère ses propriétés biophysiques d'élasticité et de viscosité. Sa fraction protéique (~10%) contient quatre apoprotéines (SP-A, -B, -C et -D) associées au surfactant. Les protéines SP-B et SP-C, petites et hydrophobes, sont importantes dans l'adsorption des lipides du surfactant à la surface épithéliale (4, 33). Les cellules ATII synthétisent, emmagasinent le surfactant dans les corps lamellaires et le sécrètent suite à un stimulus : une profonde inspiration peut être suffisante. Le surfactant doit être d'abord transformé à l'aide de la protéine SP-B en myéline tubulaire (assemblage de phospholipides et de SP-A) avant d'être actif (4, 33). Enfin, les cellules ATII recyclent près de 85% du surfactant. Quant à sa dégradation, elle est effectuée par l'action des macrophages. Une dysfonction du recyclage et/ou de la dégradation du surfactant peut causer (très rarement) une protéinose alvéolaire (4).

Compte tenu de la structure des alvéoles, l'épithélium alvéolaire a dû innover via la production de surfactant pour préserver la structure et éviter l'affaissement de l'espace alvéolaire pendant la respiration. En effet, le surfactant permet de réduire la tension de surface et contribue à la stabilité alvéolaire en empêchant les parois des alvéoles de se coller durant les variations de pression lors de la respiration. Certaines études ont reconnu d'autres fonctions au surfactant, dont entre autre, l'opsonisation de pathogènes. En effet,

les protéines SP-A et SP-D se lieraient aux pathogènes et les présenteraient aux macrophages afin de les éliminer de la lumière alvéolaire. Les protéines SP-A et SP-D ont également un rôle dans la réponse allergique. En effet, ces peptides sont capables d'inhiber la liaison de l'allergène à l'IgE, la relâche d'histamine et la prolifération des lymphocytes (78).

Le surfactant aurait un rôle dans l'homéostasie du fluide alvéolaire en prévenant l'accumulation de fluide (œdème) dans l'espace alvéolaire. En effet, le surfactant recouvre la mince couche de liquide sur les parois de l'alvéole (l'hypophase) et diminue la succion causée par l'interface air-liquide (4).

La composition du surfactant peut cependant varier selon différents états pathologiques. D'abord, la sécrétion de surfactant ne commence qu'à la 34<sup>ème</sup> semaine de gestation, le surfactant chez les nouveau-nés prématurés est déficient en phospholipides et en protéines SP-A / SP-C. Ce phénomène peut entraîner le développement du syndrome de détresse respiratoire infantile. D'autre part, chez les patients atteints du SDRA ou de pneumonie, on peut observer une diminution des acides gras dans le surfactant. Ensuite, dans plusieurs pathologies pulmonaires, telles que la fibrose kystique (FK), la pneumonie, la fibrose idiopathique et l'asthme allergique, le niveau de protéine SP-A dans le surfactant est diminué. La concentration de phospholipides peut également varier en condition pathologique, par exemple, elle est augmentée en FK et diminuée lors d'une pneumonie. Suite à ces baisses de protéines SP et de phospholipides, le surfactant perdrait ses propriétés d'agent tensio-actif et pourrait causer l'activation et la prolifération de lymphocytes. En effet, l'inflammation présente dans la plupart de ces maladies peut altérer ou diminuer la sécrétion de surfactant, mais aussi stimuler la production de cytokines. Par conséquent, dans certaines pathologies, la destruction des cellules épithéliales ATI et ATII cause la perte de l'intégrité de l'épithélium, et par conséquent, la production de surfactant par les cellules ATII. Bref, ce cercle vicieux entraîne inévitablement une détresse respiratoire (78).

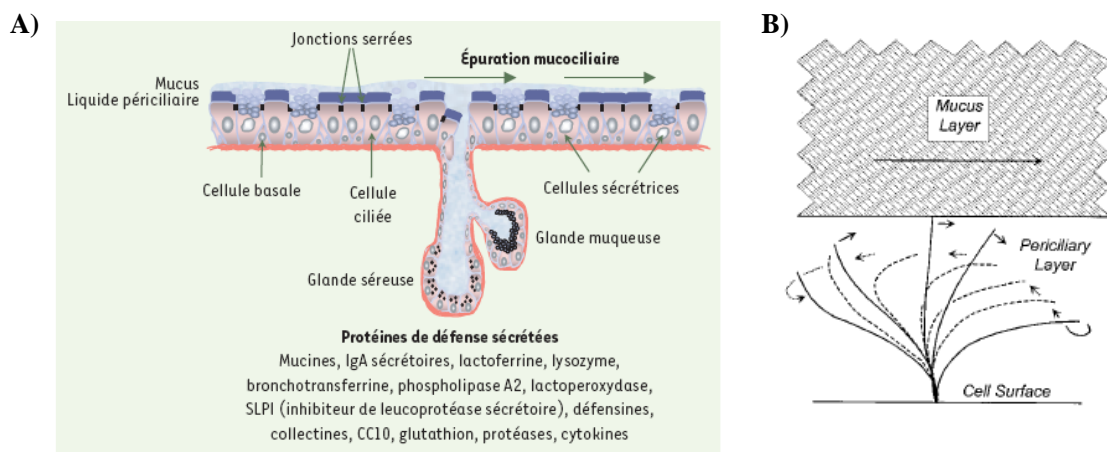
## **2.2) Les mécanismes de défense**

L'exposition constante à des agents pathogènes a amené l'épithélium respiratoire à développer des mécanismes de défense pour se protéger. L'épithélium forme grâce aux

desmosomes et aux jonctions serrées une barrière de défense physique (**figure 8A**). L'architecture en cul-de-sac du système respiratoire a favorisé le développement de mécanismes dynamiques (la clairance mucociliaire), immunologiques (la réponse immune face aux pathogènes) et de réparation (la régénération épithéliale suite à des lésions).

### **2.2.1) La clairance mucociliaire**

L'efficacité de la clairance mucociliaire dépend en grande partie du liquide de surface des voies aériennes (*ASL*, *airway surface liquid*) et de l'activité des cellules ciliées. L'épithélium des voies aériennes est recouvert d'une couche de liquide périciliaire (*PCL*, *periciliary liquid*) puis d'une couche de mucus, qui constituent l'ASL (17, 20, 21). Le mucus est composé de glycoprotéines appelées mucines. La MUC5AC et la MUC5B, sécrétées respectivement par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses, composent majoritairement le mucus. Les mucines de surface MUC1 et MUC4 entrent également dans la composition du mucus (20). Par sa texture visqueuse, le mucus emprisonne les agents pathogènes inhalés et les neutralise à l'aide de ses



**Figure 8. Mécanismes de défense et mouvement ciliaire.** **A)** Schéma de l'épithélium des voies aériennes montrant les mécanismes de défense, telle que les jonctions serrées formant la barrière physique, les protéines de défense ainsi que l'épuration mucociliaire, qui sont essentielles à la neutralisation et l'élimination des pathogènes (*Schéma tiré de Coraux et al. Med Sci (Paris) 2005*) **B)** Schématisation du mouvement ciliaire dans la couche de liquide périciliaire (PCL) qui transfère son mouvement au mucus, ce qui permet le processus de clairance mucociliaire. (*Schéma tiré de Matsui H et al. J Clin Invest. 1998*)

propriétés anti-oxydantes, anti-protéasiques et anti-microbiennes. En effet, le mucus contient du lysozyme, de la lactoferrine, des défensines, de la lactoperoxidase et de l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire, qui sont sécrétés par les glandes sous-muqueuses. La protéine CCSP, sécrétée par les cellules de Clara, ainsi que les protéines SP-A et SP-D, sécrétées par les cellules ATII, entrent dans la composition du mucus et jouent également un rôle dans l'élimination des agents infectieux (17; **figure 8A**). Le PCL, qui est moins visqueux, permet le battement adéquat des cils des cellules ciliées des voies aériennes (**voir section 1.2.1**) pour pousser le mucus contaminé vers le pharynx. Le battement des cils permet le transfert du mouvement au mucus et au PCL (**figure 8B**). Ainsi, les couches de liquide et de mucus se déplacent à la même vitesse, soit  $39,8 \pm 4,2$  et  $39,2 \pm 4,7$   $\mu\text{m}/\text{seconde}$ . Le mouvement de la couche de mucus permet l'élimination des particules insolubles alors que le transport axial du PCL permet la clairance des particules hydrophiles (21). Ainsi, la clairance mucociliaire constitue par une action mécanique la première ligne de défense face aux particules et aux agents pathogènes respirés.

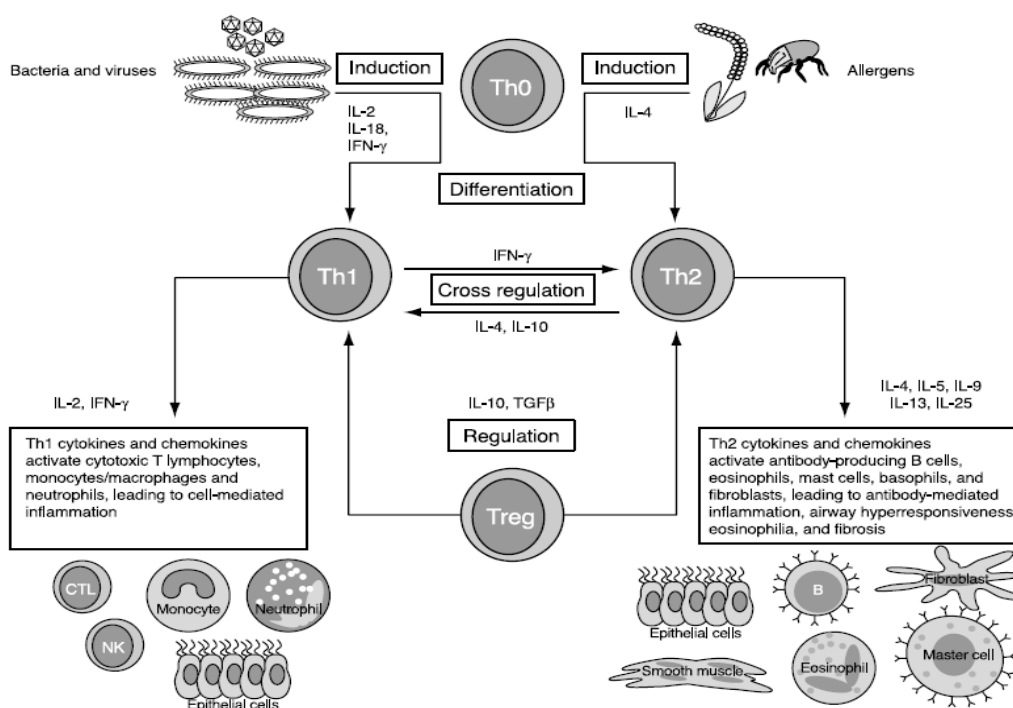
Il existe des pathologies où la fonction des cils est affectée, soit la dyskinésie primaire et secondaire. Dans la dyskinésie primaire, la structure et la fonction des cils sont anormales, ce qui cause l'absence de clairance mucociliaire. Cette pathologie autosomale récessive est souvent causée par des mutations des bras de dynéine, une composante importante pour le mouvement ciliaire (48, 70). La dyskinésie secondaire est causée par des infections bactériennes ou virales, par des drogues, des toxines et/ou des facteurs environnementaux. L'atteinte est moins sévère que celle de la dyskinésie primaire, mais la fonction ciliaire est tout de même diminuée (71, 72). Ce phénomène a comme conséquence une diminution de la clairance mucociliaire, ce qui mène à une mauvaise élimination des pathogènes inhalés et donc favorise les infections bactériennes.

### **2.2.2) La réponse immune**

L'intrusion d'un agent infectieux dans le système respiratoire déclenche une cascade d'évènements qui visent à l'éliminer. Tout d'abord, la présence d'un pathogène met en branle un éventail de cellules immunes telles que les macrophages, les monocytes et les neutrophiles polynucléaires, qui sont capables de phagocyter les corps étrangers. Ces dernières ainsi que les lymphocytes, les cellules NK, les cellules dendritiques,

épithéliales, endothéliales et les fibroblastes peuvent produire et sécréter des cytokines et des chémokines. Celles-ci sont impliquées dans les phénomènes de résolution de la réaction inflammatoire non spécifique, dans les processus lésionnels et de réparation des tissus (**voir section 2.2.3**) et/ou dans l'initiation de la réponse immune acquise (**figure 9**).

En effet, les cytokines sécrétées par les lymphocytes de type Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2, etc.) mènent à une réponse inflammatoire à médiation cellulaire. Celle-ci consiste à recruter des cellules immunes, telles que les macrophages, qui phagocyteront l'agent pathogène (bactéries, virus ou parasites). Les cytokines de type Th2 sont responsables de la réponse inflammatoire à médiation humorale. Ces molécules provoquent la production d'anticorps pour l'antigène ciblé, qui sont libérés dans la lymphe, le sang et les autres fluides. Il existe également des cytokines de type Th3, qui régulent les réponses de type Th1 ou Th2.



**Figure 9. Schéma de la réponse immune.** Schéma représentant l'induction d'une réponse immune de type Th1 ou Th2 suite à l'exposition à un agent infectieux. Les cytokines de type Th mènent une réponse inflammatoire à médiation cellulaire, alors que celles de type Th2 sont responsables de la réponse inflammatoire à médiation humorale. (Tulic et al. Ed: Hamid Q, Shannon J & Martin J. Hamilton Canada, BC Decker Inc. 2005, p.453-467. )

L'épithélium possède également un rôle important dans la réponse immune via la sécrétion de cytokines ainsi que de collectines et de défensines contenues dans le surfactant. Les cellules épithéliales sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1 $\beta$ , -6, -8, et du TNF, mais également de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (59). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires stimulerait l'activité d'un facteur de transcription majeur dans la réponse immune, le NF $\kappa$ B. L'IL-10 posséderait des propriétés anti-inflammatoires, puisqu'il induirait l'expression d'I $\kappa$ B, l'inhibiteur de NF $\kappa$ B et modulerait ainsi la réponse immune (64). Il semblerait que le TNF et l'IL-1 $\beta$  activent le NF $\kappa$ B et induisent la sécrétion d'IL-8 (69). Cette cytokine est le chemoattractant le plus important dans le recrutement de neutrophiles au site d'infection, qui permet l'élimination du pathogène (50, 59, 60, 63). Les cellules épithéliales expriment aussi ICAM-1, une molécule d'adhésion pour les neutrophiles (59).

En plus de ses capacités à participer dans la réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines, les cellules ATII participent aussi à la défense immunitaire en sécrétant des collectines et des défensines qui sont des peptides anti-microbiens. Comme expliqué à la **section 2.1**, les collectines (les protéines SP-A et SP-D) ont un rôle dans l'opsonisation et l'élimination des pathogènes ainsi que dans la réponse allergique. Les défensines sont capables d'éliminer les bactéries, les virus, les champignons, les spirochètes et les mycobactéries. Leur mode d'action demeure encore inconnu, mais il semblerait que les défensines pourraient également moduler l'inflammation (79, 80). Bref, la participation des cellules immunes et la sécrétion de molécules favorisant la réponse inflammatoire permettent l'élimination des pathogènes inhalés afin de protéger l'épithélium respiratoire. Cependant, une dérégulation de ce mécanisme de défense lors de différentes pathologies peut s'avérer dommageable pour l'intégrité et la fonction des tissus visés.

### **2.2.3) La régénération épithéliale**

#### **2.2.3.1) Causes des lésions épithéliales**

Des lésions épithéliales peuvent être occasionnées par des lésions mécaniques, des radiations, mais également par les agents infectieux (bactéries, champignons ou

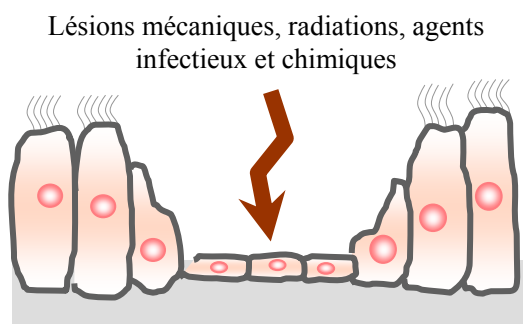
virus) et chimiques (fumée de cigarette et gaz polluants) retrouvés dans l'air inhalé (**figure 10**). Les exoproduits bactériens ainsi que des protéases et des radicaux libres, sécrétés par les cellules immunes, peuvent détruire les protéines structurales et endommager les cellules caliciformes et ciliées des parois des voies aériennes (137, 142, 144).

Il a été suggéré que ces agents toxiques peuvent être reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs (*PRR; pattern recognition receptor*), dont entre autres les récepteurs Toll-like (*TLR; Toll-like receptor*). Les TLR sont exprimés à la membrane apicale des cellules épithéliales ainsi qu'à la surface de certaines cellules immunes. Il a été suggéré que les TLR peuvent reconnaître des ligands de façon spécifique et que leur expression à la membrane est augmentée suite à l'exposition aux agents pathogènes. Les TLR2, -3, -4, -5, -9 reconnaîtraient respectivement, les peptidoglycanes et les acides lipotéchoïques des bactéries à gram-positif, l'ARN double brin viral, les lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à gram-négatif, la flagelline bactérienne ainsi que l'ADN non-méthylé bactérien. Il existe également les récepteurs couplés aux protéines G (*GPCR; G protein-coupled receptor*) qui sont capables de reconnaître des molécules étrangères et nocives. En effet, le récepteur du facteur d'activation des plaquettes (*PAF, platelet-activating factor*) reconnaît les bactéries à gram-positif alors que celui de l'acétylcholine est activé par la nicotine contenue dans la fumée de cigarette. Suite à la reconnaissance du pathogène ou de molécules toxiques, les GPCR et les TLR induisent la transmission d'un signal par différentes voies de signalisation. En effet, les GPCR ainsi que les TLR sont capables d'activer des protéines membranaires (canaux ioniques, EGFR, etc.) et plusieurs voies de signalisation via différents effecteurs (NFκB, PLC, PKC, PKA, PIK3, MAPK, ERK, etc.) afin de générer différentes réponses cellulaires, telles que la survie cellulaire, le déclenchement de l'inflammation ainsi que la réparation (171-174). Il semblerait même que certaines composantes des voies de signalisation des GPCR puissent également réguler l'activité des TLR (174). L'activation de ces récepteurs membranaires, qui reconnaissent les pathogènes ou les agents toxiques, entraîne donc la production de différentes protéines impliquées dans la réponse immune et/ou au déclenchement des processus de réparation, en partie via EGFR, pour régénérer les régions lésées par ces molécules (137).



### 2.2.3.2) Conséquences physiologiques des lésions épithéliales

Suite à des lésions, il y a une perte de l'intégrité épithéliale. En effet, les tissus atteints sont dénudés partiellement ou totalement de la couche de cellules épithéliales qui les recouvrait. La membrane basale peut être exposée et même parfois endommagée, ce qui dévoile le tissu conjonctif (83, 132, 133, 140, 143; **figure 10**).

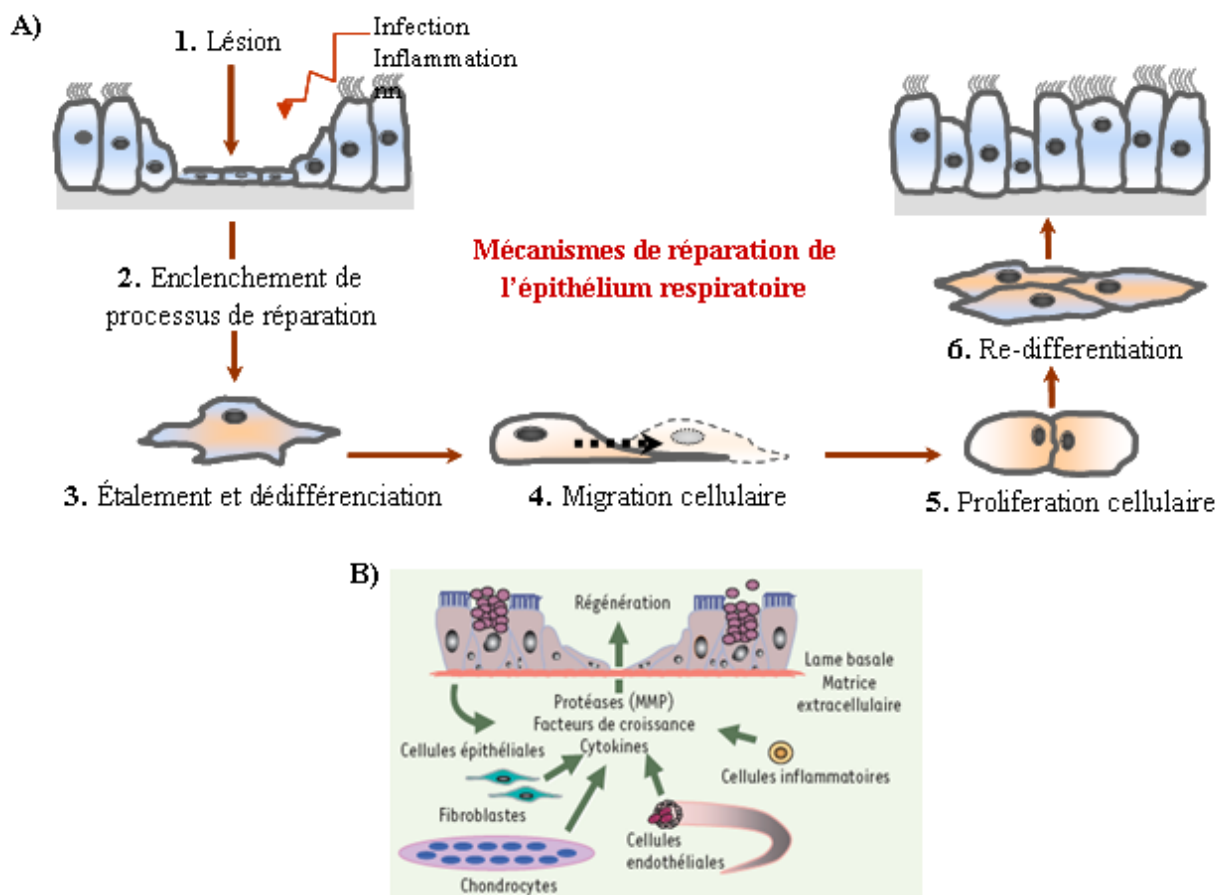


**Figure 10. Schéma d'une lésion épithéliale.** Les tissus lésés sont dénudés partiellement ou totalement de la couche de cellules épithéliales qui les recouvrait exposant la membrane basale et parfois même le tissu connectif.

De sérieuses conséquences peuvent découler de cette perte d'intégrité épithéliale, dont la perturbation de la barrière physique face aux pathogènes (139). En effet, lorsque la barrière épithéliale est rompue, il peut y avoir infiltration bactérienne, ce qui peut causer de l'infection, de l'inflammation et même un choc septique. Ensuite, l'homéostasie des fluides, préservée par le transport ionique, est perturbée par des dommages causés à l'épithélium (32). En effet, une dysfonction du transport des fluides et des ions peut affecter les mécanismes de défense, telle que la réparation épithéliale (**voir section 2.2.3**), la réponse inflammatoire (**voir section 2.2.2**) et la clairance mucociliaire (10, 11, 20, 28, 32; **voir section 2.2.1**). Au niveau alvéolaire, la perte de l'intégrité épithéliale peut mener à l'accumulation de liquide dans les alvéoles causant un œdème, mais peut également mener à l'affaissement des alvéoles par la destruction des cellules ATII produisant le surfactant, essentiel à la stabilité alvéolaire (**voir section 2.1**). Suite à des lésions épithéliales sévères et en présence d'inflammation chronique, il peut se développer de la fibrose, qui se caractérise par le remplacement du tissu parenchymal par des tissus conjonctifs aux sites de lésions (142). Ce phénomène cause malheureusement une forte diminution de la fonction respiratoire (10, 32). C'est donc pour la protection du système respiratoire ainsi que pour la préservation des fonctions de l'épithélium que la réparation tissulaire est essentielle à la protection de l'intégrité épithéliale.

### 2.2.3.3) Processus de réparation épithéliale

La régénération épithéliale dépend d'un ensemble de phénomènes qui sont mis en place séquentiellement (**figure 11A**). D'abord, les cellules épithéliales et endothéliales intactes déclenchent la phase de coagulation antifibrinolytique via la sécrétion de médiateurs inflammatoires (**figure 11B**). Ce phénomène entraîne la formation de caillots sanguins, la sécrétion de substances vasoactives et de facteurs de croissance, qui est suivi de la production de matrice provisoire constituée d'un réseau fibrine-fibronectine riche en plaquettes sanguines. Les cellules épithéliales et endothéliales lésées sécrètent également des métalloprotéinases matricielles (*MMP; matrix metalloproteinase*), qui dégradent les tissus partiellement dénaturés pour faire place à cette matrice provisoire, essentielle à la migration des cellules inflammatoires et des fibroblastes (133, 142). Cependant, le rôle de



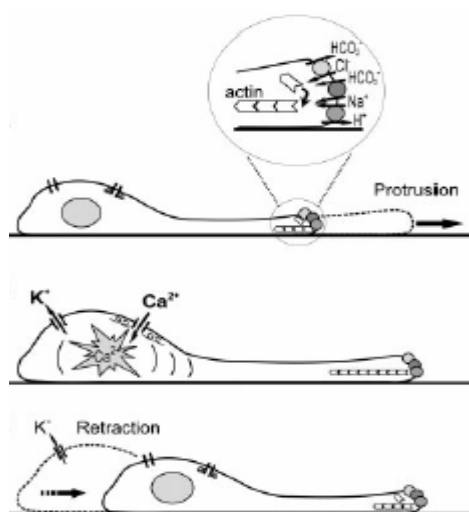
**Figure 11. Processus de réparation.** **A)** Modèle des mécanismes séquentiels mis en place lors des processus de réparation de l'épithélium respiratoire. **B)** Schéma des différents types cellulaires et des molécules impliqués dans la régénération épithéliale. (Schéma tiré de Coraux et al. *Med Sci (Paris)* 2005)

ces MMP semble beaucoup plus complexe. Les MMP-2 et -9 auraient un rôle inhibiteur de la prolifération et de l'adhésion cellulaire alors que la MMP-7 pourrait aider à la réparation épithéliale. Il semblerait qu'elle clive l'ectodomaine de la cadhérine, une molécule d'adhérence intercellulaire, et permettrait ainsi la migration des cellules impliquées dans la réparation. La MMP-7 pourrait aussi cliver et activer les peptides antimicrobiens contenus dans le mucus. De façon encore plus intéressante, les MMP contribueraient également au relargage de facteurs de croissance qui stimuleraient les processus de réparation épithéliale (83; **voir section 2.2.3.4**).

La phase inflammatoire commence en même temps que la phase de coagulation (133). Les neutrophiles et macrophages ainsi que les monocytes recrutés au site de lésion participent également à l'élimination des débris cellulaires et des pathogènes présents (133, 142). Ces cellules inflammatoires sont aussi impliquées dans la sécrétion continue de cytokines pour la stimulation du processus de prolifération et d'angiogenèse. Les cellules basales migrent pour recouvrir la région lésée (83). On note un phénomène de dédifférenciation cellulaire des cellules progénitrices, soit les cellules de Clara et/ou les cellules ATII (**figure 11A, étapes 2 et 3**).

Ensuite, les cellules aux bords de la plaie s'étendent, s'aplatissent, forment des pseudopodes et migrent (83, 133, 142, 143). Le processus de migration cellulaire dépend de la réorganisation du cytosquelette d'actine combinée à une variation du volume cellulaire. Il semblerait que la formation du pseudopode frontal ainsi que la rétractation de l'uropode caudal se produirait de façon séquentielle (**figure 11A, étape 4**) et seraient régulés par le transport ionique (**figure 12**). En effet, il a été suggéré que l'échangeur NHE1 serait impliqué dans le maintien de la polarisation et de l'adhésion de la cellule en train de migrer. Ensuite, on a aussi observé que l'élévation du  $[Ca^{2+}]_i$  permettait la dépolymérisation de l'actine alors qu'une diminution du  $[Ca^{2+}]_i$  entraînerait sa polymérisation (135). La mobilité cellulaire dépend également des intégrines, qui sont des récepteurs d'adhésion cellulaire (83, 135). Ces récepteurs sont capables de se lier à leurs ligands situés sur la matrice extracellulaire. Cette interaction permet la réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule via l'activation de la protéine FAK par le complexe protéique Src, Grb-2 et c-Crk (83). Il semblerait que le recyclage de ces intégrines et de la phosphorylation des chaînes légères de myosine sont aussi des

phénomènes régulés par le  $[Ca^{2+}]_i$ . Il a également été suggéré que l'influx d'ions  $Na^+$  et  $Cl^-$  par l'échangeur  $Na^+/H^+$  et l'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  AE2 au pôle frontal entraîne une entrée d'eau via les aquaporines. Cette augmentation locale de la pression hydrostatique permet la polymérisation de l'actine et donc la formation du pseudopode. Ensuite, l'efflux ionique par les canaux  $K^+$  et les canaux  $Cl^-$ , qui se retrouvent au niveau de l'uropode caudal, occasionnerait une diminution du volume cellulaire et donc la rétractation du pôle postérieur. Ainsi un cycle continu de formation de pseudopode et de rétractation du pôle postérieur permettrait la mobilité cellulaire (135).



**Figure 12. Modèle du phénomène de migration cellulaire.** L'augmentation du volume cellulaire sous le contrôle de canaux ioniques au pôle frontal et la réorganisation du cytosquelette d'actine permet la formation du pseudopode alors que l'efflux d'ions  $K^+$  favorise la rétractation du pôle postérieur. Le  $[Ca^{2+}]_i$  module également la polymérisation de l'actine. (Schéma tiré de Schwab A. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001)

Les cellules épithéliales et fibroblastes prolifèrent également afin de repeupler et réparer la plaie (**figure 11A, étape 5**). L'équilibre entre la fonction des cellules épithéliales et celle des fibroblastes est important dans le processus de réparation (143). En effet, au niveau alvéolaire, il a été démontré que les cellules ATII, via la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , pouvaient inhiber les fibroblastes, ce qui favorise la réépithélisation au détriment du développement de la fibrose (138). Il a également été suggéré que les canaux  $K^+$  pouvaient moduler la prolifération cellulaire (**voir section 2.3.5.1**). Enfin, lors de la phase de maturation, on voit la réponse inflammatoire et l'angiogenèse diminuer (133) alors que les cellules finissent par se re-différencier (**figure 11A, étape 6**). Au niveau des alvéoles, les cellules ATI sont plus sensibles aux lésions, alors que les cellules ATII, qui sont plus résistantes, agissent comme cellules progénitrices et permettent donc

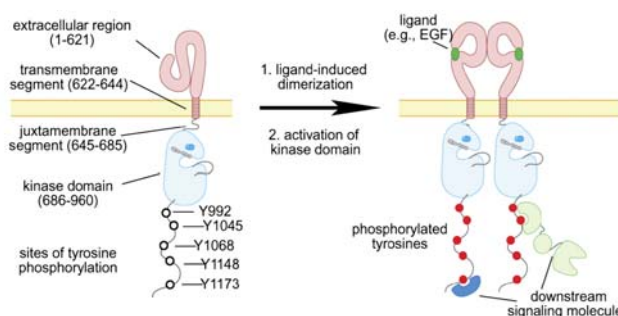
la réépithélisation alvéolaire (140). L'épithélium alvéolaire se re-différencie en épithélium cuboïde composé de cellules ATI et ATII, alors que dans les voies aériennes, on retrouve une couche de cellules malpighiennes, suite à la phase proliférative, qui recouvre un épithélium pseudostratifié. Celui-ci se pseudostratifie de façon progressive jusqu'à l'obtention d'un épithélium bronchique fonctionnel (17, 29, 83; **figure 11A, étape 7**). La capacité des cellules épithéliales à réparer une lésion dépend de leur habileté à migrer, proliférer et changer de phénotype, de leur interaction avec les autres cellules et la matrice extracellulaire, mais également de l'environnement inflammatoire propice à une réparation épithéliale normale (143).

#### **2.2.3.4) Facteurs impliqués dans la régulation de la réparation épithéliale**

Il est reconnu que les processus de réparation dépendent des facteurs de croissance (32, 139, 155, 157; **figure 11B**). Suite aux lésions, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les macrophages sont capables de sécréter certains facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance épidermique (EGF), transformant ( $TGF\alpha$  et  $TGF\beta$ ), des kératinocytes (KGF), des hépatocytes (HGF), des fibroblastes (FGF), dérivé des plaquettes (PDGF) (83, 84, 134, 137-140, 143). Ces facteurs de croissances peuvent avoir des effets très variés sur la réparation épithéliale via la modulation des phénomènes de migration, de prolifération et de différenciation cellulaire.

Les récepteurs à l'EGF (EGFRs ou erbB) sont des glycoprotéines membranaires. Le récepteur erbB1 ou EGFR, une protéine de 170 kDa, a été le premier récepteur possédant une activité tyrosine kinase à avoir été séquencé. Le gène d'erbB1 est composé de 26 exons étalés sur 110 kb, qui code pour une protéine de 1186 acides aminés. Le récepteur est composé d'un domaine N-terminal extracellulaire, qui contient deux domaines riches en cystéines formant le site de liaison des ligands. Le domaine transmembranaire est constitué d'une hélice alpha unique. Le domaine cytoplasmique C-terminal possède une activité protéine tyrosine kinase. On y retrouve cinq différents motifs consensus d'autophosphorylation qui permettent l'interaction avec des protéines contenant les motifs SH2 (*Src homology 2*) et PTB (*phospho-tyrosine binding*). Il existe également trois motifs d'internalisation, qui permettent le recyclage des récepteurs inactivés, ainsi que des sites de transphosphorylation, d'activation protéolytique et de

dégradation. En fait, la queue C-terminale possède une fonction régulatrice, puisqu'elle peut s'auto-inhiber et empêcher EGFR de phosphoryler ses substrats (**figure 13, panneau de gauche**).



**Figure 13. Structure et activation du récepteur EGFR.** Le domaine extracellulaire, qui permet la liaison du ligand, est suivi du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire, qui possède des sites de phosphorylation ainsi qu'une activité tyrosine kinase. Suite à la liaison d'un ligand sur le domaine extracellulaire, le récepteur se dimérise et enclenche la phosphorylation des résidus tyrosines, qui permet différentes cascades cellulaires. (Image tirée de Zhang X. *Cell*. 2006)

Dans les voies aériennes, on retrouve les récepteurs EGFR (erbB1), erbB2 et erbB3 (137). Leurs ligands connus sont le EGF, le TGF $\alpha$ , le HB-EGF, l'amphiréguline, la bêtacelluline, l'épiréguline, l'épigène et l'héréguline, qui sont synthétisés par les cellules épithéliales, les fibroblastes, les éosinophiles, les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes (84, 134, 137, 124, 156). Lors d'une activation par un ligand, le récepteur doit se dimériser (les homo- ou les hétérodimères sont possibles) entraînant la phosphorylation de certains sites des domaines cytoplasmiques par leur activité kinasique intrinsèque (**figure 13, panneau de droite**). Il a aussi été suggéré que l'activation du EGFR pouvait se faire de façon indirecte, soit via la détection de différents pathogènes par les récepteurs TLR et GPCR (137; voir section 2.2.3.1). L'activation de l'EGFR amène la transduction du signal via les voies de signalisation Ras-MAPK et PI3K-Akt, impliqués dans la régulation des processus de migration et de prolifération cellulaire (147). En effet, il semblerait qu'EGFR serait capable de stimuler la réparation épithéliale au niveau des alvéoles et des voies aériennes (83, 137, 140). On aurait également observé une augmentation de l'expression de l'EGFR au niveau des régions lésées (134, 137, 155).

Les ligands du récepteur EGFR n'induisent pas tous le même effet sur les cellules en réparation. En effet, l'EGF et le TGF $\alpha$  activeraient la voie MAPK et stimulerait la réparation alvéolaire induite par l'IL-1 $\beta$  (140). L'EGF semblerait capable de bloquer la différenciation des cellules ciliées et d'induire celle des cellules muco-sécrétrices. Ensuite, il existe une transactivation entre les récepteurs respectifs de l'EGF et du PDGF, qui entraînerait une augmentation de la prolifération et de la différenciation des cellules respiratoires (83). Cependant, le PDGF semble aussi avoir des fonctions fibrotiques, puisqu'il est capable de stimuler le recrutement et la prolifération des fibroblastes ainsi que de stimuler la production de muscles lisses et de collagène. Ensuite, le KGF, sécrété par les fibroblastes, semblerait aussi passer par la voie EGFR et induirait la migration, la prolifération et même la différenciation cellulaire (83, 84, 134, 138, 140).

Le récepteur du TGF $\beta$  activé est un hétérodimère formé d'un récepteur de type I de 55 kDa et d'un autre de type II de 70 kDa possédant une activité sérine/thréonine kinase (134). Il semblerait que les lésions seraient l'évènement qui activerait la forme latente du TGF $\beta$ 1, qui est sécrété par les cellules épithéliales et les fibroblastes (139, 143). Le TGF $\beta$ 1 stimulerait la migration cellulaire en activant la voie MAPK afin de produire de la fibronectine contenue dans la matrice extracellulaire (84, 134, 143). Cependant, le TGF $\beta$ 1 inhibe la prolifération cellulaire en stimulant les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes et en diminuant c-myc, qui est important pour la progression de la phase G1 en phase S du cycle cellulaire (84, 134). Le TGF $\beta$ 1 semble aussi impliqué dans la modulation de la réponse inflammatoire. En effet, il pourrait réguler à la baisse le facteur NF $\kappa$ B et la production d'IL-8, des éléments clés de l'inflammation (**voir section 2.2.2**).

Le HGF, sécrété par les cellules mésenchymateuses, est le seul ligand connu pour son récepteur c-met. Le HGF semble avoir des propriétés mitogéniques, puisqu'il stimule la prolifération des cellules ATII (83, 84, 140). Il semble également impliqué dans la différenciation des cellules ciliées et des cellules ayant une fonction sécrétrice de Cl<sup>-</sup>. Ensemble, l'insuline et le HGF stimulent la production de matrice extracellulaire pour faciliter la migration des cellules (83). La synthèse de HGF est augmentée par le FGF-2, qui permet également la stimulation de la prolifération des cellules épithéliales et des fibroblastes (84). Le HGF stimule aussi la synthèse et la sécrétion du facteur de

croissance de l'endothélium vasculaire (*VEGF*; *vascular endothelial growth factor*), qui est important pour le processus d'angiogenèse lors de la réépithélisation (84).

D'autres molécules sont aussi capables de stimuler la réparation épithéliale, telles que la MCP-1 qui lie le récepteur CCR2B et le TFF2, qui active la PKC et la voie ERK1/2. Les défensines, qui possèdent un rôle dans l'élimination des pathogènes emprisonnés dans le mucus, semblent également capables d'activer la voie MAPK-ERK1/2 pour stimuler les processus de migration et de prolifération ainsi que la différenciation des cellules muco-sécrétrices. Certaines cytokines sont aussi impliquées dans la réépithélisation, telles que l'IL-8 qui stimule les MMP ainsi que l'IL-13 qui stimule la production de facteurs de croissance et qui possède des propriétés mito- et motogéniques (83). Le TNF peut aussi induire une augmentation de la migration des cellules épithéliales (143). Bref, il existe une multitude de facteurs qui interviennent dans les processus de réparation épithéliale, ce qui rend plus ardue l'étude des mécanismes de régulation du phénomène.

#### **2.2.3.5) Conditions pathologiques et remodelage épithélial**

Dans plusieurs pathologies, telles que la fibrose kystique (FK), l'asthme et le syndrome de bronchiolite oblitérante, on peut observer des changements histologiques des tissus pulmonaires. Ces changements peuvent être de différents types en fonction de la pathologie et le remodelage épithélial au niveau de voies aériennes peut être caractérisé, dépendamment du type de pathologie, par des lésions ou la perte de la surface épithéliale, de l'hyperplasie des myofibroblastes, de la métaplasie des cellules caliciformes, de l'hyperplasie et l'hypertrophie des myocytes, de l'accumulation du dépôt de collagène et/ou d'une augmentation de la vascularisation et des muscles lisses (134, 141, 143). Au niveau des voies aériennes supérieures des patients asthmatiques, on peut observer de l'hyperplasie des cellules épithéliales, de l'accumulation de protéines plasmiques ainsi que de l'augmentation du dépôt et de dégradation de la matrice (133). Le phénomène de remodelage est un processus dynamique de production et de dégradation de matrice, qui fait suite à des lésions épithéliales dans un environnement inflammatoire chronique (132, 133). Il semblerait que les foyers fibroblastiques/myofibroblastiques soient le site actif de remodelage. Les cycles répétés de lésions et



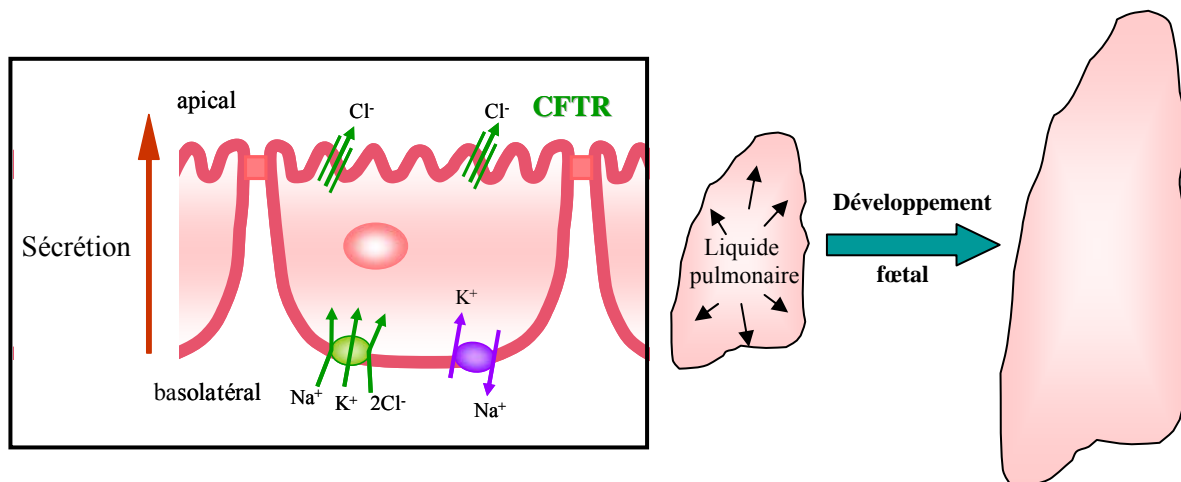
réparation semblent conduire les myofibroblastes à produire une matrice extracellulaire qui résulte en une fibrose sous-épithéliale (132, 134).

Il a été suggéré que le processus de remodelage est causé par un déséquilibre des facteurs de croissance qui favoriserait le développement de la fibrose au détriment de la réparation épithéliale (134). Il a également été démontré que le remodelage dans la pathologie de la FK pouvait être causé par une dérégulation de l'expression et la sécrétion des MMP et des cytokines, qui sont sécrétées par les fibroblastes, les cellules inflammatoires et les cellules épithéliales activées, ce qui entraînerait une hyperprolifération cellulaire et une réponse inflammatoire soutenue (82, 133). En effet, il a été suggéré que la réparation d'une lésion lors d'une réponse inflammatoire chronique pouvait altérer la composition de l'épithélium en réparation. On a pu alors observer que lors du processus de remodelage, le nombre de cellules caliciformes était augmenté, entraînant ainsi une surproduction de mucus et une obstruction des voies aériennes, amplifiant encore le phénomène d'inflammation (141). Il semble également que les eicosanoïdes soient impliqués dans le processus de remodelage épithélial. En effet, il a été démontré que les cystéinyl-leucotriènes induisent la sécrétion de mucus, l'hyperplasie des glandes muqueuses et des muscles lisses ainsi que le dépôt de collagène et de fibrose. D'autre part, on a démontré que la prostaglandine PGE2 peut inhiber la prolifération cellulaire et la synthèse de collagène (133). Les conséquences du processus de remodelage sont évidemment des dommages à l'architecture des voies aériennes et des alvéoles, qui se résulte à la diminution de la fonction respiratoire.

### **2.3) Le transport des ions et des fluides**

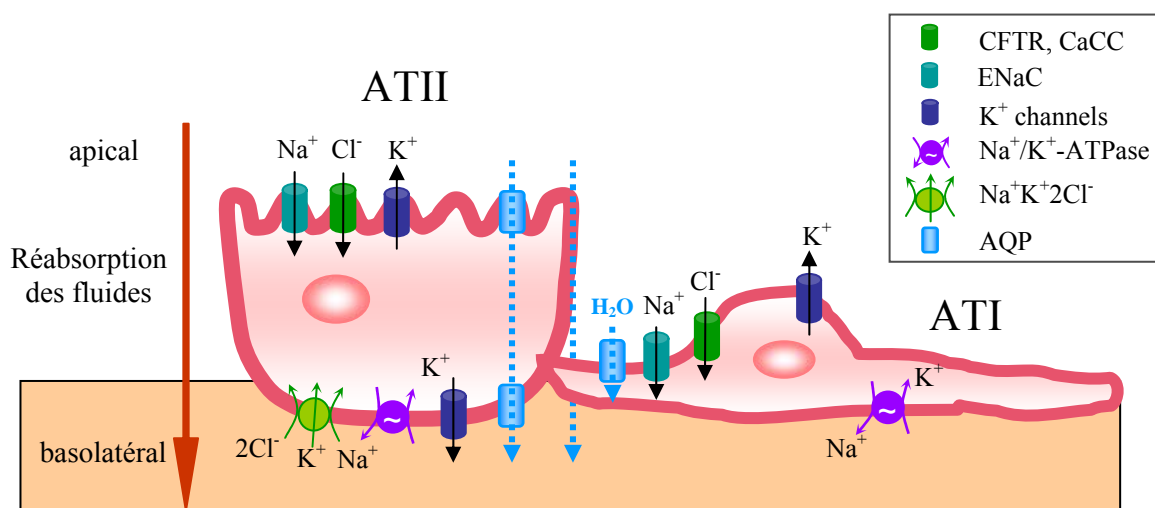
Le transport des ions et des fluides veille au bon fonctionnement du système respiratoire et est essentiel à l'homéostasie des fluides recouvrant l'épithélium des voies aériennes et des alvéoles (20). En effet, comme mentionné à la **section 2.2.1**, le volume et la composition de l'ASL sont des éléments importants pour une clairance mucociliaire efficace. Plusieurs canaux et pompes sont impliqués dans le transport transépithélial des ions et des fluides du développement fœtal puis tout le long de la vie adulte.

Durant la vie fœtale, la production de liquide par l'épithélium pulmonaire, favorisée par la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ , est importante pour le développement et la maturation des tissus pulmonaires (2; **figure 14**). Cependant, au moment de la naissance, les



**Figure 14. Sécrétion de  $\text{Cl}^-$  durant le développement.** Représentation de la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  durant le développement fœtal des poumons.

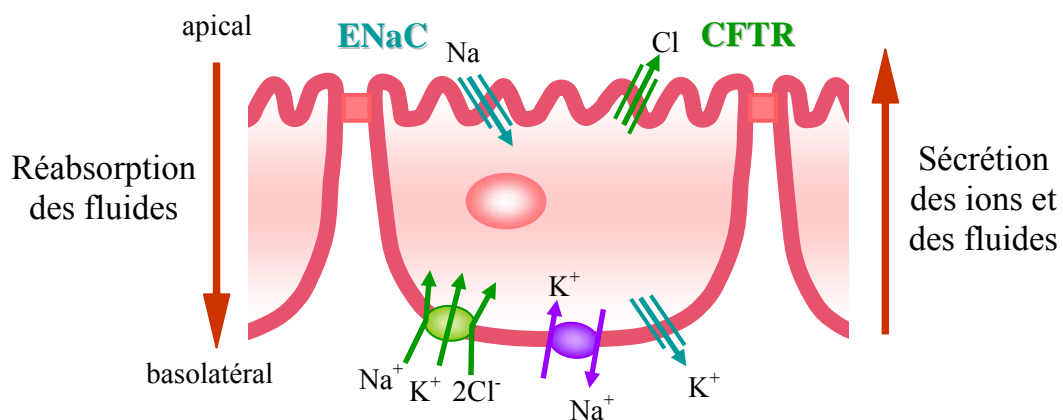
poumons du nouveau-né doivent rapidement pouvoir éliminer le liquide pour permettre l'échange gazeux. L'épithélium alvéolaire devient alors un épithélium de réabsorption. L'élimination du liquide contenu dans les poumons afin de permettre la respiration du nouveau-né dépend majoritairement de la réabsorption de  $\text{Na}^+$  par le canal ENaC (7, 23, 31, 36; **figure 15**). En effet, une étude a démontré que des souris transgéniques déficientes pour le gène de la sous-unité  $\alpha$  d'ENaC ne survivaient pas à la naissance puisqu'elles étaient incapables d'éliminer le liquide de leurs poumons. Cette étude démontre bien que le canal ENaC est indispensable à l'adaptation des poumons du nouveau-né pour la respiration (9). Comme représenté sur le schéma à la **figure 15**, le canal ENaC fait entrer du  $\text{Na}^+$  à la membrane apicale, qui sort ensuite du côté basolatéral via la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (**voir section 2.3.2**). La pompe fait également entrer des ions  $\text{K}^+$ , qui sont recyclés par les canaux  $\text{K}^+$  à la membrane basolatérale (22, 36; **voir section 2.3.5**). Des expériences ont montré que l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  par la ouabaine diminue le transport de  $\text{Na}^+$  ainsi que l'absorption de fluide (36). Le transport transépithélial du  $\text{Na}^+$  s'accompagne d'une réabsorption de fluide, qui permet d'éliminer le liquide (7, 23, 31, 36).



**Figure 15. Transport transépithélial alvéolaire.** Modèle schématique du transport ionique dans les cellules alvéolaires de type I (ATI) et de type II (ATII). Les ions  $\text{Na}^+$  entrent passivement par les canaux  $\text{Na}^+$  apicaux et sont expulsés à la membrane basolatérale par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ce qui occasionne parallèlement une entrée d'eau.

Au niveau alvéolaire, le transport ionique via le canal CFTR se fait dans le même sens que celui du canal ENaC. En fait, la réabsorption des fluides se fait dans le but de maintenir une mince couche de liquide qui recouvre l'épithélium alvéolaire afin de permettre le phénomène de l'échange gazeux (2, 15, 19, 20, 24; **figure 15**).

Au niveau des voies aériennes, les canaux CFTR et ENaC se montrent indispensables à la régulation de l'ASL qui recouvre l'épithélium. En effet, le canal CFTR a comme fonction de sécréter du  $\text{Cl}^-$ , ce qui entraîne une sortie d'eau au niveau des



**Figure 16. Transport transépithélial des voies aériennes.** Représentation du transport ionique d'une cellule épithéliale des voies aériennes. Les canaux ENaC et CFTR au niveau de la membrane apicale permettent la régulation du volume du liquide de surface des voies aériennes (ASL).

voies aériennes qui permet l'hydratation de l'ASL. Ce phénomène est contre-balançé par l'activité du canal ENaC, qui permet l'absorption du liquide en parallèle (**voir section 2.3.2; figure 16**). Le travail collectif de ces canaux permet la régulation du volume du PCL et l'hydratation de la couche de mucus, ce qui assure les conditions nécessaires à une bonne clairance mucociliaire (23, 29, 53, 65).

Dans l'épithélium respiratoire, on peut retrouver différents canaux ioniques et pompes qui sont impliqués dans le transport transépithélial. Il existe différents canaux  $\text{Na}^+$ , tels que les canaux hautement sélectifs aux cations (*HSC; highly selective cation channel*) comme ENaC qui sont sensibles à l'amiloride, les canaux non-sélectifs aux cations (*NSC; non-selective cation channel*) qui le sont un peu moins et les canaux dépendants des nucléotides cycliques (*CNG; cyclic nucleotide-gated channel*) qui sont insensibles à l'amiloride (2). Il existe également différents canaux  $\text{Cl}^-$  comme les canaux  $\text{Cl}^-$  à rectification sortante (*ORCC, outwardly rectified chloride channel*), les canaux  $\text{Cl}^-$  (*CLC; chloride channel*) et les canaux  $\text{Cl}^-$  dépendants du calcium (*CaCC; calcium-activated chloride channel*). Pour les besoins de mon étude, j'ai mis l'emphase sur les canaux et pompes les plus importants comme le canal CFTR (**voir section 2.3.1**), le canal ENaC (**voir section 2.3.2**), la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (**voir section 2.3.3**), les aquaporines (**voir section 2.3.4**) ainsi que les canaux  $\text{K}^+$  (**voir section 2.3.5**). Comme nous le verrons, une dysfonction du transport des ions et des fluides peut mener à différentes pathologies pulmonaires, telles que le SRDA (**voir section 2.3.2.4**) et la FK (**voir section 3**).

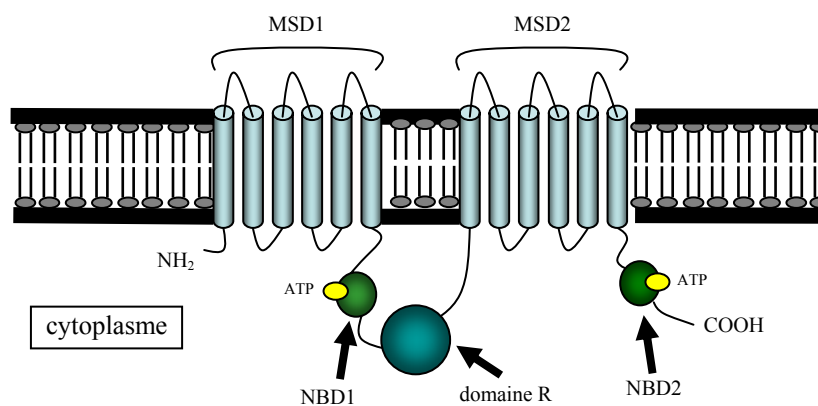
### **2.3.1) Le canal CFTR**

#### **2.3.1.1) Clonage et structure du canal CFTR**

Le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) a été identifié par clonage positionnel en 1989. Le gène codant pour CFTR est situé sur le chromosome 7 et constitué de 27 exons. La protéine CFTR est constituée de 1 480 acides aminés (29, 44, 58). Le canal CFTR fait partie de la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*), connus pour utiliser l'énergie résultante de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement des molécules de part et de d'autre de la membrane (29, 38, 40, 41, 43, 47, 49, 58). On a pensé au départ que la protéine CFTR était un régulateur qui contrôlait le courant  $\text{Cl}^-$  activé par l'AMPC via des interactions protéine-protéines dans

les cellules épithéliales. Ce n'est que suite à de nombreuses expériences d'expression dans des systèmes hétérologues et de mutagenèse dirigée, conduites par différentes équipes et étalées sur plusieurs années, qu'on a eu la confirmation que le CFTR était le canal responsable du courant  $\text{Cl}^-$  dépendant de l'AMPc, qui est dysfonctionnel dans la pathologie de la fibrose kystique (FK) (39, 85-88).

Sa structure se compose de deux domaines transmembranaires (*MSD*, *membrane-spanning domain*), deux domaines de liaison des nucléotides (*NBD*, *nucleotide binding domain*) et d'un domaine régulateur (domaine R). L'arrangement des domaines est, dans l'ordre, MSD1 - NBD1 - domaine R - NBD2 - MSD2 (**figure 17**). Les extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine sont intracytoplasmiques. Il existe également des boucles extra- et intracellulaires reliant les segments transmembranaires.

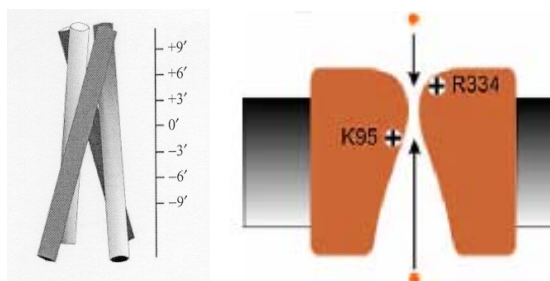


**Figure 17. Structure du canal CFTR.** Le canal CFTR est composé de deux domaines transmembranaires (*MSD*, *membrane-spanning domain*), deux domaines de liaison aux nucléotides (*NBD*, *nucleotide binding domain*) et d'un domaine régulateur (domaine R).

#### 2.3.1.1.1 Domaines transmembranaires (MSD)

Chacun des MSD sont composés de six hélices amphipathiques transmembranaires (38-40, 43, 49). Plusieurs équipes ont cherché à définir l'implication de ces différents segments transmembranaires (TM) dans la structure du pore. Les équipes semblent d'accord sur l'asymétrie du pore (petit vestibule extracellulaire et large vestibule intracellulaire; **figure 18**), mais les avis sont partagés sur le rôle des TM. Les expériences de mutagenèse dirigée des différents groupes révèlent l'implication des TM1,

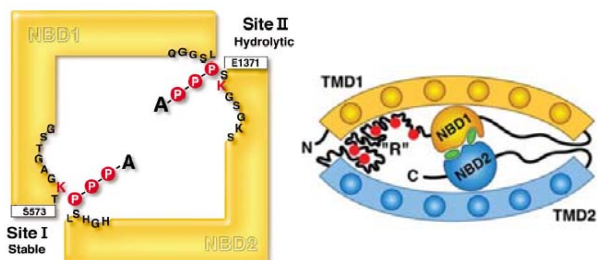
TM5, TM6, TM11 et TM12 dans la formation du pore. Cependant, certaines publications contestent l'importance de certains segments, tels que le TM1 et TM5 (39, 40, 42, 47). Le diamètre de la section la plus étroite du pore est  $\sim 5,3 - 6 \text{ \AA}$ , ce qui implique le passage d'anions, tel que le  $\text{Cl}^-$ . Le large vestibule intracellulaire peut accueillir de gros anions et constitue les sites de liaison de composés pharmacologiques, tels que le glibenclamide et le DPC (42; **figure 18**). Il a été suggéré que la sélectivité du canal CFTR ( $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{acétate} > \text{gluconate}$ ) dépend de la structure intégrale du pore. Il semblerait que les résidus positifs des TM1 et TM6, tels que K95 et R334, joueraient un rôle essentiel dans la perméabilité des anions (39, 40, 42).



**Figure 18. Structure du pore du canal CFTR.** Représentation schématisée de la structure du vestibule intracellulaire et extracellulaire du canal CFTR. (Images tirées de Mc Carty NA *J. Exp Biol.* 2000 et Linsdell *J Biol Chem.* 2005)

### 2.3.1.1.2) Domaines de liaison de l'ATP (NBD)

Les NBD sont des domaines hydrophiles composés de motifs cruciaux pour l'interaction et l'hydrolyse des nucléotides (49). La dimérisation des NBD en un complexe de tête-à-queue est stabilisée par des ponts hydrogènes entre le motif Walker d'un NBD et la séquence signature de l'autre NBD (41). Les extrémités de chacun des deux NBD participeraient alors à la formation de ces deux sites (**figure 19**). Il semblerait qu'à l'interface de liaison de l'ATP, il y aurait un site stable, formé par le motif Walker du NBD1 et de la séquence LSHGH du NBD2, ainsi qu'un site hydrolytique, formé par la séquence LSGGQ du NBD1 et du motif Walker du NBD2 (75).



**Figure 19. Structure du dimère de NBD.** Modèle de la structure tête-à-queue des NBD pour former le site de liaison et d'hydrolyse d'ATP. (Schémas tirés de Riordan JR *Annu Rev Physiol.* 2004)

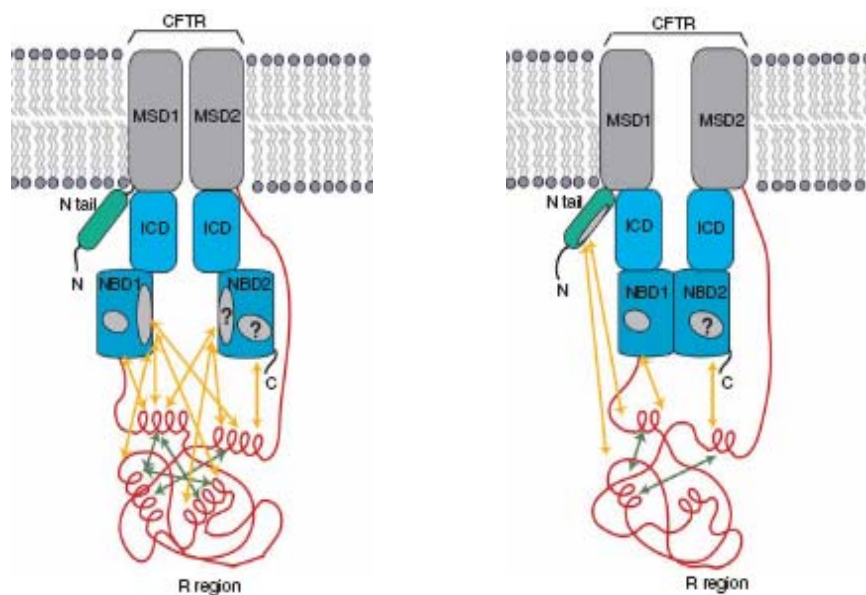
Plusieurs modèles avaient été proposés pour le mécanisme d'ouverture et fermeture du canal CFTR. La plupart des auteurs s'entendent maintenant pour un modèle dit hydrolytique/non-hydrolytique faisant intervenir les sites de liaison de l'ATP stables et instables. Cependant, l'importance de ces sites et la séquence des événements (liaison de l'ATP, hydrolyse, ouverture et fermeture du canal) proposées variait en fonction des auteurs. Un premier modèle proposait que le NBD1, liant de façon stable l'ATP, jouait un rôle d'interrupteur en activant le canal via une hydrolyse minimale d'ATP. Cependant, la majeure partie de la réaction hydrolytique se ferait par le NBD2, permettant la vraie régulation du mécanisme d'ouverture et fermeture du canal (39). Un deuxième modèle suggérait plutôt que l'interaction entre l'ATP et le NBD1 était suffisante pour l'ouverture du canal (74). Malgré les études en cours, le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal demeure encore un phénomène controversé, il semble toutefois de plus en plus évident que le canal ne dépend pas seulement de l'hydrolyse, mais plutôt de la liaison de l'ATP, ce qui en fait un canal ligand-dépendant (*ligand gated channel*).

#### **2.3.1.1.3) Domaine régulateur (domaine R)**

Le domaine R comporte une grande proportion de résidus polaires. En fait, des amas d'acides aminés chargés positivement alternent avec ceux chargés négativement (58). Le domaine R possède plusieurs sites consensus de phosphorylation par les kinases PKA et PKC. Plusieurs études ont conféré le rôle de régulateur au domaine R. En effet, il semblerait que le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal CFTR dépend de l'interaction et/ou l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBD, mais aussi de la phosphorylation des résidus Ser du domaine R (39, 42, 45, 47). Lorsque quelques sites sont phosphorylés, on peut observer une activité modérée du canal, mais celle-ci peut augmenter à mesure que les résidus phosphorylés deviennent de plus en plus nombreux (94). Un équilibre de l'activité des protéines kinases et phosphatases capables de réguler l'état de phosphorylation du domaine R permet de moduler l'activité du canal CFTR (39, 42, 45, 47).

### 2.3.1.2) Mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR

La régulation du mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal CFTR est très complexe. Il a été suggéré que lorsque le canal est inactif, le domaine R interagit fortement avec les NBD empêchant leur interaction. Suite à la phosphorylation du domaine R, les interactions entre les NBD et le domaine R seraient réduites permettant la dimérisation en complexe de tête-à-queue des NBD. Ce phénomène est suivi par la liaison et l'hydrolyse d'ATP, qui mène à l'ouverture du canal. Il a été suggéré que l'interaction des NBD et de l'ATP serait stabilisée par l'extrémité N-terminale du CFTR (94), qui interagirait également avec le domaine R phosphorylé dans le but, pense-t-on, de stabiliser l'état ouvert du canal (94; **figure 20**). En effet, il a été démontré qu'en présence de protéine kinase et d'ATP, la mutation des sites de phosphorylation du domaine R ne perturbait pas l'activité du canal CFTR (58). Cependant, la probabilité d'ouverture du canal était réduite et l'état ouvert du canal ne pouvait pas être stabilisé (94). Ensuite, la formation du complexe dimérique des NBD en interaction avec les nucléotides entraîne des changements de conformation des NBD couplés à ceux des



**Figure 20. Mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal CFTR.** Modèle d'interaction du domaine R avec les NBD et l'extrémité N-terminale dans le mécanisme d'ouverture du canal CFTR. Lorsque le canal est fermé, le domaine R interagit fortement avec les NBD. L'ouverture du canal se fait suite à la dimérisation des NBD dont les interactions avec le domaine R phosphorylé sont réduites. L'extrémité N-terminale permettrait de stabiliser l'état ouvert du canal. (Schéma tiré de Baker et al. *Nat Struct Mol Biol.* 2007)



MSD, qui permettent ainsi l'ouverture du canal (45). De plus, il a été suggéré également que l'extrémité C-terminale serait impliquée dans le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal via l'interaction avec d'autres protéines, telles que la protéine PP2A, l'AMPK et des protéines contenant un domaine PDZ comme le NHERF1, -2, -3, -4 ainsi que le CAL (76). Enfin, on a démontré par des expériences de mutagenèse que l'interaction des NBD avec les boucles intracellulaires était importante dans l'activité du canal CFTR (47).

### **2.3.1.3) Mécanismes de régulation du canal CFTR**

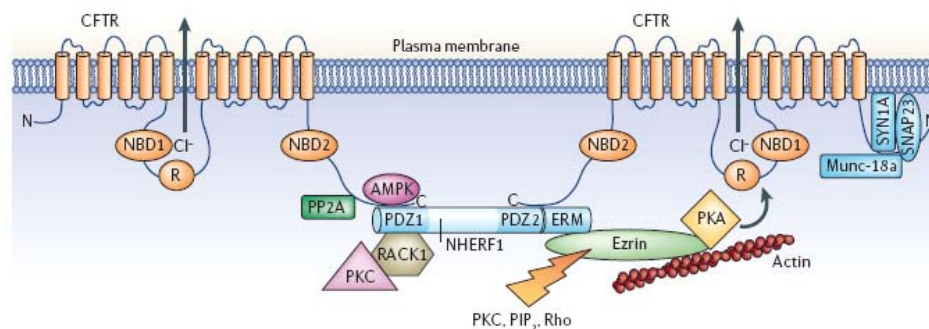
Le canal CFTR se distingue des autres membres de la famille des transporteurs ABC. D'abord, il possède un domaine régulateur, ensuite il ne dépend pas seulement de l'énergie de l'hydrolyse d'ATP pour fonctionner. En effet, la plupart des transporteurs de la famille ABC sont des ATPases, qui utilisent l'énergie résultante de la réaction d'hydrolyse de l'ATP réalisée par leurs NBD. Le CFTR se distingue donc, puisqu'il est bien un canal et non pas un transporteur. Des études récentes *in vitro* ont démontré que le domaine NBD2 du CFTR possédait bien une fonction ATPase, mais également une fonction d'adénylate kinase, qui permettrait au CFTR de ne pas consommer trop d'ATP. Cette enzyme catalyse l'interconversion de désoxyribonucléotide monophosphate (AMP) avec de l'ATP en deux molécules d'ADP et inversement :  $AMP + ATP \Leftrightarrow ADP + ADP$ . Cette réaction favorise la production rapide d'ATP en cas d'excès d'AMP et d'ADP ou en cas de besoin d'énergie intense. La concentration intracellulaire d'AMP permettrait au CFTR de favoriser *in vivo* la réaction catalysée par l'adénylate kinase à l'interface des NBD (91).

Le canal CFTR possède une signature électrophysiologique unique. Sa conductance unitaire est faible et se situe entre 6 - 10 pS (39, 40). Le canal n'est pas voltage dépendant et sa courbe courant-voltage (I/V) est linéaire en condition symétrique de concentration d'ions Cl<sup>-</sup> (39). Le canal CFTR est capable d'interagir avec plusieurs protéines qui peuvent réguler son expression membranaire, son activité et sa stabilité.

La régulation du canal CFTR peut se faire au niveau de l'adressage de la protéine à la membrane. En effet, il a été suggéré que la protéine SYN8, qui interagit avec l'extrémité N-terminale du canal, inhibe le processus d'exocytose et cause alors une

réduction du nombre de canaux à la membrane. Il semble que la protéine CAL, qui lie également l'extrémité N-terminale, serait impliquée dans le recyclage du canal au complexe lysosomal afin d'être dégradé. Ensuite, il a été suggéré que l'extrémité C-terminale serait impliquée dans l'adressage de la protéine à la membrane apicale via l'interaction avec d'autres protéines, telles que les protéines à domaines PDZ. Par exemple, le complexe ezrin-NHERF1-actine qui se lie à l'extrémité C-terminale est essentiel pour une exocytose efficace. Enfin, outre son rôle dans la phosphorylation du domaine R, il aurait été montré que la PKA pouvait induire la dimérisation de CFTR, ce qui réduirait son recyclage à la membrane (76).

Il existe différents mécanismes de régulation de l'activité du canal CFTR dont la régulation par les nucléotides triphosphates extracellulaires comme l'ATP, qui sont nécessaires au mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal (29). Ensuite, il a été suggéré que les protéines NHERF1 et NHERF3, qui aident à la dimérisation et à la stabilisation du canal, pouvaient stimuler sa conductance unitaire et sa perméabilité (76). La régulation de l'activité du CFTR se fait aussi par la PKA responsable de la phosphorylation du domaine R. Ce phénomène est facilité par l'interaction du CFTR avec la protéine NHERF1 associée à l'ezrin (76; **figure 21**). L'activation de la PKA peut se faire par différents activateurs de la PKA et la PKC (44), mais également par une augmentation de la concentration d'AMPc induite par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques (13, 29, 76).



**Figure 21. Phosphorylation du domaine R par PKA.** Complexe protéique impliqué dans le mécanisme de phosphorylation du domaine R par PKA. (Schéma tiré de Guggino & Stanton *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006)

L'activité du canal CFTR est grandement affectée lorsque l'activité de la PKA est bloquée. Ce phénomène peut survenir lors de la diminution d'AMPc occasionnée par l'interaction de la protéine LPA2-R avec le CFTR. La phosphorylation du domaine R par la PKA est diminuée lorsque NHERF1, phosphorylé par la phospholipase C (PLC), n'interagit plus avec le CFTR ou suite à la liaison des protéines SYN1A et SNAP23 sur le canal CFTR. Ces protéines se lient au niveau de l'extrémité N-terminale et bloquent de façon stérique l'interaction de celle-ci avec le NBD1 et le domaine R, qui est nécessaire à la stabilisation de l'état ouvert du canal. Ensuite, l'activité du CFTR peut être inhibée par l'AMPK qui est activée suite à une augmentation du ratio AMP/ATP observée durant un stress énergétique cellulaire. Ensuite, il semblerait que l'interaction entre le CFTR et la protéine PP2A faciliterait la déphosphorylation du domaine R et donc la fermeture du canal (76). Donc l'interaction de différentes protéines avec les extrémités C- et N-terminales du CFTR semble importante dans la modulation de l'état de phosphorylation du domaine R, mais aussi dans l'activité du canal. En résumé, les mécanismes de régulation du canal sont extrêmement complexes, puisque le canal CFTR interagit avec une multitude de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation.

#### **2.3.1.4) Localisation du canal CFTR**

Au niveau de l'épithélium respiratoire, des études ont démontré la présence et l'activité du canal CFTR le long des voies aériennes et dans les alvéoles (2, 14, 15). On a effectivement démontré la présence de l'ARNm de la protéine CFTR dans les bronches, les bronchioles (proximales, terminales et respiratoires) ainsi que dans les alvéoles. En fait, pendant longtemps on a cru que le canal CFTR n'était pas exprimé dans les cellules alvéolaires adultes. Cependant, des études plus récentes, dont celle de Brochiero *et al.* (2004) (109), ont démontré qu'il existait du courant Cl<sup>-</sup> de type CFTR dans les cellules ATI et ATII du rat (2, 3). L'équipe du D<sup>r</sup> Matthay a démontré que le canal CFTR était également exprimé et actif dans les cellules ATII humaines. La fonction du canal CFTR, comme détaillé à la **section 2.3**, n'est pas la même dans l'épithélium des voies aériennes (rôle dans la sécrétion de Cl<sup>-</sup>) que dans les alvéoles (rôle dans la réabsorption). La protéine membranaire CFTR, située au pôle apical des cellules épithéliales, est essentielle dans la régulation du volume de l'ASL via le transport ionique (2, 15, 29, 56; **figure 16**).

Son expression se retrouve non seulement au niveau des épithélia de surface, mais aussi dans les cellules séreuses des glandes sous-muqueuses (11, 12, 29). On a également suggéré qu'en plus du  $\text{Cl}^-$ , le canal CFTR était capable de transporter du  $\text{HCO}_3^-$  au niveau de l'épithélium glandulaire du cochon. Son rôle est donc important pour la sécrétion de liquide afin d'humidifier le mucus sécrété par ces cellules (12, 81).

### **2.3.1.5) Fonctions du canal CFTR**

Le canal CFTR est important (comme expliqué à la **section 2.3**) tout au long du développement fœtal et la vie adulte. En effet, le transport de  $\text{Cl}^-$  est indispensable au développement des tissus pulmonaires durant la gestation (2), à la régulation de l'ASL au niveau des voies aériennes (22, 23, 29, 53, 65) et à la clairance des fluides dans les alvéoles (7, 23, 31, 36). Il a aussi été démontré que le canal CFTR, exprimé à la membrane d'organelles, telles que les lysosomes et l'appareil de Golgi, pouvait réguler le pH. En effet, il y a une entrée de protons ( $\text{H}^+$ ) lors du processus d'acidification des organelles, important pour plusieurs réactions biochimiques. L'entrée d'ions  $\text{Cl}^-$  permet de rétablir la neutralité électrique des organelles lors de l'accumulation lumenale de  $\text{H}^+$  (58). La perte de fonction du canal CFTR peut avoir de graves conséquences au niveau de différents tissus et organes. Les répercussions de la mutation du canal CFTR dans la fibrose kystique seront exposées et détaillées à la **section 3**.

Il a été suggéré que CFTR jouait un rôle de régulateur de plusieurs canaux ioniques, tels que le canal ENaC, le canal  $\text{Cl}^-$  à rectification sortante ORCC, les aquaporines, les canaux  $\text{K}^+$  et possiblement l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (29, 44, 45, 50, 58). Cette idée est apparue en grande partie à cause des observations au niveau des différentes conductances ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , etc.) qui sont altérées dans les cellules fibrose kystique (FK) où le canal CFTR est dysfonctionnel ou absent (170). La possibilité que le CFTR soit alors le régulateur commun de plusieurs canaux ioniques devenait un concept très attrayant. La relation la plus étudiée est celle de l'interaction entre ENaC et CFTR. Il avait été suggéré que le CFTR et ENaC interagissaient directement et que le CFTR aurait une influence négative puisque l'absence de CFTR dans la FK est accompagnée d'une hyperabsorption de  $\text{Na}^+$  (16, 24, 52, 53, 58). Cependant, il a été démontré que dans certains types cellulaires exprimant à la fois les canaux CFTR et ENaC, il ne semblait pas

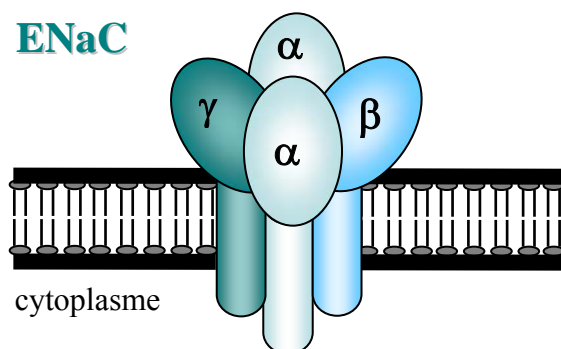
y avoir de régulation négative d'ENaC par CFTR (44). Ensuite, l'activité du canal ORCC et des aquaporines (AQP; **voir section 2.3.4**) semblerait être régulée à la hausse par le canal CFTR (16, 29, 44, 50, 58). Enfin, il a été suggéré que le CFTR pourrait réguler les canaux  $K^+$  (44, 50) et l'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  (16). Cependant, l'idée que le canal CFTR pourrait réguler tous ces autres canaux par interaction directe est très controversée. Il serait alors plus juste de penser que le changement du gradient électrochimique en lien avec des changements de fonctions du canal CFTR pourrait réguler l'activité de certains canaux.

En résumé, le canal CFTR, qui est indispensable à certains phénomènes biochimiques, au maintien de l'hydratation de l'ASL au niveau de l'épithélium des voies aériennes et à la clairance alvéolaire, est essentiel au maintien du transport ionique. La pathologie de la FK, dans laquelle le canal CFTR est absent ou non-fonctionnel, confirme l'importance du transport ionique médié par celui-ci dans plusieurs tissus et organes (**voir section 3**).

## **2.3.2) Le canal ENaC**

### **2.3.2.1) Structure du canal ENaC**

Le canal ENaC (*epithelial  $Na^+$  channel*), cloné pour la première fois en 1994, est sensible à l'amiloride (77). Le canal ENaC est constitué des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  dans un ratio de 2 : 1 : 1 respectivement pour former un tétramère (**figure 22**). La présence de toutes les sous-unités est indispensable à la fonction maximale du canal (6-8, 10, 19, 36). Des expériences ont démontré que l'expression génique des sous-unités du canal ENaC variait le long du système respiratoire. En fait, l'ARNm des sous-unités a été détecté à la membrane apicale de l'épithélium nasal, trachéal et bronchique ainsi que dans les cellules



**Figure 22. Structure du canal ENaC.** Le canal est constitué des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  dans un ratio de 2 : 1 : 1 respectivement pour former un tétramère. (Schéma inspiré du modèle de Firsov D et al. 1998)

alvéolaires (5, 6, 36). L'expression des sous-unités varie également pendant le développement des poumons. En effet, durant le développement embryonnaire l'expression de la sous-unité  $\beta$  augmente progressivement alors que l'expression de la sous-unité  $\alpha$  augmente abruptement au moment de la naissance (7).

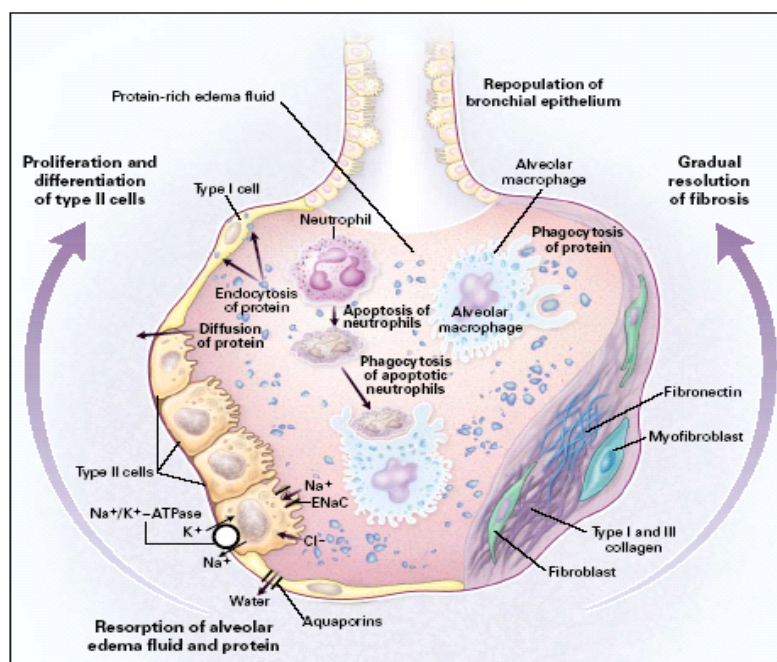
### **2.3.2.2) Régulation du canal ENaC**

La régulation de l'activité et de l'expression du canal ENaC est très complexe. Les glucocorticoïdes et l'hormone de la thyroïde ont été reconnus pour moduler l'expression génique du canal ENaC, de la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  de même que la clairance des fluides dans les poumons chez des animaux adultes (24). Il a également été démontré chez le rat que des agonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques pouvaient augmenter la clairance des fluides lors du phénomène d'œdème pulmonaire via le transport de  $\text{Na}^+$  épithélial alvéolaire. L'expression membranaire d'ENaC dépend aussi fortement du contrôle de sa dégradation et son adressage à la membrane via un système d'ubiquitination. L'activité du canal ENaC peut également être régulée par la protéine CAP (*CFTR associated protein*), par l'AMPc qui augmente la probabilité d'ouverture ou le nombre de canaux à la membrane, par l'ATP qui interagit avec les récepteurs  $\text{P2Y}_2$  et par des protéases qui modulent la concentration extracellulaire de  $\text{Na}^+$  (19).

### **2.3.2.3) Fonctions du canal ENaC**

Les fonctions du canal ENaC varient tout au long du développement fœtal jusqu'à la vie adulte. Le rôle du canal ENaC dans la clairance des fluides au niveau alvéolaire, dès la naissance, est d'éliminer l'accumulation de liquide dans les alvéoles, ce qui permet l'échange gazeux. Suite à des lésions à la barrière épithéliale-endothéliale lors de pathologies, telle que le SRDA, des œdèmes pulmonaires peuvent survenir. Chez certains patients, les œdèmes peuvent être résorbés rapidement grâce à l'activité du canal ENaC et l'épithélium peut être réparé afin de rétablir la fonction respiratoire (**figure 23**). Cependant, lorsque l'atteinte est plus sévère, même la stimulation de l'activité d'ENaC n'est pas suffisante. Alors lorsque l'œdème persiste, il y a une destruction considérable des tissus, une infiltration de cellules immunes causant une réponse inflammatoire ainsi que le développement d'une fibrose ce qui mène à une perte progressive de la fonction

respiratoire. Pour l'instant, la combinaison de traitements, tels que la ventilation, les vasodilatateurs et les traitements anti-inflammatoires, vise à améliorer l'état des patients en ciblant différents aspects de la pathologie (32). Cependant, il y a des études en cours, qui sont consacrées à trouver des stratégies afin d'augmenter la clairance des fluides et de promouvoir la réparation de l'épithélium alvéolaire pour rétablir la fonction pulmonaire (19, 36).



**Figure 23. Modèle de résorption d'œdème pulmonaire par ENaC.** L'œdème pulmonaire peut être résorbé grâce à l'activité du canal ENaC. L'épithélium alvéolaire peut ensuite être réparé via la prolifération et la différenciation des cellules alvéolaires de type II (ATII) afin de rétablir la fonction respiratoire. (Schéma tiré de Ware & Matthay *New England J Med.* 2000)

En bref, un contrôle fin et adéquat du canal ENaC est indispensable au bon fonctionnement du transport ionique, qui contrôle d'autres phénomènes vitaux, tels que la survie du nouveau-né par l'adaptation des poumons au moment de la naissance, le rétablissement de la fonction respiratoire par la clairance des fluides lors d'œdèmes pulmonaires par l'épithélium alvéolaire ainsi qu'une clairance mucociliaire efficace par l'homéostasie des fluides de l'épithélium des voies aériennes.

### **2.3.3) La pompe $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$**

La pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  est une protéine généralement située à la membrane basolatérale des cellules et est composée de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  possède l'activité catalytique. En effet, elle permet l'entrée de  $\text{K}^+$  et la sortie de  $\text{Na}^+$  suite à l'hydrolyse de l'ATP, utilisé comme source d'énergie. La sous-unité  $\beta$ , hautement glycosylée, semble avoir un rôle de régulateur (19, 24, 36). L'activité de la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  peut être régulée par un changement de concentration de  $\text{Na}^+$  intracellulaire tandis que sa sous-unité  $\beta$  semble pouvoir être régulée par les corticostéroïdes (36). Il existe également une modulation de l'adressage de la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  à la membrane cellulaire (19). La pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  crée un gradient électrochimique favorable pour l'activité du canal ENaC de la membrane apicale, ce qui occasionne une absorption de fluide (22, 36).

### **2.3.4) Les aquaporines**

Pendant longtemps, on a pensé que l'eau traversait de façon passive à travers la barrière épithéliale. Le Dr Peter Agre a découvert en 1991, l'existence d'une protéine perméable à l'eau et à d'autres petites molécules à la surface des globules rouges. Les aquaporines (AQP), formées de six segments transmembranaires et de 2 boucles avec le motif NPA (Asp-Pro-Ala), sont assemblées en tétramères. Un des monomères est glycosylé et chacun d'entre eux possède un pore de petite taille et de composition en acides aminés spécifique, ce qui leur confère leur sélectivité pour l'eau. En effet, des résidus chargés positivement du pore repoussent les cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , etc.) alors que des résidus Asp réorientent les molécules d'eau en empêchant la formation de ponts hydrogènes et donc l'entrée de protons ( $\text{H}^+$ ). Quatre types d'aquaporines sont exprimés dans le poumon : AQP1 dans l'endothélium microvasculaire et dans les cellules alvéolaires, AQP3 dans les cellules basales du nasopharynx, de la trachée, les voies aériennes et les cellules ATII, AQP4 au niveau de la membrane basolatérale de l'épithélium des voies aériennes et AQP5 au niveau de la membrane apicale des cellules ATI (19, 24, 36). Toutefois, des expériences ont montré que l'absence de l'expression des AQP affectait peu ou pas la perméabilité à l'eau de l'épithélium et les processus de

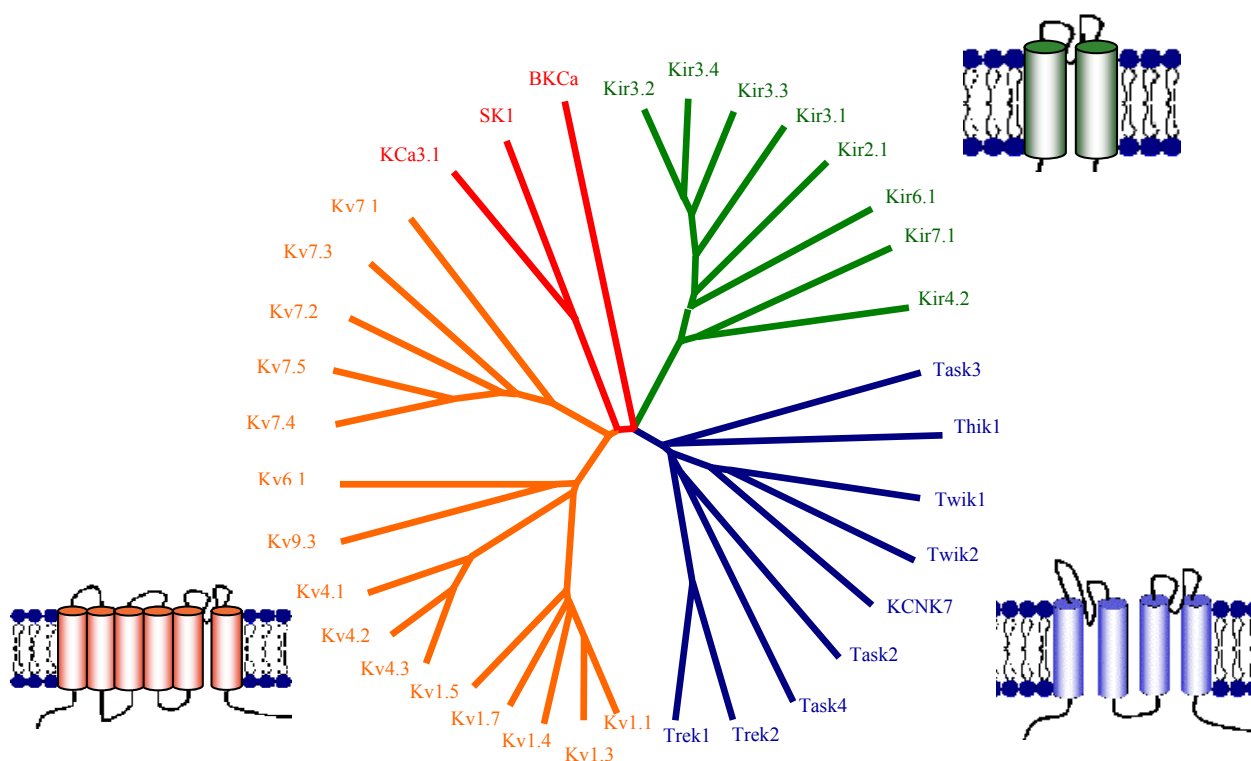


clairance des fluides (19, 24). Leur rôle précis et leur mode de régulation demeurent encore mal connus pour l'instant.

### 2.3.5) Les canaux $K^+$

#### 2.3.5.1) Classes de canaux $K^+$

Le premier canal  $K^+$  à avoir été cloné est le *shaker* de la drosophile en 1987 (95). Depuis, plus de 100 canaux  $K^+$  différents ont été détectés, identifiés et regroupés en 3 classes en accord avec leur nombre prédit de segments transmembranaires (STM; **figure 24**). La première classe à 6 STM regroupe les canaux dépendants du voltage (Kv) et activés par le calcium (KCa). La seconde comprend les canaux à 4 STM et 2 pores, alors que les canaux à 2 STM et à rectification entrante (Kir) composent la troisième classe. On retrouve les transcrits de plus de 30 canaux  $K^+$  différents dans l'épithélium respiratoire



**Figure 24. Diversité moléculaire des canaux  $K^+$  de l'épithélium respiratoire.** Les canaux sont regroupés en trois principales classes. La première classe à 6 segments transmembranaires (STM) regroupe les canaux dépendants du voltage (Kv) et activés par le calcium (KCa) [en orange]. La seconde classe comprend les canaux à 4 STM et 2 pores (en vert) et la troisième classe se compose des canaux à 2 STM et à rectification entrante (Kir) [en bleu].

auxquels s'ajoutent les différentes sous-unités  $\alpha$ , qui forment les pores et les sous-unités  $\beta$  régulatrices (**figure 25**). Cette grande diversité moléculaire des canaux  $K^+$  rend leur étude fonctionnelle ardue.

#### **2.3.5.1.1) Canaux $K^+$ Kv et KCa**

Parmi les canaux Kv à 6 STM, seul le canal KvLQT1 a été clairement caractérisé à l'échelle génique, protéique et fonctionnelle dans le poumon (**figure 25**). Il est exprimé tout le long des voies aériennes (96-99), ainsi que dans les cellules alvéolaires (100). Ce canal serait associé à des sous-unités  $\beta$  MiRP (98) exprimées dans le poumon. Ce canal de petite conductance ( $<3$ pS), activé par l'AMPC, participe pour une large part au courant  $K^+$  basolatéral mesuré en chambre de Ussing, mais il pourrait également être exprimé à la membrane apicale (101).

On retrouve plusieurs autres canaux Kv, dont Kv1.1, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, 4.1, 4.2, 4.3, 6.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 et 9.3, ainsi que les sous-unités régulatrices Kv $\beta$ 1 et 2, KchIP-2 et -3, pour la plupart localisés au niveau de la membrane apicale et possiblement impliqués dans la sécrétion de  $K^+$  (101-103; **figure 25**). Du point de vue fonctionnel, deux types de courants Kv ont été détectés dans les cellules ATII. Le plus fréquent de type-*n*, à 12 pS, sensible à la 4-aminopyridine, est activé par des potentiels de -40 à -20 mV. Le second de type-*l*, activé par des potentiels plus élevés (-20 à -10 mV), est probablement peu actif au potentiel de repos des cellules épithéliales (-40mV) (104).

Deux canaux KCa fonctionnels, soit KCa3.1 et BKCa, ont été mis en évidence au niveau du poumon (**figure 25**). Le canal KCa3.1, à conductance intermédiaire, activé par les composés de type 1-EBIO, est présent depuis les cellules épithéliales nasales jusqu'aux alvéoles (98-100, 105-109). Des courants BKCa, de large conductance, ont été également détectés dans les cellules A549 (110) et nasales, saines ou fibrose kystique (111).

#### **2.3.5.1.2) Canaux $K^+$ à 4 STM et 2 pores**

Plusieurs canaux à 4 STM et 2 pores, comme Twik1, -2, Trek1, -2, Task2, -3, -4, Thik1 et KCNK7 ont été détectés dans la lignée adénocarcinome pulmonaire humain H441 souvent utilisée comme modèle d'épithélium de réabsorption (115). La localisation

Nom	gène	locus	Type cellulaire	Évidence
<b>Canaux dépendants du voltage et 6 STM</b>				
KvLQT1	KCNQ1	11p15.5	Nasales (wt/Fk), trachée, calu3, 16HBE, ciliées bron <sup>ioles</sup> term, NuLi, CuFi, ATII	A <sup>(a,b)</sup> P <sup>(f)</sup> F <sup>(h)</sup>
Kv1.1	KCNA1	12p13.32	ATII (ap)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup>
Kv1.3	KCNA3	1p13.3	ATII (ap)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup>
Kv1.4	KCNA4	11p14	ATII (ap)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup>
Kv1.5	KCNA5	12p13	poumon	A
Kv1.7	KCNA7	19q13.3	poumon	A
Kv4.1	KCND1	Xp11.23	ATII	A <sup>(a)</sup>
Kv4.2	KCND2	7q31	ATII (ap)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup>
Kv4.3	KCND3	1p13.3	ATII (ap)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup>
Kv6.1	KCNG1	20q13	poumon	A
Kv9.3	KCNS3	2p24	ATII, A549	A <sup>(a)</sup>
KChIP2	KCNIP2	10q24	ATII	A <sup>(a)</sup>
KChIP3	KCNIP3	2q21.1	ATII	A <sup>(a)</sup>
<b>Canaux activés par le calcium et 6STM</b>				
SK1	KCNN1	19q13.1	16HBE, nasales (wt/Fk)	A <sup>(a)</sup> F <sup>(g,h)</sup>
KCa3.1	KCNN4	19q13.2	Nasales (wt/Fk), trachée, calu3, 16HBE (ap, bas), HBE primaires, NuLi (ap, bas), CuFi, A549, ATII	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup> F <sup>(g,h)</sup>
BKCa	KCNMA1	10q22.3	Nasales (wt/Fk), A549	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d)</sup> F <sup>(g,h)</sup>
<b>Canaux à rectification entrante et 2 STM</b>				
Kir2.1	KCNJ2	17q23-1q24.2	ATII foetal, RERF-LC-MA	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d)</sup> F <sup>(g)</sup>
Kir3.1 GIRK1	KCNJ3	2q24.1	WBA, H69, H146, A549, H727, H2170, H226, H520	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d)</sup>
Kir3.2 GIRK2	KCNJ6	21q22.13-q22.2	WBA, H69, H209, H526, A549, H727, H520	A <sup>(a)</sup>
Kir3.3 GIRK3	KCNJ9	1q21-q23	SAEC, WBA, H69, H146, H187, H209, H526, A549, H727, H2170, H226, H520	A <sup>(a)</sup>
Kir3.4 GIRK4	KCNJ5	11q24	SAEC, WBA, H69, H146, H187, H209, H526, A549, H727, H2170, H226, H520	A <sup>(a)</sup>
Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	NuLi	A <sup>(a)</sup>
Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	poumon, ATII, NuLi, CuFi, A549, H460	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d)</sup> F <sup>(h)</sup>
Kir7.1	KCNJ13	2q37	poumon	A <sup>(c)</sup>
<b>Canaux à 2 pores et 4 STM</b>				
Twik 1	KCNK1	1q42-q43	H441, calu3	A <sup>(a)</sup> F <sup>(h)</sup>
Twik 2	KCNK6	19q13.1	H441, calu3 (mb)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup> F <sup>(h)</sup>
Trek 1	KCNK2	1q41	H441, calu3 (mb)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup> F <sup>(h)</sup>
Trek 2	KCNK10	14q31	H441	A <sup>(a)</sup> F <sup>(h)</sup>
Task 2	KCNK5	6p21	H441, calu3 (vésicules)	A <sup>(a)</sup> P <sup>(d,e)</sup> F <sup>(h)</sup>
Task 3	KCNK9	8q24.3	H441	A <sup>(a)</sup> F <sup>(h)</sup>
Task 4	KCNK17	6p21.2-p21.1	H441	A <sup>(a)</sup> F <sup>(h)</sup>
Thik 1	KCNK13	14q31-q32	H441	A <sup>(a)</sup> F <sup>(g)</sup>
KCNK7	KCNK7	11q13	H441	A <sup>(a)</sup> F <sup>(h)</sup>

**Figure 25. Tableau descriptif des canaux K<sup>+</sup> de l'épithélium respiratoire.** Le tableau regroupe les trois principales classes des canaux K<sup>+</sup> de l'épithélium pulmonaire. Le gène et le locus des canaux ainsi que leur expression tissulaire sont indiqués. Les canaux K<sup>+</sup> ont été mis en évidence par différentes techniques: A niveau génique P: protéique F: fonctionnel. Les approches expérimentales employées sont également précisés : (a) : PCR; (b) : hybridation *in situ*; (c) : northerblot; (d) : immunoblot; (e) : immunohistochimie; (f) : immunofluorescence; (g) : patch-clamp; (h) : ussing. (figure adaptée du manuscrit Bardou O et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009)

cellulaire des canaux à 4 STM et 2 pores a été également étudiée dans les cellules sous-muqueuses des voies aériennes humaines Calu3. Il semble que les canaux Twik1, -2 et Trek1 se retrouveraient au niveau de la membrane (Twik1 à la membrane apicale), alors que Task2 serait localisé seulement dans des vésicules intracellulaires (116; **figure 25**).

### **2.3.5.1.3) Canaux K<sup>+</sup> Kir**

On a détecté plusieurs canaux Kir à 2 STM au niveau de l'épithélium respiratoire (**figure 25**). L'identité ainsi que les propriétés fonctionnelles des canaux Kir6.1 et Kir2.1 ont été mises en évidence. Le canal K<sub>ATP</sub>, formé du Kir6.1 et de la sous-unité SUR2B, est exprimé dans les cellules ATII (109), ainsi que dans les lignées de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain A549 (modèle de cellules alvéolaires) et de carcinome pulmonaire à larges cellules H460 (résultats non publiés). Pour ce qui est du Kir2.1, il a été identifié dans les cellules ATII fœtales (112). Les transcrits géniques de plusieurs autres canaux Kir ont été détectés mais leur fonctionnalité n'a pas encore été établie, tels que le Kir4.2 exprimé dans les cellules bronchique saines NuLi, (données non publiées), le Kir7.1 exprimé dans l'extrait de poumon total (113), ainsi que les Kir3.1, 3.2, 3.3 et 3.4 (ou GIRK1, 2, 3 et 4) exprimés dans les lignées tumorales pulmonaires (114).

### **2.3.5.2) Fonctions des canaux K<sup>+</sup>**

Les canaux K<sup>+</sup> semblent avoir un rôle important au niveau du poumon. En effet, ils semblent impliqués dans plusieurs phénomènes cruciaux pour la physiologie pulmonaire, tels que le processus d'échange gazeux, la sécrétion de surfactant indispensable pour le maintien de la stabilité alvéolaire, les processus de réparation, la réponse inflammatoire et le transport ionique.

#### **2.3.5.2.1) Échange gazeux**

Comme expliqué précédemment, la fonction principale des poumons est de permettre les échanges gazeux. Les trois principaux systèmes de détection de la pression partielle d'oxygène (PO<sub>2</sub>) sont les cellules neuro-épithéliales pulmonaires (*NEB; neuro-epithelial bodies*), localisées dans l'épithélium des voies aériennes, le corpuscule

carotidien ainsi que le muscle vasculaire lisse (117). Cependant, il semblerait que différents types de canaux  $K^+$ , dont TASK (117), BKCa (120) et différents Kv (118, 119) soient sensibles au niveau d' $O_2$ . Une phase d'hypoxie entraînerait l'inhibition de ces canaux et une dépolarisation membranaire causant la sécrétion des transmetteurs impliqués dans la réponse ventilatoire via un influx de  $Ca^{2+}$  (117, 119). Ce phénomène de détection d' $O_2$  par les canaux  $K^+$  est encore mal connu. Il avait été proposé que le canal BKCa pourrait détecter directement les changements d' $O_2$  (120). Toutefois, la sensibilité à l' $O_2$  pourrait ne pas être intrinsèque au canal mais plutôt dépendre d'autres molécules, telles que les espèces réactives de l' $O_2$  (ROS) produites par la NADPH oxydase et/ou la mitochondrie (117, 119). Les canaux  $K^+$  sensibles à l' $O_2$  pourraient donc contribuer à la fonction d'adaptation du poumon à son environnement. Leur altération pourrait alors entraîner le développement de pathophysiologies pulmonaires (119).

#### **2.3.5.2.2) Stabilité alvéolaire**

Comme détaillé à la **section 2.1**, le surfactant sécrété par les cellules ATII assure la stabilité alvéolaire. Il a été montré que le processus d'exocytose du surfactant par les corps lamellaires des cellules ATII dépend fortement du signal  $Ca^{2+}$  (121). Cependant, cet influx de  $Ca^{2+}$  semble dépendant de deux mécanismes : le gradient de  $H^+$  et le transport de  $K^+$  par des canaux KCa (122). Les canaux  $K^+$  pourraient donc participer au contrôle de la sécrétion du surfactant. Toutefois, cette hypothèse reste à vérifier, compte tenu que peu d'études ont été effectuées sur ce sujet.

#### **2.3.5.2.3) Réparation épithéliale**

La réparation épithéliale (**voir section 2.2.3**), nécessaire afin de rétablir la fonction des poumons, fait appel à plusieurs processus dont l'étalement des cellules, une dédifférenciation, une migration des cellules saines vers le site de la lésion, puis une prolifération, suivie d'une redifférenciation cellulaire. Il semble que les canaux  $K^+$  pouvaient réguler les processus de migration et prolifération cellulaires, mais les mécanismes de contrôle ne sont pas encore totalement élucidés. Toutefois, il semble que des changements du  $[Ca^{2+}]_i$  et du volume cellulaire, secondaires aux efflux de  $K^+$ , puissent être des signaux de prolifération (123). Il semblerait également que l'inhibition

de l'efflux de  $K^+$  empêche l'hyperpolarisation membranaire transitoire nécessaire à la progression du cycle cellulaire de la phase G0/G1 en phase S (146). Il a été suggéré que certains canaux  $K_v$  et ATP-sensibles seraient impliqués dans la phase G1 ou au point de contrôle G1/S (148-150). Il a aussi été démontré que l'utilisation d'un antagoniste des canaux  $K_v$  pouvait réguler à la baisse la cycline A/cycline D et stimuler les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes, stoppant ainsi le cycle cellulaire (145, 150). D'autre part, l'efflux de  $K^+$ , suivant l'activation de canaux  $K^+$ , a été identifié comme un des premiers événements du phénomène d'apoptose. La diminution du volume cellulaire, la déplétion en  $[K^+]_i$  et/ou l'activation de médiateurs pro-apoptotiques subséquents pourraient ensuite activer des caspases et endonucléases. Cependant, on ignore s'il existe un lien direct ou des facteurs intermédiaires entre ces phénomènes (123). D'un autre côté, l'équipe du Dr Schwab propose un modèle où l'efflux de  $K^+$  par les canaux  $KCa3.1$ , activés par une élévation du  $[Ca^{2+}]_i$ , favorise la rétraction du pôle de la cellule en migration (135). Ainsi les canaux  $K^+$ , impliqués dans les processus de prolifération et migration, mais aussi d'apoptose, pourraient jouer un rôle très complexe dans l'équilibre entre ces phénomènes importants pour l'intégrité de l'épithélium respiratoire.

#### **2.3.5.2.4 Réponse inflammatoire**

Il a été montré que l'inflammation pouvait moduler les canaux  $K^+$ . Toutefois, son effet est variable : les courants  $K_{ATP}$  (et l'expression de  $Kir6.1$ ) sont stimulés dans le colon inflammé (125), alors que la probabilité d'ouverture des canaux  $BKCa$  des cellules musculaires lisses est réduite à la suite d'une inflammation (126). Les médiateurs inflammatoires régulant les canaux  $K^+$  ne sont pas clairement définis, mais il a été établi que l'interleukine-13 (IL-13) stimule le courant  $KCa3.1$  dans les cellules bronchiques NHBE (108), tandis que le facteur de nécrose tumorale (TNF) augmente les efflux de  $K^+$  via le canal  $K_{ATP}$  dans les cardiomyocytes (127).

Inversement, les canaux  $K^+$  pourraient intervenir dans la réponse inflammatoire. En effet, leur inhibition réduit la production de TNF par les macrophages alvéolaires stimulés au lipopolysaccharides bactériens (LPS) (128). D'autre part, le glibenclamide, un inhibiteur du canal  $K_{ATP}$ , est capable de limiter l'infiltration neutrophilique et de diminuer les niveaux de TNF et IL-6 dans l'intestin et le poumon dans un modèle

d'ischémie-reperfusion (129). L'équipe du D<sup>r</sup> Cruse a également montré que l'inhibition des canaux KCa3.1 pourrait réduire l'infiltration des mastocytes, élément clé de la réponse inflammatoire chez les patients asthmatiques (130). Ainsi, un lien réciproque entre l'activité des canaux K<sup>+</sup> et la réponse inflammatoire pourrait exister et mériterait d'être exploré plus en profondeur.

#### **2.3.5.2.5) Contrôle du transport transépithélial ionique et liquidien**

Une régulation adéquate du transport ionique et liquidien est nécessaire à la physiologie du poumon comme expliqué à la **section 2.3**. Comme l'illustre le modèle schématique du transport alvéolaire (**figure 15**), les ions Na<sup>+</sup> entrent passivement par les canaux Na<sup>+</sup> apicaux, puis sont expulsés à la membrane basolatérale par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Les ions K<sup>+</sup> sont recyclés par des canaux K<sup>+</sup>, qui sont responsable du maintien du potentiel de membrane et d'un gradient électrochimique favorable au transport des ions et des fluides. Le laboratoire du D<sup>re</sup> Brochiero a démontré que les canaux KvLQT1, K<sub>ATP</sub> et KCa3.1 régulent le transport alvéolaire de Na<sup>+</sup> et de Cl<sup>-</sup> (100, 109). De façon intéressante, il a été démontré que la modulation des canaux K<sup>+</sup> régule l'expression des canaux ENaC et CFTR et a un impact physiologique sur la réabsorption liquidienne. La nature du mécanisme de couplage reliant l'activité des canaux K<sup>+</sup> à l'expression d'ENaC et CFTR est encore inconnue, mais des changements de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> ou du rapport [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> pourraient influencer leurs facteurs de transcription (100). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Sakuma *et al.*, qui montre que l'activation du canal K<sub>ATP</sub> augmente la clairance alvéolaire dans le poumon humain *ex vivo* (131). Il serait maintenant intéressant d'évaluer la capacité des modulateurs des canaux K<sup>+</sup> à faciliter la résorption d'un œdème pulmonaire.

En ce qui concerne les voies aériennes, plusieurs mécanismes de transport ionique participent à la sécrétion de Cl<sup>-</sup>, tels que les canaux Cl<sup>-</sup> (dont CFTR), la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, le cotransporteur Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (**figure 16**). Les canaux KvLQT1 et KCa3.1 constituent aussi des éléments clés du transport de Cl<sup>-</sup>. En effet, leur inhibition réduit fortement la sécrétion de Cl<sup>-</sup> par les cellules des voies aériennes (96, 98, 105, 107). Inversement, l'activation des canaux KCa3.1 stimule la sécrétion de Cl<sup>-</sup> (105, 107).

### **2.3.5.3) Régulation des canaux K<sup>+</sup>**

Les canaux K<sup>+</sup> exprimés de l'épithélium respiratoire sont très variés et possèdent des propriétés électrophysiologiques très différentes. En effet, on peut retrouver des conductances très variables, comme par exemple le canal KvLQT1 de conductance très faible (<3 pS) par opposition certains canaux maxi-KCa pouvaient présenter des conductances aussi élevés que >200 pS. Les mécanismes de régulation sont propres à chaque canal ou type de canal. En effet, le canal KCa peut être régulé par le Ca<sup>2+</sup> et le ratio ATP/AMP, le canal K<sub>ATP</sub> est sensible au ratio ATP/ADP, alors que l'activité du canal KvLQT1 est dépendante de l'AMPc. Enfin, les canaux K<sup>+</sup> ne possèdent pas tous la même fonction et ne sont pas tous régulés de la même façon, ce qui rend cette diversité moléculaire aussi fascinante et intéressante pour la physiologie pulmonaire.



### **3) Pathologie de la fibrose kystique**

#### **3.1) Incidence de la maladie**

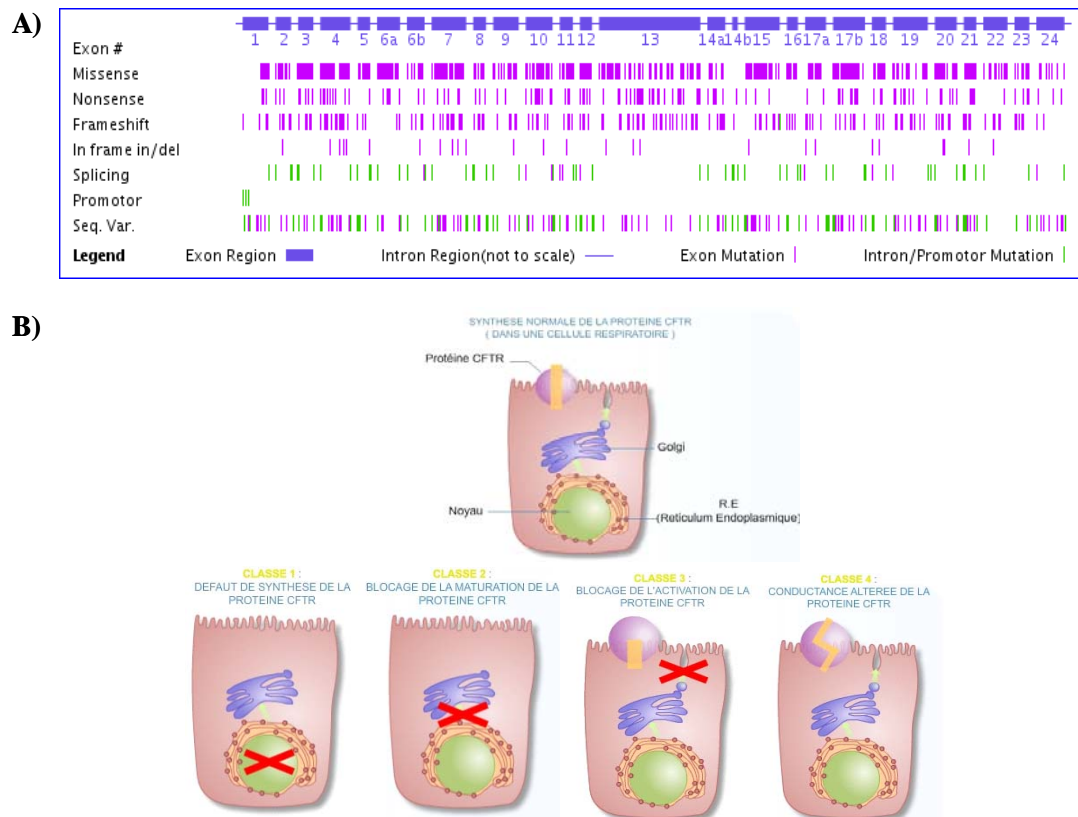
La fibrose kystique (FK) est la maladie génétique la plus répandue dans la population Caucasienne. Dans les nations européennes et américaines, l'incidence de la maladie est en moyenne de 1 cas sur 2500 (11, 48, 55, 58). Toutefois, l'incidence varie en fonction de la région géographique : dans le nord de l'Europe, par exemple, l'incidence de la maladie est de 1 cas sur 1700 en Irlande et 1 sur 7700 en Suède, alors que la fréquence des porteurs de la maladie est de 1 sur 20 et 1 sur 44, respectivement (57).

C'est en 1936 que le pédiatre suisse D<sup>r</sup> Guido Fanconi a décrit pour la première fois cette pathologie et le canal CFTR y a été associé en 1985. En effet, l'équipe du D<sup>r</sup> Quinton a noté que la différence entre les cellules saines et FK était un courant Cl<sup>-</sup> activé par l'AMPc. Le canal a été cloné pour la première fois en 1989 (73). Les manifestations cliniques (**voir sections 3.3 et 3.4**) les plus souvent rencontrées sont l'obstruction pulmonaire chronique, la déficience pancréatique, l'obstruction intestinale distale, l'infertilité masculine et l'augmentation de teneur en sel dans la sueur. Celles-ci sont causées par une dysfonction du transport ionique au niveau de l'épithélium et des glandes exocrines respectivement au niveau des poumons, du pancréas, du petit intestin, du système reproducteur et des glandes sudoripares, qui mène à une accumulation de mucus déshydraté, épais et visqueux qui recouvre l'épithélium (44, 48, 57, 58; **voir section 3.4.1**). Ce n'est en 1989 que le gène *cftr*, associé à la pathologie, a été identifié pour la première fois. En fait, cette maladie autosomale récessive est monogénique puisqu'elle est causée par la mutation d'un seul gène, soit celui qui code pour le canal CFTR (44, 55-57, 68). Il existe 4 classes de mutations qui seront détaillées à la **section 3.2** (57). La mutation la plus fréquente, qui constitue ~70 % des cas, est la délétion du résidu Phe508 [ $\Delta$ F508] (50, 55, 56, 58). La fréquence de cette mutation est de 90 % au Danemark, 25 % en Roumanie, 18,8 % en Turquie et 68 % au Canada (56-58). Les mutations les plus communes après  $\Delta$ F508 sont G542X et G551D (50).

#### **3.2) Classes de mutations**

Les manifestations cliniques de la pathologie de la FK varient selon le type de mutation. Comme nous pouvons le voir dans la **figure 26A**, les mutations du canal CFTR

s'étalent sur toute la longueur du gène. Les mutations ont été classifiées en quatre différents groupes principaux selon leur impact sur la structure de la protéine ou sur l'activité du canal (**figure 26B**).



**Figure 26. Mutations du CFTR.** **A)** Distribution des mutations affectant le gène du CFTR. (Schéma tiré du site [www3.genet.sickkids.on.ca](http://www3.genet.sickkids.on.ca)) **B)** Schématisation des quatre principales classes de mutations du gène du CFTR. (Schéma adapté de l'image tirée du site [www.planetegene.com](http://www.planetegene.com))

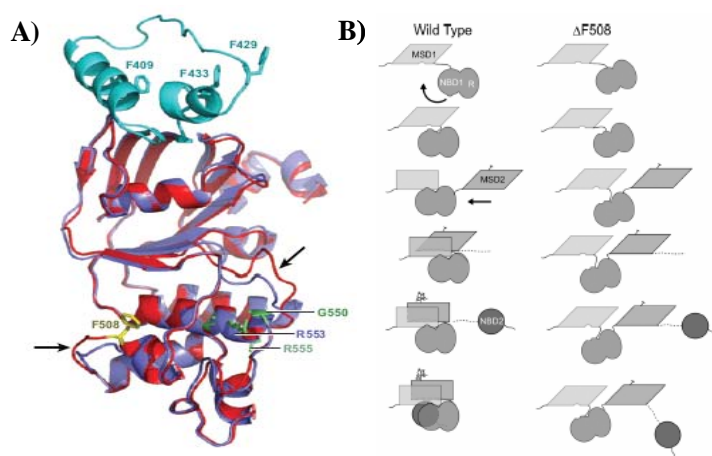
### 3.2.1) Classe I – ARN tronqué

La première classe de mutations cause des problèmes de biosynthèse de la protéine du CFTR. On retrouve différentes mutations, dont entre autre, les mutations faux-sens causant le remplacement d'un nucléotide par un autre. Ensuite, on retrouve des mutations qui entraînent le décalage du cadre de lecture. Celles-ci peuvent mener à la synthèse d'un autre peptide. Il existe aussi des mutations au niveau du promoteur qui réduisent l'efficacité de la transcription. Enfin, les mutations non-sens, telles G542X, qui changent un nucléotide d'un codon et le transforment en codon stop, entraînent l'arrêt

prématuré de la transcription. En effet, la plupart de ces mutations affectent l'étape de transcription du gène en ARNm, qui génère des protéines tronquées ou l'absence totale de synthèse de la protéine. Ces mutations causent des phénotypes plutôt sévères caractérisés par l'absence du canal CFTR à la membrane. Cependant, dans la classe de mutations I, on retrouve également le processus d'épissage aberrant ou alternatif de l'ARNm. L'épissage de l'exon 9 dans certains ARNm, par exemple, occasionne l'instabilité de certaines protéines retrouvées à la membrane, mais surtout la diminution du «pool» de protéines complètes. Ce type de mutation entraîne un phénotype moins sévère par la présence partielle de canaux CFTR à la membrane cellulaire (50, 55-58).

### 3.2.2) Classe II – dégradation de protéines immatures

La deuxième classe comprend les mutations qui affectent la maturation des protéines. La mutation la plus connue et fréquente est la délétion du résidu Phe508 ( $\Delta F508$ ). La localisation de cette mutation sur le NBD1 entraînerait la déstabilisation de la structure complète causée par le mauvais repliement du canal. Des études ont effectivement démontré que la protéine, qui comporte la mutation  $\Delta F508$ , ne se rend pas à la membrane cellulaire. En fait, la protéine CFTR  $\Delta F508$  est synthétisée, quitte le réticulum endoplasmique, mais n'atteint pas l'appareil de Golgi pour l'étape de glycosylation. En effet, cette délétion affecterait le repliement du NBD1 sans déstabiliser sa structure. Cette mutation semblerait plutôt perturber la structure du canal CFTR dans



**Figure 27. Conséquences de la délétion F508.** A) Superposition de la structure de la protéine CFTR sauvage et celle comportant la délétion F508. Les flèches indiquent les deux boucles de la protéine CFTR  $\Delta F508$  qui diffèrent de la protéine sauvage. (Image tirée de Riordan JR *Annu Rev Biochem.* 2008) B) Modélisation du repliement et de l'insertion dans la membrane de la protéine CFTR et celle comportant la délétion F508. (Schéma tiré de Cui et al. *J. Mol Biol* 2007)

son ensemble (43, 49). En effet, la délétion du résidu F508 ne semble pas changer beaucoup la structure cristallographique de la protéine comme le montre la **figure 27A** (45). L'interaction entre le NBD1 et le MSD1 est essentielle à la stabilité de la protéine et lorsque celle-ci est perturbée par la délétion du résidu F508, la traduction des autres domaines du canal est alors interrompue (92, 93; **figure 27B**). La protéine résultante incomplète et mal repliée est reconnue par les chaperones, qui sont des protéines importantes dans le contrôle de qualité, dirigée vers le complexe lysosomal pour se faire dégrader (92, 93). Ceci a comme conséquence, tout comme la classe de mutation I, l'absence de courant  $\text{Cl}^-$  passant par le canal CFTR, qui cause un phénotype sévère de la maladie.

### **3.2.3) Classe III – dysfonction du canal**

La troisième classe de mutation affecte le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal ainsi que sa régulation. Les mutations de ce groupe se trouveraient au niveau des NBD. En association avec ce type de mutation, on a observé une diminution de l'interaction des NBD avec l'ATP ainsi que du processus d'hydrolyse, ce qui mène directement à l'altération de l'activité et de la régulation du canal. En effet, on a noté que le canal était capable de se rendre à la membrane apicale, mais qu'il était non fonctionnel puisqu'il ne répondait plus à la stimulation à l'AMPc. Il a également été suggéré que ces mutations, telles que G551D, pouvaient affecter la fonction du CFTR en tant que régulateur des autres canaux ioniques. Malgré le bon nombre de protéines matures présentes à la membrane, celles-ci sont incapables de remplir leur fonction de transporteur et possiblement de régulateur, ainsi ce type de mutation cause un phénotype sévère de la pathologie (50, 55-58).

### **3.2.4) Classe IV – activité réduite du canal**

La classe IV de mutation est associée aux segments impliqués dans la formation du pore, tels que le TM12 et les boucles intracellulaires. En effet, le nombre de canaux au niveau de la membrane apicale semble normal, mais ils ne répondent pas correctement à la stimulation à l'AMPc. De plus, une diminution de la conductance unitaire causée par des mutations telles que R117H, R334W et R347P a été rapportée. Ensuite, des études

plus récentes ont démontré que certaines mutations de cette classe se retrouvent au niveau du domaine R, ce qui peut également altérer la conductance du canal. Cette classe de mutation entraîne un phénotype peu sévère de la maladie. En effet, il semblerait que seule la présence de la protéine peut s'avérer suffisante pour la régulation des autres canaux ioniques impliqués. Même si le courant  $Cl^-$  est plus faible que la normale, il permet de ralentir la déshydratation de l'ASL et tous les autres phénomènes qui y sont rattachés (50, 55-58; voir section 3.4.1).

### **3.2.5) Autre classe de mutations**

Des études ont récemment démontré l'existence d'une classe additionnelle de mutation qui affecte la stabilité du canal CFTR. En effet, ce type de mutation se retrouverait à l'extrémité C-terminale de la protéine et causerait sa troncation. Apparemment, la perte de la queue C-terminale n'affecterait pas la structure, le repliement ou la maturation du peptide, puisqu'on a observé une activité du canal à la membrane apicale. Cependant, il a été montré que l'extrémité C-terminale était importante dans la stabilité de la protéine, puisqu'on a noté une demi-vie de 5 à 6 fois plus courte pour un canal tronqué. Ce type de mutation peut entraîner un phénotype sévère de la FK, puisque le nombre de canaux à la membrane est dramatiquement réduit (57).

La prédiction des phénotypes sévères ou peu sévères en accord avec la classe de mutation n'est que théorique, puisqu'on peut retrouver différents degrés d'atteinte chez les patients homozygotes  $\Delta F508$ . L'absence ou la dysfonction du canal peut entraîner, comme exposé à la section 3.3, différentes répercussions sur plusieurs tissus et organes. De plus, il faut également considérer que le phénotype causé par une classe de mutation peut varier d'un individu à un autre dû à des facteurs génétiques et/ou environnementaux.

### **3.3) Relation génotype-phénotype**

La pathologie peut entraîner des atteintes légères, moyennes ou sérieuses de plusieurs organes, tels que le poumon, le petit intestin, le pancréas, le système reproducteur et les glandes sudoripares. Le canal CFTR est exprimé dans les cellules épithéliales de ces organes, ce qui explique leur atteinte spécifique dans la pathologie de

la FK (29, 44, 48, 55, 57). La corrélation entre le génotype (type de mutation) et le phénotype est plus ou moins exacte tout dépendant de l'organe atteint.

Le seul organe où on a pu observer une bonne corrélation génotype-phénotype est le pancréas. On aurait noté une insuffisance pancréatique chez des patients présentant les mutations comprises dans les classes I à III, qui sont les mutations les plus sévères (58). En effet, cette manifestation est un déficit d'enzymes, causé par un blocage des conduits du pancréas empêchant leur arrivée dans le petit intestin, qui entraîne une sérieuse carence en éléments nutritifs et essentiels (56-58). Pour ce qui est des patients atteints par la classe IV, où les mutations sont d'une moins grande portée sur le canal CFTR, les patients présentent une suffisance pancréatique. Ces observations suggèrent donc que la sévérité de l'atteinte du pancréas dépend bien du type de mutation. Il existe également le développement d'une pancréatite chronique idiopathique causée par certaines mutations du gène *cftr*, telles que R117H, N1303K et de l'épissage aberrant (50, 56, 57).

Il n'y a pas vraiment de relation génotype-phénotype au niveau des glandes sudoripares et du système reproducteur masculin, puisque l'on retrouve ces atteintes quelque soit le type de mutation. D'abord, l'absence du canal CFTR dans l'épithélium des conduits des glandes sudoripares entraîne une élévation de la concentration de sel dans la sueur, qui est causé par l'absence de recapture des ions Cl<sup>-</sup>. Ceci constitue une manifestation légère de la pathologie. En fait, quelle que soit la mutation, ce trait caractéristique commun à tous les patients est donc utilisé pour diagnostiquer les patients atteints de la maladie (50, 55-58, 63). Ensuite, l'obstruction de l'épididyme au niveau du système reproducteur cause inévitablement l'azoospermie, qui est l'absence de spermatozoïdes dans le sperme. Il a été rapporté que les mutations du gène *cftr*, telles que R117H et celles de la classe IV, pouvaient être également associées avec d'autres désordres qui affectaient la fertilité masculine, dont entre autre l'absence bilatérale des canaux déférents (*CBAVD*; *congenital bilateral absence of vas deferens*), l'absence unilatérale du canal déférent (*UAVD*; *unilateral absence of vas deferens*) et l'asthénospermie, qui est la diminution de la mobilité des spermatozoïdes. Ces phénomènes mènent tous à l'infertilité masculine qui a été observée chez tous les hommes atteints de la FK (50, 55, 57, 58).

Pour ce qui est des autres organes, tels que les poumons (**voir section 3.4**) et le petit intestin, l'atteinte est très variable d'un patient à un autre. L'établissement d'une corrélation génotype-phénotype est alors pratiquement impossible. L'atteinte au niveau du petit intestin chez certains nouveau-nés présentant la délétion du résidu F508 peut entraîner une obstruction au niveau de l'iléum caractéristique de la FK, appelé l'iléus méconial (56, 57, 58). Chez l'adulte, on observe plutôt l'absence de sécrétion de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{HCO}_3^-$ , qui cause une malabsorption de nutriments dans les segments plus distaux du petit intestin. La stéatorrhée, soit une diarrhée contenant un haut taux de nutriments et de lipides, témoigne justement de la mauvaise digestion et absorption des aliments (58).

### **3.4) Pathologie respiratoire**

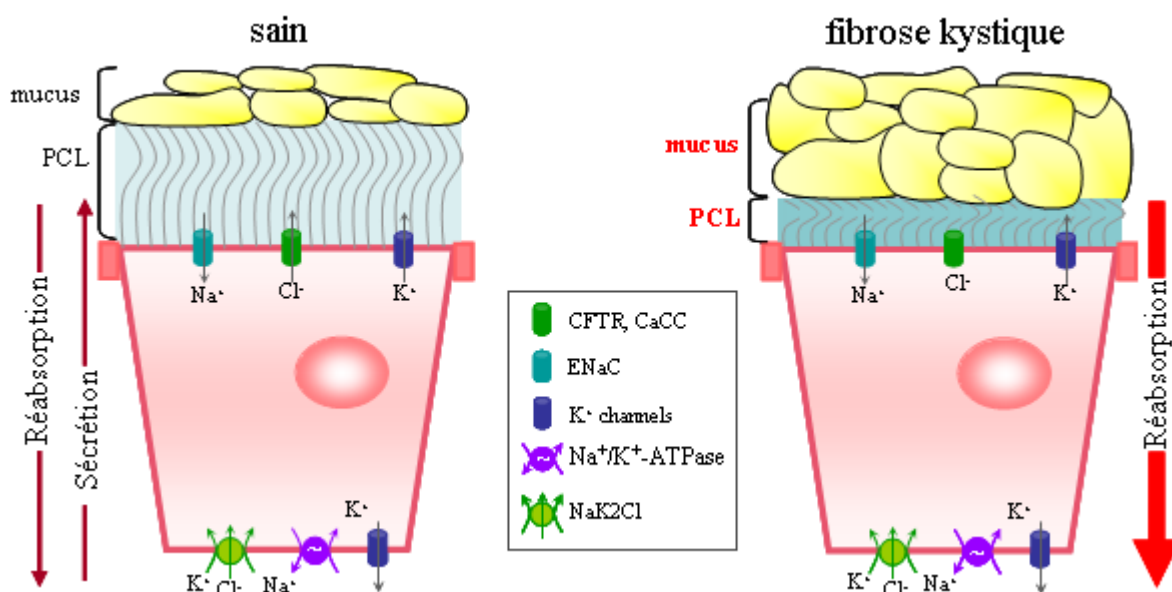
La pathologie de la fibrose kystique est surtout connue pour affecter la fonction respiratoire de plusieurs patients. Il ne semble toutefois pas y avoir de relation stricte entre la classe de mutation (génotype) et la gravité des manifestations de la maladie (phénotype) contrairement à l'atteinte pancréatique. En effet, il a été noté que pour une même mutation, l'atteinte pulmonaire peut être très variable chez les patients FK (57).

#### **3.4.1) Transport ionique dans la fibrose kystique**

Le canal CFTR semble jouer un rôle essentiel et central, puisque son absence ou sa dysfonction entraîne un large éventail de conséquences sur différents organes avec des degrés de sévérité très variables. Cependant, l'absence de transport de  $\text{Cl}^-$  n'est peut-être pas suffisante pour expliquer tous les symptômes ainsi que les manifestations de la pathologie de la fibrose kystique (FK). L'absence ou la dysfonction du canal CFTR semblerait aussi occasionner une dérégulation des autres transports ioniques au niveau de l'épithélium respiratoire. En effet, on a noté qu'en présence de mutation affectant le canal CFTR, le courant qui passe par le canal ORCC est fortement diminué (16, 44, 50, 58). L'absence quasi-totale de sécrétion de  $\text{Cl}^-$ , occasionnée par la dysfonction des canaux CFTR et ORCC, cause une diminution drastique de liquide au niveau des voies aériennes. De plus, il semblerait que la sécrétion de fluide par les glandes sous-muqueuses serait également diminuée en condition FK (44, 51, 53). Ensuite, il a été montré que la perméabilité du  $\text{Na}^+$  de la membrane apicale de cellules FK était 4 fois plus élevée que

celle des cellules normales (44, **figure 28, panneau de droite**). De façon intéressante, une équipe a récemment créé un modèle de souris qui surexprimait la protéine ENaC et développait les mêmes symptômes que ceux observés dans la FK. Cette étude avait pour but de démontrer que l'hyperabsorption de  $\text{Na}^+$  par le canal ENaC contribuait fortement à la détérioration de l'état des patients FK (10).

Ces altérations du transport de  $\text{Cl}^-$ , de  $\text{Na}^+$  et des fluides au niveau des voies aériennes aggrave de façon exagérée la déshydratation de l'ASL (23, 50, 52, 65; **figure 28**). Cette déshydratation cause une réduction du volume PCL et l'épaississement du mucus. À cela s'ajoute une augmentation des cellules caliciformes provoquant une surproduction de mucus, qui s'accumule et obstrue les voies aériennes. On a aussi noté des anomalies des cellules ciliées, telles que l'absence des microtubules centraux et la désorganisation des microtubules, qui réduisent le battement des cils (48). La fonction ciliaire diminuée combinée à l'excès de mucus épais et visqueux altère la clairance mucociliaire (52). Ce phénomène entraîne une multitude de conséquences désastreuses, telles qu'une diminution de l'efficacité de la clairance des pathogènes inhalés, ce qui entraîne donc la persistance des bactéries et le déclenchement d'une réponse inflammatoire (50; voir section 2.2.2).



**Figure 28. Schéma du transport des voies aériennes saines et fibrose kystique.** L'absence de transport de  $\text{Cl}^-$  se résulte en une augmentation d'une réabsorption de liquide via le canal ENaC, qui entraîne une diminution du volume de la couche de liquide péréciliaire (PCL) et une accumulation de mucus épais et visqueux.



### **3.4.2) Cycle infection-inflammation**

En fait, en condition normale, le mucus est capable d'emprisonner les bactéries ou les pathogènes afin de les éliminer par voie mécanique via la clairance mucociliaire et/ou par voie chimique et immunitaire via les peptides anti-microbiens et les cellules immunes (**voir sections 2.2.1 et 2.2.2**). Cependant, chez les patients FK, l'épaisseur et la viscosité du mucus immobilise les bactéries à un endroit où elles se déposent pour former un biofilm. Les bactéries, telles que la *S. aureus*, la *H. influenzae*, la *B. cepacia*, la *S. maltophilia*, la *A. xylooxidans* et la plus fréquente la *P. aeruginosa*, ne peuvent pas être éliminées de la couche de mucus, qui devient un site idéal pour leur prolifération (61, 63, 64). Il semblerait également que la bactérie *P. aeruginosa* montre une plus grande adhérence à l'épithélium FK comparativement à l'épithélium normal (52, 60, 63). Ceci entraîne la colonisation bactérienne, qui induit un cercle vicieux d'infection et d'inflammation (53).

Les processus d'infection et d'inflammation entraînent le recrutement de neutrophiles et la production de cytokines dans le but d'éliminer les pathogènes et de limiter leurs dégâts comme expliqué dans la **section 2.2.2**. Chez les patients FK, il existe un débalancement des cytokines pro- et anti-inflammatoires, qui accentue et prolonge la phase inflammatoire (59-63). En effet, il a été démontré que la sécrétion d'IL-10 par les cellules épithéliales bronchiques FK était réduite (63), alors que celle des cytokines pro-inflammatoires est augmentée. Celles-ci permettraient de stimuler l'activité d'un facteur de transcription majeur dans la réponse immune, le NFκB. En effet, durant la réponse inflammatoire, la voie de signalisation du NFκB est activée et induit la transcription de plusieurs médiateurs de l'inflammation (64, 66, 67). La production d'oxyde nitrique (*NO*, *nitric oxide*), aux propriétés anti-microbiennes, est diminuée aussi durant la pathologie de la FK. Il semblerait que ce phénomène soit causé par une régulation à la hausse de l'activité de la RhoGTPase qui entraîne une baisse d'expression de la NO synthétase. De plus, il a été également proposé que l'activité de l'arginase était augmentée chez les patients FK, ce qui causerait une baisse dans leur sang de L-arginine, substrat de la NO synthétase et précurseur du NO (64). L'absence d'IL-10 et de NO réduirait l'expression de IκB, l'inhibiteur de NFκB, ce qui entraînerait un déséquilibre entre IκB et NFκB causant une réponse inflammatoire prolongée et exagérée (64). D'autre part, il a été

démontré que la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF) était augmentée dans des cellules FK suite à une exposition à la bactérie *P. Aeruginosa* (50). En effet, il a été montré que l'exposition à la *P. aeruginosa* induit la production d'IL-8, un chemoattractant important des neutrophiles, sécrété en grande quantité par les cellules épithéliales, mais aussi par les neutrophiles (50, 60, 61, 63). Il semble donc exister une rétroaction positive entre la production d'IL-8 et le recrutement des neutrophiles.

La composition et la viscosité du mucus empêchent la diffusion des molécules anti-bactériennes et réduisent la clairance mucociliaire. Ce mucus plus épais restreint également la mobilité des neutrophiles, limitant leur action dans la capture et l'élimination des pathogènes (50-53). Ces phénomènes entraînent la persistance des bactéries au niveau de l'épithélium des voies aériennes, qui mène au recrutement et l'accumulation des neutrophiles supplémentaires (10, 50, 59, 61, 63, 64). Ces derniers sont impliqués dans la relâche de protéases, dont l'élastase, qui dégradent les protéines structurales de l'épithélium, telles que le collagène, l'élastine et les protéoglycans. L'élastase inactive également des inhibiteurs d'autres protéases et stimule la production la molécule oxydante ROS, amplifiant la destruction des parois des voies aériennes (50, 59, 63, 64). Ceci entraîne la destruction progressive de l'épithélium des voies aériennes, à une diminution de la clairance mucociliaire déjà dysfonctionnelle et amplifie le cycle d'infection-inflammation. Ces lésions impliquent la perte des cellules épithéliales, la métaplasie des cellules caliciformes et le développement de dyskinésie secondaire (10, 63, 64). Subséquemment, on observe une aggravation du transport ionique déjà altéré, une hypersécrétion de mucines et une diminution de la clairance mucociliaire, perpétuant l'infection et amplifiant la réponse inflammatoire (10, 23, 29, 50-53, 61, 63, 65).

On sait que la présence de bactéries induit le recrutement des neutrophiles et la relâche de certaines cytokines. Il semble alors logique que la réponse inflammatoire soit une conséquence de l'infection. Cependant, certaines études permettent de croire que la phase inflammatoire précéderait la phase infectieuse dans la pathologie de la FK. En effet, des observations ont démontré que certains patients FK présentaient de l'inflammation sans trace d'infection, suggérant que l'inflammation pouvait favoriser la colonisation bactérienne (58, 59). Cependant, il a également été postulé qu'une infime concentration de bactéries pouvait induire le recrutement de neutrophiles et la réponse

inflammatoire, qui créent un environnement idéal pour une prolifération bactérienne plus importante (59, 60). Il est donc difficile de déterminer quel est l'événement déclencheur initial dans la pathologie de la FK.

En bref, une dysfonction du transport ionique cause la dérégulation du volume de l'ASL et l'épaississement du mucus. La surproduction de mucus cause l'obstruction des voies aériennes et une diminution de la barrière de défense, qui provoque le début d'un cycle incontrôlable de colonisation bactérienne chronique et de réponse inflammatoire menant à une destruction progressive de l'épithélium respiratoire.

#### **3.4.2.1) Susceptibilité à l'infection et/ou l'inflammation**

Il a été démontré que certains gènes modificateurs pouvaient affecter le phénotype des patients atteints de la FK. En effet, il a été suggéré que les polymorphismes du TGF $\beta$ 1 et du TNF, des cytokines anti- et pro-inflammatoires respectivement, sont associés avec un phénotype de la FK plus sévère. D'autre part, les patients qui possédaient une variation d'allèles associée avec une insuffisance pour la lectine liant le mannose (*MBL; mannose-binding lectin*), semblaient plus susceptibles aux infections et à une mort prématurée. En effet, la MBL est une molécule importante dans l'immunité innée (57).

Il a été également suggéré que des facteurs environnementaux, tels que la fumée de cigarette et les infections bactériennes, pouvaient également intervenir dans la sévérité des phénotypes (50, 55, 57, 58). Cette pathologie monogénique fait donc intervenir une multitude d'éléments génétiques et/ou environnementaux. La corrélation entre les mutations et la sévérité de l'atteinte des différents organes est possible à prédire lorsqu'on dresse le portrait complet des manifestations cliniques présentes chez le patient. Cependant, des études démontrent que l'établissement de la relation génotype-phénotype pour l'atteinte dans le poumon s'avère plus complexe, puisqu'elle varie énormément d'un patient à un autre (52, 56-58).

Selon certaines études, les voies aériennes chez les patients FK seraient sensibles et susceptibles au développement d'infections et d'inflammation chroniques. Comme expliqué précédemment, la mutation du canal CFTR affecte évidemment le transport ionique ainsi que la clairance mucociliaire. Cependant, il a été démontré que dans la dyskinésie primaire, l'absence de clairance mucociliaire n'était pas suffisante pour

induire l'infection et l'inflammation des tissus, ce qui suggère l'implication d'autres éléments (63). D'abord, l'absence ou la dysfonction du canal CFTR semble augmenter l'adhérence et la persistance de la bactérie *P. aeruginosa* (52, 60, 63). Ensuite, le déséquilibre entre la production de cytokines anti- et pro-inflammatoires peut amplifier le cycle infection-inflammation (59-63). Il a été aussi démontré que les neutrophiles retrouvés chez les patients FK montraient un délai de leur apoptose, d'où leur accumulation dans le poumon. Il semble aussi que les neutrophiles FK exhibent des fonctions anormales. En effet, il semble qu'ils produisent plus d'élastase et d'oxydants (50, 64). Enfin, il a aussi été suggéré que les patients FK auraient un défaut primaire de l'épithélium, soit une déficience de certaines cellules immunes, qui favoriserait la colonisation bactérienne (31). Bref, il semble alors que la combinaison de tous ces facteurs pourrait favoriser et maintenir les phases exagérées d'infection et d'inflammation observées chez les patients FK.

Il existe une autre théorie pour expliquer le développement de l'infection et l'inflammation dans les tissus FK. Celle-ci s'opposerait à la théorie de la régulation du volume de l'ASL expliquée précédemment à la **section 3.4.1**, puisqu'elle s'appuie sur l'hypothèse que l'activité des protéines anti-microbiennes est sensible à la concentration de sel. Plus précisément, cette théorie stipule que la dérégulation du transport ionique, par l'absence d'activité du canal CFTR et l'hyperabsorption de  $\text{Na}^+$  par le canal ENaC, causerait un changement dans l'osmolarité de l'ASL, qui affecterait l'activité des protéines anti-bactériennes contenues dans le mucus (28, 44, 63). Cependant, il a été ensuite démontré que la composition de l'ASL est isotonique, ce qui contredit cette hypothèse. Il semble alors que la théorie de la déshydratation et l'épaississement du mucus soit plus probable pour le développement du cercle vicieux de l'infection et l'inflammation.

La physiologie du système respiratoire est fortement affectée par l'absence ou la dysfonction du canal CFTR durant la vie adulte. La fonction anormale des tissus FK, des cellules immunes ainsi que l'altération du transport ionique et liquidien, causés par la mutation du gène *cftr*, entraînent des conséquences et répercussions sérieuses sur les mécanismes de défense de l'épithélium et sur la fonction respiratoire.

### **3.4.3) Lésions et remodelage dans la fibrose kystique**

Le cycle incontrôlable d'infections et de réponses inflammatoires chroniques entraîne des phénomènes impliqués dans les processus lésionnels et de réparation (**voir section 2.2.3**) afin de tenter de recouvrer l'intégrité de l'épithélium pour rétablir ses fonctions de mécanisme de défense (**voir section 2.2**) et d'échange gazeux. Toutefois, la réponse inflammatoire combinée à l'activité des métalloprotéinases matricielles, sécrétées par les neutrophiles, est impliquée aussi dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours des processus de réparation (59; **figure 11B**).

Chez les patients FK, un déséquilibre entre les processus lésionnels et de réparation semble exister. En effet, l'équipe du D<sup>re</sup> Coraux a également démontré, dans un modèle de xéno greffe des voies aériennes humaines, que la régénération épithéliale des cellules nasales FK était plus lente que celle observée dans l'épithélium nasal sain (82). Ces résultats supportent alors le concept d'un déséquilibre dans les tissus FK entre les phénomènes de lésions et de réparation dans la destruction progressive de l'épithélium respiratoire. Ceci mène inévitablement à la détresse respiratoire, qui est une manifestation clinique souvent fatale chez les patients FK (29, 63-64).

L'analyse des poumons de patients FK montre plusieurs modifications histologiques. En effet, chez le fœtus, il a été montré que les glandes sous-muqueuses de la trachée étaient dilatées (29, 48). On a également observé une atrophie ou une métaplasie de l'épithélium trachéal. Ensuite, on a noté que les voies aériennes des patients FK après la naissance étaient dilatées et que leur paroi était plus épaisse (31). On a également observé, chez des patients adultes, que l'épithélium était recouvert d'une couche épaisse et visqueuse de mucus et était atteint d'hyperplasie sévère des cellules caliciformes (48). On peut noter l'épaississement des parois des voies aériennes combiné à une dégradation protéolytique des protéines structurales, une augmentation de la vascularisation et des muscles lisses (133, 143). Ces manifestations histologiques témoignent du développement chez les patients FK d'une bronchiectasie, qui peut mener à une défaillance respiratoire et la mort. Une étude de morphologie ultrastructurale du poumon FK a décrit la présence de lésions au niveau des alvéoles (48). On a également observé des régions de régénération de cellules ATII suite à ces lésions (48, 175). Des cycles répétitifs de lésions et de régénération semblent entraîner de la métaplasie cuboïde

au niveau de l'épithélium alvéolaire (175). Ce type de lésions épithéliales alvéolaires a aussi été observé dans d'autres pathologies pulmonaires et ne semble donc pas être spécifique à la FK (48).

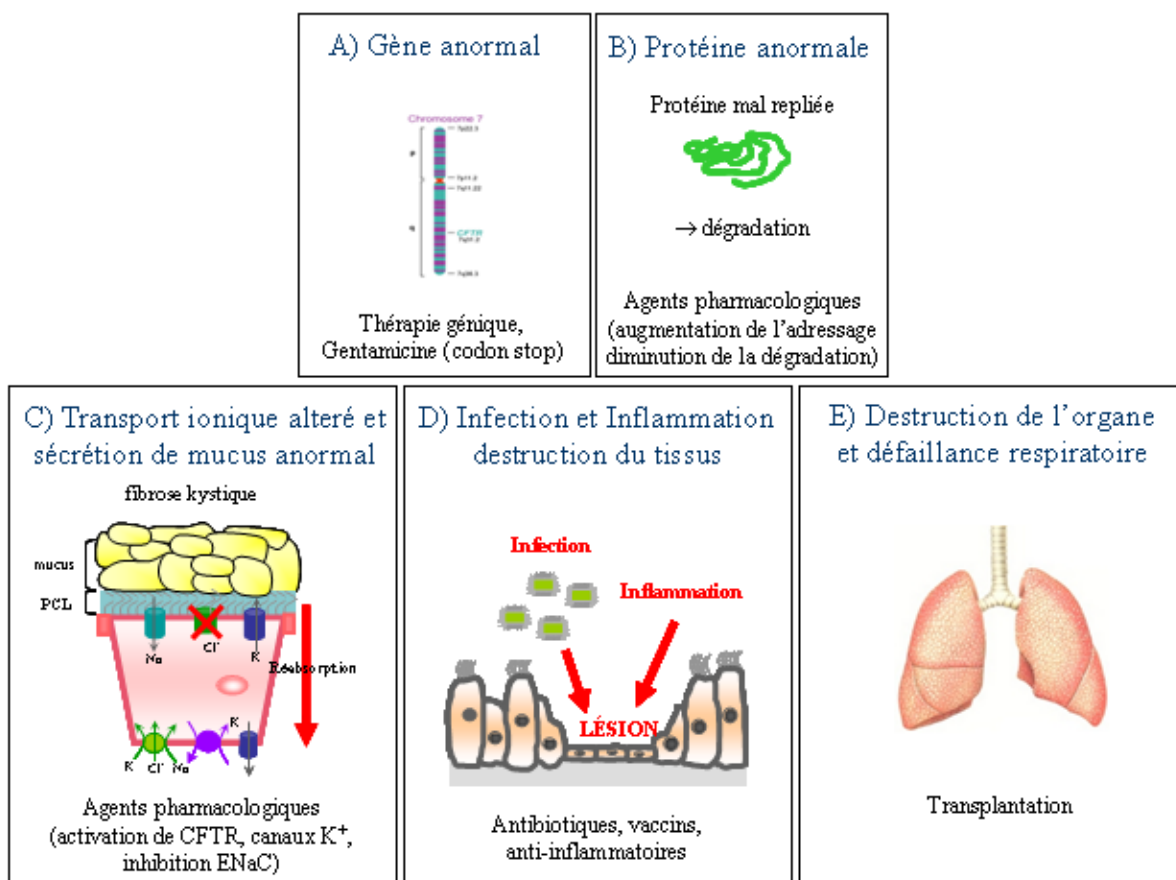
### **3.5) Thérapies et traitements pour la fibrose kystique**

De nombreuses études sont consacrées à traiter la pathologie de la FK, soit en ciblant le défaut primaire ou les effets secondaires causés par l'absence du courant Cl<sup>-</sup>, incluant l'épaississement du mucus, l'infection et l'inflammation chroniques ainsi que les processus d'oxydation (45, 54, 64, 66-68).

Comme expliqué précédemment, la pathologie de la FK est causée avant tout par la mutation du gène *cftr*. Ainsi, plusieurs équipes tentent actuellement de corriger le défaut de base par des thérapies géniques en développant différentes stratégies (**figure 29A**). Cependant, plusieurs obstacles restent à franchir dans le processus de transfection de la protéine CFTR recombinante. La transfection doit d'abord être «tissu-spécifique» et stable pour vraiment devenir une thérapie génique efficace. Un autre problème est l'insertion dans le plasmide de l'ADNc du CFTR, qui est un très gros gène comportant 27 exons. Pour contourner ce problème, on utilise un adénovirus (AAV; *adeno-associated virus*) pour permettre la distribution l'ADNc du canal CFTR dans les tissus visés, tels que les sinus, l'épithélium respiratoire. Le AAV-CFTR est un parvovirus défectueux, c'est-à-dire qu'il nécessite la coopération d'un autre virus pour se répliquer normalement. Il semblerait que cette technique permet l'amélioration de la fonction respiratoire et la diminution de la concentration de l'IL-8, la cytokine pro-inflammatoire typique de la pathologie de la FK lors des essais cliniques (45, 54, 68; **voir section 3.4.2**). Dans le même ordre d'idée, on peut utiliser des liposomes, qui sont faciles à produire et plus sécuritaires, puisqu'ils n'induisent pas, selon les observations faites lors d'essais de thérapie génique *in vivo*, de réaction immunitaire comme les virus pourraient le faire (68).

L'absence de CFTR peut être causée par des codons stop prématurés (*PTC*; *premature termination codon*) occasionnés par les mutations non-sens de la classe I. Il existe alors des substances qui permettent de sauter ces PTC et d'autres, tels que les aminoglycosides ou la gentamycine, réduisant la fréquence d'insertion de codon stop,

afin de rétablir une quantité raisonnable de protéines matures à la membrane (45, 54). Ces thérapies géniques permettent de recouvrir une partie du courant  $\text{Cl}^-$  dans les tissus (**figure 29A**).



**Figure 29. Options thérapeutiques.** Les différentes options thérapeutiques disponibles à ce jour pour aider et/ou traiter les différents symptômes et manifestations causés par les mutations possibles du CFTR.

Plusieurs équipes ont travaillé à développer des correcteurs, qui peuvent aider à la maturation et à l'adressage du canal (**figure 29B**). Les correcteurs permettraient d'adresser des protéines immatures issues de la classe de mutation II, qui sont incapables de se rendre à la membrane. En fait, il existe des chaperones chimiques qui interagissent avec la protéine CFTR- $\Delta\text{F508}$ , ce qui lui éviterait la dégradation dans le complexe lysosomal. Cependant, il a été démontré que la concentration nécessaire pour l'obtention d'un sauvetage raisonnable de canaux est trop toxique pour une utilisation thérapeutique.

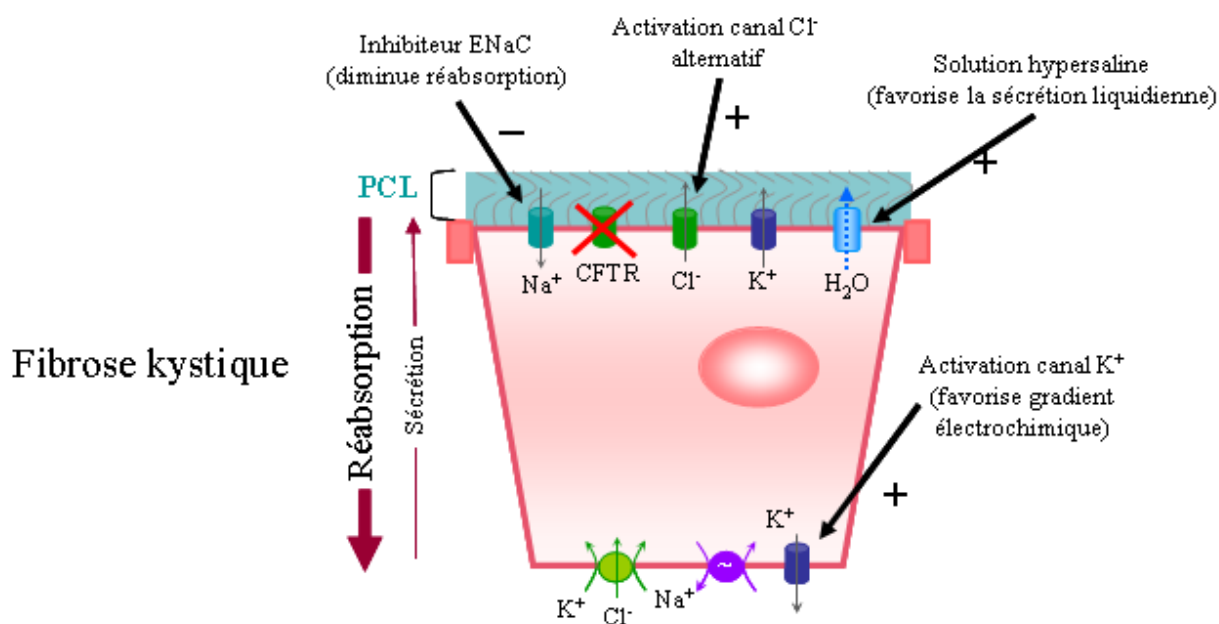
Ensuite, on a développé le 4-phénylbutyrate de sodium qui permet une augmentation de la synthèse de l'ARNm du CFTR et de l'expression des chaperones, impliquées dans la maturation de la protéine. De plus, il a été démontré que les molécules VRT-325, corr-2b et corr-4a, identifiées par criblage à haut débit, augmenteraient l'adressage de CFTR- $\Delta$ F508 à la membrane. Ces produits semblent plutôt interagir directement avec le canal au lieu d'interférer avec les chaperones impliquées dans le contrôle de qualité des protéines. On pense que ces correcteurs permettraient de retenir comme une ancre les protéines immatures à la membrane. La combinaison de ces molécules permet d'augmenter de 2 à 4 fois leur efficacité, probablement parce qu'elles interagissent toutes à différents sites du canal (90).

Plusieurs études se consacrent également au développement de potentiateurs pour le canal CFTR affecté par les classes de mutation III et IV ou après maturation partielle par les correcteurs. En effet, ces molécules permettraient d'augmenter l'activité du canal (**figure 29B**). Par exemple, la molécule VRT-532 a été développée dans le but d'augmenter l'activité du CFTR-G551D. En effet, ce canal muté montrait un défaut dans son état de phosphorylation ainsi que dans son mécanisme d'ouverture et de fermeture. L'action de la molécule VRT-532 semble augmenter l'affinité de la protéine pour l'ATP et donc son activité ATPase, ce qui permet le rétablissement de la fonction du canal muté (89). De plus en plus, les traitements combinent l'action des correcteurs à celle des potentiateurs dans le but d'optimiser le rétablissement d'un courant  $\text{Cl}^-$  partiel.

Il est reconnu que l'absence de transport de  $\text{Cl}^-$  est accompagnée d'une hyperabsorption de  $\text{Na}^+$  (**voir section 3.1**). Des équipes ont alors cherché à inhiber le transport de  $\text{Na}^+$  afin de limiter la déshydratation de l'épithélium des voies aériennes. On peut procéder à l'aide d'agents pharmacologiques, tels que des inhibiteurs et d'autres molécules capables de bloquer les voies de signalisation impliquées dans l'activation du canal ENaC (**figure 29C et figure 30**). On peut également rétablir le volume de l'ASL à l'aide d'une solution hypersaline qui favorise une sortie d'eau et la réhydratation de l'épithélium par l'activité des AQP (**figure 30**). On a observé avec cette technique des améliorations de la fonction respiratoire et de la clairance mucociliaire ainsi qu'une diminution de l'exacerbation pulmonaire (52, 54, 65). De la même façon, on peut également utiliser des osmolytes faiblement transportés ou absorbés, comme le mannitol



ou la raffinose. La clairance mucociliaire est grandement augmentée, mais son efficacité est d'une durée très limitée, soit environ 20 minutes (52, 65). Il semblerait que l'on puisse activer des canaux  $\text{Cl}^-$  apicaux alternatifs afin de rétablir partiellement un transport de  $\text{Cl}^-$  dans la cellule et favoriser la sécrétion de fluide (**figure 30**). Il a également été suggéré qu'une activation des canaux  $\text{K}^+$  à la membrane basolatérale pourrait favoriser le gradient électrochimique et la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ . En effet, l'activation des canaux  $\text{KCa3.1}$ , qui stimule la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  (105, 107), a été proposée comme une stratégie prometteuse pour favoriser le transport de  $\text{Cl}^-$  dans les tissus FK par des canaux CFTR résiduels ou des canaux  $\text{Cl}^-$  alternatifs (**figure 30**). Bref, ces options thérapeutiques ont pour but le rétablissement de l'équilibre entre la sécrétion et la réabsorption ainsi que d'un volume PCL adéquat pour le mouvement ciliaire et l'hydratation de la couche de mucus, qui favorise la clairance mucociliaire.



**Figure 30. Options thérapeutiques alternatives.** Ces thérapies ont pour but le rétablissement de l'équilibre entre la sécrétion et la réabsorption des fluides. Ceci permet par la suite la récupération d'un volume PCL adéquat qui favorise le mouvement ciliaire et l'hydratation de la couche de mucus, qui sont des éléments importants pour la clairance mucociliaire.

La déshydratation de la couche de mucus entraîne une augmentation de sa viscosité. Des molécules, qui possèdent une activité mucolytique, sont donc utilisées afin de fluidifier le mucus dans le but d'améliorer la clairance mucociliaire. On utilise la

désoxyribonucléase humaine I recombinante (*rhDNAase*; *recombinant human desoxyribonuclease*) pour fragmenter les longs brins d'ADN contenus dans le mucus (65, 66, 68). La N-acétylcystéine, un autre agent mucolytique, est aussi efficace pour l'inhibition d'IL-8 et de la translocation de NFκB, des molécules impliquées dans la stimulation de la réponse inflammatoire (67). La N-acétylcystéine peut également être un anti-oxydant, puisqu'elle peut réduire le nombre de neutrophiles et de leurs produits toxiques, tels que les radicaux libres (64). Cependant, la N-acétylcystéine cause une irritation des voies aériennes, ce qui limite son utilisation. Enfin, il a été démontré que le canal CFTR était capable de transporter le glutathion (GSH), ayant des propriétés anti-oxydantes et mucolytiques. L'absence du CFTR entraîne alors forcément une diminution de GSH. L'administration en aérosol de GSH permet de briser les ponts disulfures formés entre les mucines et réduire la viscosité du mucus. Cependant, par cette voie d'administration, le GSH semble perdre ses effets anti-oxydants (67). Ces traitements permettent de rétablir l'hydratation de l'ASL et de fluidifier le mucus afin d'augmenter le processus de clairance mucociliaire.

Le mucus déshydraté, plus épais et visqueux, favorise la colonisation bactérienne et l'infection chronique (**figure 29D**). Alors, l'usage d'antibiotiques empêche l'exacerbation, mais n'enraye pas l'infection. Certains antibiotiques, tels que les macrolides, semblent posséder en plus des propriétés anti-inflammatoires, puisqu'ils réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, TNF et IL-1β (66). Le mucus peut également contenir des séquences bactériennes CpG non-méthylées, qui peuvent induire une réponse inflammatoire. On y retrouve également de l'activité protéolytique et des nombreuses cellules immunes impliquées dans l'inflammation. La complexité de ce phénomène a amené le développement de plusieurs thérapies anti-inflammatoires (**figure 29D**). Il y a d'abord les corticostéroïdes, qui sont capables de réduire la production de mucus et d'interférer dans l'action ou la synthèse de médiateurs de la réponse inflammatoire. Ils peuvent également inhiber le recrutement, l'adhésion et l'activation des leucocytes ainsi que l'activation du NFκB, impliqué dans l'amplification de la réponse inflammatoire. L'ibuprofène, un anti-inflammatoire non-stéroïdien (*NSAIDs*; *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), fonctionne seulement à de fortes doses. Il possède la capacité de réduire spécifiquement l'activité et le recrutement des

neutrophiles au site d'inflammation (64, 66). L'ibuprofène est également capable d'inhiber la protéine activatrice AP-1 et l'activation du NFκB comme les corticostéroïdes. Il est aussi impliqué dans l'inhibition de certains facteurs de transcription qui activeraient le NFκB, tels que le IκKβ, le Erk, la p38 et des protéines kinases cycline-dépendantes (66).

Les cytokines, des molécules directement impliquées dans l'inflammation, peuvent être effectivement des cibles potentielles pour la thérapie anti-inflammatoire. L'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, est capable de stabiliser IκB qui inhibe le NFκB et de réduire la réponse inflammatoire et l'apoptose des neutrophiles. Cette cytokine peut avoir un intérêt au niveau thérapeutique, puisqu'elle a des effets bénéfiques pour les patients FK. Un anticorps neutralisant pour l'IL-8 a aussi été développé afin de réduire le recrutement des neutrophiles. Il y a également l'IFNγ qui est capable de bloquer les voies de signalisation menant à la dégradation d'IκB, l'inhibiteur de NFκB. Des essais cliniques pour un traitement à l'IFNγ sont présentement en cours (64, 66). Il existe également des thérapies dirigées contre le TNF, une cytokine pro-inflammatoire connue pour induire la sécrétion d'IL-8 et l'activation de la voie NFκB (59, 69). En effet, ces thérapies anti-TNF ont fait leurs preuves dans d'autres maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et la maladie inflammatoire de l'intestin (59). Ces différents traitements permettent de traiter la réponse inflammatoire exagérée observée chez les patients FK afin de limiter la progression de la destruction de leur épithélium respiratoire.

Le LTB<sub>4</sub>, un eicosanoïde, est un chemoattractant important pour les neutrophiles. Ces derniers sont impliqués dans le relâchement de l'élastase qui favorise une sécrétion de LTB<sub>4</sub> par les macrophages, ce qui augmente le recrutement des neutrophiles s'accumulant au site d'inflammation. Des inhibiteurs de la 5-lipoxygénase, qui peuvent limiter la production de LTB<sub>4</sub>, sont donc d'un grand intérêt. Les neutrophiles produisent entre autre de l'élastase, de la cathepsin G et d'autres protéases, ayant des conséquences désastreuses sur l'épithélium respiratoire. Il a été démontré que la α1-antitrypsine, inactivée par le stress oxydatif, est capable de supprimer l'activité de l'élastase. Une thérapie à l'α1-antitrypsine pourrait donc limiter les dégâts causés par l'élastase et permettre une meilleure régénération de l'épithélium (64, 66). Ces traitements permettent de bloquer l'action de protéases libérées par les neutrophiles, afin de limiter, tout comme

les thérapies anti-inflammatoires, la dégradation de l'épithélium respiratoire. Cependant, lorsque la destruction des tissus est trop avancée et qu'une détresse respiratoire s'installe, la transplantation demeure la dernière option pour la survie des patients FK (**figure 29D**).

En résumé, la plupart des thérapies et traitements disponibles pour la pathologie de la FK ont pour but de rétablir le courant CI<sup>-</sup>, d'augmenter la clairance mucociliaire, de réduire la réponse inflammatoire ou de bloquer l'activité des protéases. La seule option présentement est la combinaison de ces traitements et thérapies afin d'améliorer l'état des patients en attendant une thérapie génique plus efficace.

Dans le laboratoire du D<sup>re</sup> Brochiero, nous avons exploré, comme nous le verrons dans les prochains chapitres, une approche nouvelle et novatrice qui consiste à tenter de promouvoir la réparation épithéliale dans le but d'éventuellement rétablir l'intégrité épithéliale afin de restituer les conditions physiologiques et les mécanismes de défense pour enfin améliorer la fonction respiratoire des patients FK.

## Chapitre 2 – Hypothèses de travail

La physiologie pulmonaire dépend de plusieurs composantes dont le transport des fluides et des ions. En effet, ce transport participe à la régulation du volume de la couche de liquide des voies aériennes (ASL). Il existe un équilibre entre la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  et la réabsorption de  $\text{Na}^+$ , ce qui permet de maintenir un volume périciliaire (PCL) adéquat afin de permettre une clairance mucociliaire efficace (23, 29, 53, 65). Par conséquent, une dysfonction du transport ionique causée par l'absence du canal CFTR, comme dans la pathologie de la fibrose kystique (FK), entraîne un déséquilibre du transport ionique, causant une forte diminution du volume PCL. Ce phénomène occasionne la déshydratation de la couche de mucus, obstruant les voies aériennes (28, 44, 63; **voir figure 28**). De plus, cette couche de mucus épaisse et visqueuse devient un site idéal pour la colonisation bactérienne et l'inflammation. Un cycle incontrôlable d'infection et inflammation chronique peut alors se développer. Celui-ci est causé par une augmentation de l'adhérence des bactéries, telle que *P. aeruginosa* (52, 60, 63) et par un déséquilibre entre la sécrétion de cytokines anti- et pro-inflammatoires (59-63). Une infiltration et une persistance des neutrophiles au niveau des voies aériennes (50, 137, 144) entraînent la dégradation des protéines structurales, telle que le collagène et l'élastine par les protéases neutrophiliques (59, 63, 64, 144). Évidemment, des lésions épithéliales non seulement au niveau de l'épithélium bronchique, mais aussi au niveau alvéolaire peuvent se développer, affecter l'intégrité de l'épithélium respiratoire (83, 132, 133, 140, 143) et par conséquent, ébranler toute la physiologie respiratoire.

Un éventail varié de thérapies et de traitements est disponible pour tenter de corriger le défaut primaire et traiter les symptômes et les manifestations de la pathologie de la FK (45, 54, 64, 66-68; **voir figures 29 et 30**). Toutefois, il existe une facette de la pathologie qui n'a pas encore été explorée, soit la régénération épithéliale. En effet, peu d'efforts et de ressources ont été investis dans la recherche des thérapies et traitements pourrait aider la réparation des lésions dont l'épithélium respiratoire est la cible. Il a été démontré qu'il existait un délai de la régénération épithéliale des cellules nasales FK comparativement à celle observée dans l'épithélium nasal sain dans un modèle de xéno greffe humanisé (82). Le but de cette étude est donc de mieux comprendre les

mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire et bronchique afin de développer des stratégies pouvant promouvoir éventuellement la régénération épithéliale chez les patients FK.

Il est connu que les processus de réparation dépendent de plusieurs facteurs de croissance (134, 137, 139, 140, 143). Le facteur de croissance épidermique (EGF) peut activer son récepteur par voie autocrine ou paracrine. Dans plusieurs types cellulaires, l'activation de l'EGFR peut induire différents phénomènes motogéniques, mitogéniques et morphogéniques. Suite à la liaison de l'EGF sur son récepteur, différentes voies de signalisation, telles que Ras-MAPK et PI3K-Akt sont activées et impliquées dans le processus de migration et de prolifération cellulaire, essentiels à la régénération épithéliale (147). En effet, on aurait observé une augmentation de l'expression du récepteur EGFR dans la région entourant la lésion (134, 137). Il a également été démontré que l'activation de l'EGFR stimulait la réparation épithéliale au niveau des alvéoles et des voies aériennes (83, 137, 140). J'ai donc décidé d'étudier l'implication de l'EGFR dans la régulation des mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire et bronchique. J'ai suspecté une dérégulation de l'activité de l'EGFR dans les tissus FK, étant donné que dans cette pathologie, les niveaux de ces facteurs de croissance sont élevés (84), mais ne semblent pas aider la régénération épithéliale.

Il a été démontré que les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire dépendent également des canaux ioniques. En effet, l'équipe du D<sup>r</sup> Schwab a suggéré que la mobilité cellulaire dépendait de cycles répétés de formation de pseudopode et de rétractation du pôle postérieur de la cellule (**voir figure 12**). Dans son modèle, ces phénomènes étaient régulés par la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que de la variation du volume cellulaire modulée par différents canaux ioniques, tels que le NHE1, les canaux K<sup>+</sup> et les aquaporines. En fait, les canaux K<sup>+</sup> seraient responsables de la phase de rétractation du pôle postérieur de la cellule via l'efflux de K<sup>+</sup> qui entraîne la réduction du volume cellulaire (135; **voir figure 12**). Les canaux K<sup>+</sup> semblent également impliqués dans la prolifération cellulaire. Il a été suggéré que l'efflux ionique par les canaux K<sup>+</sup> entraînerait une variation de la concentration du Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> et du volume cellulaire, qui sont considérés comme des signaux de prolifération (123). Il semblerait aussi que les canaux K<sup>+</sup> soient impliqués dans la progression du cycle cellulaire via l'hyperpolarisation de la

membrane cellulaire, la régulation des cyclines et la stimulation des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes, contrôlant le cycle cellulaire (145, 146, 148-150). Nous avons également décidé d'étudier le rôle des canaux  $K^+$  dans les mécanismes de réparation de l'épithélium respiratoire.

Dans plusieurs types cellulaires, il a été démontré que les phénomènes de prolifération et de migration, stimulés par des facteurs de croissance, semblent dépendre de l'activation des canaux  $K^+$  (159-163). À ce jour, la relation entre les canaux  $K^+$  et les facteurs de croissance n'avait pas encore été explorée au niveau de l'épithélium respiratoire. Le but de mon travail est donc l'étude de l'implication des canaux  $K^+$  et de l'EGF dans les processus de réparation de l'épithélium FK.

Mes hypothèses de recherche sont :

- 1) L'épithélium alvéolaire et bronchique sain possède la capacité de se réparer suite à une lésion mécanique selon un modèle établi dans le laboratoire du D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero. Cependant, nous avons posé l'hypothèse, comme le suggère l'équipe du D<sup>re</sup> Coraux, qu'il existe un problème et/ou délai de réparation au niveau de l'épithélium bronchique FK.
- 2) Si les facteurs de croissance peuvent réguler les processus de migration et de prolifération cellulaire, il semble logique que l'activation du récepteur EGFR pourrait jouer un rôle dans la réparation de l'épithélium alvéolaire et bronchique sain.
- 3) L'activité des canaux  $K^+$  peut réguler les processus de migration et de prolifération cellulaire dans d'autres types cellulaires. Il semble donc possible que les canaux  $K^+$  pourraient être impliqués dans la réparation de l'épithélium alvéolaire et bronchique sain via la stimulation des processus de migration et de prolifération cellulaire.
- 4) Si l'EGF et les canaux  $K^+$  modulent les processus de migration et de prolifération cellulaire et que dans d'autres types cellulaires, on a démontré qu'ils pouvaient coopérer, il semble alors possible qu'il existe une relation de couplage entre l'EGF et les canaux  $K^+$ .
- 5) Puisque l'activation du récepteur EGFR couplée à l'activité des canaux  $K^+$  est impliquée dans la réparation de l'épithélium alvéolaire et bronchique sain, j'ai

suspecté que le problème et/ou délai de réparation au niveau de l'épithélium bronchique FK pourrait être occasionné par une activité altérée de l'EGFR et des canaux  $K^+$ .



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

Les thèmes abordés dans les articles présentés dans les chapitres suivants sont le reflet des travaux que j'ai accomplis lors de ma maîtrise. Ces manuscrits mettent en évidence le rôle de l'EGF et des canaux  $K^+$  dans les processus de réparation de l'épithélium respiratoire. En effet, la régénération épithéliale constitue une option thérapeutique à ce jour peu connue et inexploitée pour des pathologies pulmonaires où les processus lésionnels au niveau de l'épithélium des voies aériennes et alvéolaire sont importants, telles que la fibrose kystique. Enfin, ces articles mettent l'emphase et soulignent l'importance de ces canaux  $K^+$  dans plusieurs phénomènes physiologiques au niveau du système respiratoire.

**3.1 Article 1:** Trinh NT, Privé A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noël J, Brochiero E. Involvement of KATP and KvLQT1  $K^+$  channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007, **293** (4):L870-82.

**Résumé :** Plusieurs pathologies pulmonaires, dont entre autre la fibrose kystique, présentent des lésions non-spécifiques au niveau de l'épithélium alvéolaire. D'où l'intérêt d'explorer dans cet article l'hypothèse que le rôle crucial des canaux  $K^+$  et l'EGF dans la réparation épithéliale alvéolaire. À l'aide d'un modèle de plaie mécanique, nous avons suivi la réparation de monocouches de cellules alvéolaires de type II (ATII) de rat en culture primaire au cours du temps. L'application d'un anticorps anti-EGF ou des inhibiteurs des tyrosines kinases AG825 et AG1478 des récepteurs du EGFR (erbB1) et du erbB2 réduit la refermeture des plaies. Ensuite, la migration cellulaire, mesurée en chambre de type Boyden, est stimulée par l'addition d'EGF exogène, mais également stimulée par des milieux conditionnés récupérés des monocouches lésées. Cet effet est renversé par l'addition d'anticorps anti-EGF indiquant la présence d'une boucle autocrine EGF-EGFR. L'activité du récepteur EGFR est également augmentée dans les monocouches lésées. Ces expériences démontrent que les processus de réparation des cellules ATII dépendent de

l'activation de l'EGFR. Nous avons aussi évalué l'implication des canaux  $K^+$  précédemment mis en évidence dans le laboratoire du D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero via l'étude de l'impact de modulateurs en condition de base et celle stimulée à l'EGF. L'application de l'activateur du canal  $K_{ATP}$  stimule la migration cellulaire alors que les inhibiteurs des canaux  $K^+$  réduisent les processus de réparation stimulés à l'EGF. De plus, nous avons démontré que l'activité et l'expression des canaux  $K^+$  étaient stimulées par l'EGF. Cette étude démontre pour la première fois que le couplage entre l'activité de l'EGFR et des canaux  $K^+$  joue un rôle crucial dans les processus de réparation épithéliale alvéolaire.

**Ma contribution :** Les premiers résultats préliminaires à l'origine de cet article avaient été obtenus avant mon arrivée, mais j'ai toutefois effectué une grande partie des expériences présentées dans cet article sous la supervision du D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero. J'ai également participé à la rédaction de ce manuscrit avec l'aide de ma directrice de recherche D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero.

**3.2 Article 2:** Trinh NT, Privé A, Maillé E, Noël J, Brochiero E. EGF and  $K^+$  channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008, **295** (5):L866-80.

**Résumé :** Puisque que nous avons établi que les canaux  $K^+$  et l'EGF étaient cruciaux pour la réparation épithéliale; dans cet article, nous avons voulu déterminer leur rôle dans la réparation de l'épithélium bronchique fibrose kystique (FK). À l'aide du même modèle de plaie mécanique développé lors du projet sur les cellules ATII, nous avons étudié les processus de réparation des lignées de cellules bronchiques saines (NuLi-1) et FK (CuFi-1). Nous avons d'abord démontré que les cellules FK montraient un délai de réparation de base. Tout comme la réparation épithéliale alvéolaire, les processus de réparation des cellules bronchiques dépendent de l'EGF. L'activité du récepteur EGFR de base et dans les monocouches lésées des cellules FK est également plus faible que celle des cellules saines. Nos expériences utilisant des milieux conditionnés suggèrent également que les cellules FK sécrètent moins d'EGF

que les cellules saines suite à une lésion. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la signalisation via le récepteur EGFR est défaillante dans les cellules FK, ce qui pourrait expliquer leur délai de réparation. Nous avons également étudié l'implication des canaux  $K^+$  par l'utilisation des modulateurs. En effet, les processus de réparation stimulés à l'EGF sont diminués suite à l'application des inhibiteurs des canaux  $K^+$ . Nous avons également montré que les canaux  $K^+$  étaient moins exprimés et moins actifs dans les cellules FK. Enfin, nous avons démontré que l'inhibition du canal CFTR ne semble pas être seul responsable de la différence de réparation entre les cellules saines et FK. Cette étude suggère que le retard de réparation observé chez les cellules FK est causé par une altération de l'activité du récepteur EGFR couplée à une diminution de l'activité et de l'expression des canaux  $K^+$ .

**Ma contribution :** J'ai effectué la plupart des expériences présentées dans cet article sous la supervision du D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero. Pour ce qui est des mesures de l'activité du récepteur EGFR, la manipulation s'est effectuée sous la supervision du D<sup>re</sup> Josette Noël de l'Université de Montréal. J'ai également participé à l'écriture de ce manuscrit, sous la direction de ma directrice de recherche D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero.

**3.3 Article 3:** Bardou O, Trinh NT, Brochiero E. Molecular diversity and function of  $K^+$  channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009, **296** (2):L145-55.

**Résumé :** Cet article est une revue qui porte sur la diversité moléculaire ainsi que la fonction des canaux  $K^+$  présents au niveau de l'épithélium respiratoire. Nous y présentons les 3 principales classes de canaux  $K^+$  : 1) les canaux constitués de six segments transmembranaire (*TMD, transmembrane domain*) dépendants du voltage ou activés par le calcium, 2) les canaux constitués de quatre TMD comportant deux pores et 3) les canaux constitués de deux TMD à rectification entrante. Nous décrivons les canaux de chacune de classe en spécifiant leur localisation tissulaire et/ou cellulaire. Nous exposons ensuite leur fonction au niveau de la physiologie

épithéliale respiratoire. Selon la littérature, les canaux  $K^+$  joueraient un rôle dans le processus d'échange gazeux, la stabilité alvéolaire, la réponse inflammatoire, le transport des fluides et des ions ainsi que dans la réparation épithéliale. Cette dernière section relate essentiellement les résultats obtenus dans le laboratoire du D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero, présentés dans les manuscrits I et II. Cet article permet de mieux comprendre l'énorme diversité moléculaire des canaux  $K^+$  en mettant l'emphase sur leurs multiples rôles soulignant ainsi leur importance dans différents phénomènes de la physiologie pulmonaire.

**Ma contribution :** J'ai participé à environ 30% du processus de rédaction de cet article, qui a été co-rédigé par un étudiant au doctorat Olivier Bardou et par ma directrice de recherche D<sup>re</sup> Emmanuelle Brochiero. J'ai également participé au processus de correction et de relecture.

## Involvement of $K_{ATP}$ and KvLQT1 $K^+$ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes

Nguyen Thu Ngan Trinh,<sup>1,2</sup> Anik Privé,<sup>1</sup> Lina Kheir,<sup>1</sup> Jean-Charles Bourret,<sup>1,2</sup> Tiba Hijazi,<sup>1</sup> Mohammad Gholi Amraei,<sup>3</sup> Josette Noël,<sup>3</sup> and Emmanuelle Brochiero<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal-Hôtel-Dieu, <sup>2</sup>Département de Médecine and <sup>3</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires, Département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Submitted 14 September 2006; accepted in final form 12 July 2007

**Trinh NT, Privé A, Kheir L, Bourret J-C, Hijazi T, Amraei MG, Noël J, Brochiero E.** Involvement of  $K_{ATP}$  and KvLQT1  $K^+$  channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L870–L882, 2007. First published July 13, 2007; doi:10.1152/ajplung.00362.2006.—Several respiratory diseases are associated with extensive damage of lung epithelia, and the regulatory mechanisms involved in their regeneration are not clearly defined. Growth factors released by epithelial cells or fibroblasts from injured lungs are important regulators of alveolar repair by stimulating cell motility, proliferation, and differentiation. In addition,  $K^+$  channels regulate cell proliferation/migration and are coupled with growth factor signaling in several tissues. We decided to explore the hypothesis, never investigated before, that  $K^+$  could play a prominent role in alveolar repair. We employed a model of mechanical wounding of rat alveolar type II epithelia, in primary culture, to study their response to injury. Wound healing was suppressed by one-half upon epidermal growth factor (EGF) titration with EGF-antibody (Ab) or erbB1/erbB2 tyrosine-kinase inhibition with AG-1478/AG-825. The addition of exogenous EGF slightly stimulated the alveolar wound healing and enhanced, by up to five times, alveolar cell migration measured in a Boyden-type chamber. Conditioned medium collected from injured alveolar monolayers also stimulated cell migration; this effect was abolished in the presence of EGF-Ab. The impact of  $K^+$  channel modulators was examined in basal and EGF-stimulated conditions. Wound healing was stimulated by pinacidil, an ATP-dependent  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$ ) activator, which also increased cell migration, by twofold, in basal conditions and potentiated the stimulatory effect of EGF.  $K_{ATP}$  or KvLQT1 inhibitors (glibenclamide, clofilium) reduced EGF-stimulated wound healing, cell migration, and proliferation. Finally, EGF stimulated  $K_{ATP}$  and KvLQT1 currents and channel expression. In summary, stimulation of  $K^+$  channels through autocrine activation of EGF receptors could play a crucial role in lung epithelia repair processes.

lung; adenosine 5'-triphosphate-stimulated potassium channel; KvLQT1  $K^+$  channels; epidermal growth factor; alveolar cell repair; migration; proliferation

RESPIRATORY PATHOLOGIES SUCH as adult respiratory distress syndrome or cystic fibrosis, characterized by dysfunctional ion ( $Na^+$  and  $Cl^-$ ) transport and fluid clearance, are also associated with extensive damage of airway and alveolar epithelia (4, 15, 18, 19, 42, 49). Several processes are sequentially engaged in pulmonary epithelia regeneration after injury: 1) spreading and migration of healthy cells, 2) proliferation, and 3) differentiation of stem cells (4, 15, 29, 42, 62). However, the external mediators and intracellular signals that control migra-

tion, proliferation, and differentiation processes are not clearly defined.

### Role of Growth Factors in Lung Epithelia Repair

After injury, surviving epithelial cells and fibroblasts potentially release proinflammatory cytokines and growth factors. Among them, hepatocyte growth factor (HGF) is synthesized predominantly by fibroblasts and macrophages, whereas epidermal growth factor (EGF) is expressed and secreted by fibroblasts and epithelial cells (2, 5, 37, 39, 49). Afterward, HGF and EGF act, respectively, via paracrine and autocrine pathways through HGF receptors (HGF-R or c-Met) and EGF receptors (EGF-R). EGF ligands (EGF, transforming growth factor- $\alpha$ , heparin-binding EGF-like growth factor, etc. . .) bind several subtypes of EGF-R, erbB1 (or HER1), erbB2, erbB3, and/or erbB4, which are expressed at the cell surface of pulmonary epithelial cells (2, 18, 37–39, 52, 61). After EGF ligand binding and autophosphorylation at its multiple COOH-terminal tyrosine residues, activated EGF-R transmit intracellular signals through docking sites for downstream signaling molecules (20). Activated EGF-R induce mitogenic, motogenic, and morphogenic cellular responses, which are crucial in the airway and alveoli epithelial repair process (5, 15, 28, 29, 38, 49, 50, 53). Unfortunately, in cystic fibrosis patients, for example, elevated endogenous levels of growth factors are not sufficient to protect lung epithelia from injury (49). Thus it will be important to develop other strategies to potentiate their effects.

### Role of $K^+$ Channels in Repair Processes

$K^+$  channels have been shown to play a major role in  $Cl^-$  and  $Na^+$  transepithelial transport through lung epithelia (10, 26, 27, 31, 33, 34). In alveolar monolayers, we demonstrated recently that ATP-dependent  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) and KvLQT1 channel activity regulated epithelial  $Na^+$  channel (ENaC) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity and expression as well as fluid absorption (27). In addition to this role in epithelial transport,  $K^+$  channels could also be important in the repair process of lung epithelia by regulating cell proliferation and migration. Indeed, several studies have demonstrated that  $K_{ATP}$  channels,  $Ca^{2+}$ -activated intermediate  $IK_{Ca}$  channels, and channels from the voltage-dependent Kv family modulate the proliferation of various cell types (6, 21, 24, 25, 32, 35, 36, 51, 54, 56, 57, 60). It has been postulated that  $K^+$

Address for reprint requests and other correspondence: E. Brochiero, Centre de Recherche, CHUM-Hôtel-Dieu, 3850 St-Urbain St., Montréal, Québec, Canada H2W 1T7 (e-mail: emmanuelle.brochiero@umontreal.ca).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

channel activity could affect cell proliferation by altering membrane potential, intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), cell volume and/or growth factor-mediated mitogenic signaling (17, 35, 55, 60). K<sub>ATP</sub>, K<sub>Ca</sub>, and K<sub>v</sub> K<sup>+</sup> channels also regulate the migration process in several cell types (11, 23, 30, 40, 43, 46, 47). The role of IK<sub>Ca</sub> channels in cell migration has been studied considerably. It has been proposed (44, 45, 47) that a rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and massive K<sup>+</sup> efflux through IK<sub>Ca</sub> channels causes shrinkage of the cell pole and induces retraction of the rear part of the migrating cell, promoting cell movement. Thus K<sup>+</sup> channels not only play a role in ion transport in lung epithelia but could also participate in repair processes. Up to now, the cell proliferation, migration, and repair functions of K<sup>+</sup> channel activity have never been explored in lung epithelia.

A coupling mechanism could link K<sup>+</sup> channel activity to growth factor signaling. It has been reported recently that EGF hyperpolarizes membrane potential through the modulation of K<sub>Ca</sub> channels in PC-12 cells (48). Such activation of K<sup>+</sup> channel activity and/or expression by EGF has also been demonstrated in mucous airway cells (22), corneal epithelial cells (41), myeloblastic cells (54), and vascular smooth muscle cells (VSMC; see Refs 21 and 25). Moreover, it has been shown that EGF-induced proliferation of corneal epithelial cells (41), VSMC (21, 25), myeloblastic cells (54, 60), and HGF-stimulated migration of Madin-Darby canine kidney (MDCK)-F cells (23) are dependent on K<sup>+</sup> channel activation. The relationship between K<sup>+</sup> channel activity and growth factor-stimulated cell proliferation and migration has, however, never been explored in pulmonary epithelia.

A better understanding of the cellular and molecular mechanisms, involved in repair processes of lung epithelia from *in vitro* models, may be crucial to elaborate strategies favoring the resolution of lung injuries that will be tested in the future on *in vivo* models. The aim of our *in vitro* study was to better characterize the role of EGF in the repair of alveolar monolayers after mechanical injury and in alveolar migration and proliferation. We also investigated, for the first time, the effects of K<sup>+</sup> channel modulators on these repair processes in basic conditions and after stimulation with EGF. Finally, the impact of EGF on K<sup>+</sup> currents and K<sup>+</sup> channel expression was explored.

## MATERIALS AND METHODS

### *Alveolar Epithelial Type II Cell Isolation and Primary Culture*

Alveolar epithelial type II (ATII) cells were isolated from adult male Sprague-Dawley rats (6–7 wk), according to a well-established protocol (14, 26). In brief, the lungs were washed to remove blood cells and alveolar macrophages before treatment with elastase. They were then minced, and the resulting suspensions were filtered. Alveolar cells were collected and purified by a differential adherence technique (12), which enhances the purity of the ATII cell pool to 86% (7, 26). This freshly isolated cell suspension was cultured on petri dishes or Costar Transwell permeant filters (1 × 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>; Costar Transwell, Toronto, ON) in minimal essential medium (MEM; Gibco, Invitrogen, Burlington, Toronto) containing 10% FBS (Gibco, Invitrogen), 0.08 mg/l gentamicin, sepra (3 μg/ml trimethoprim + 17 μg/ml sulfamethoxazole), 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine, as described previously (26). This MEM-FBS-sepra medium was replaced after 3 days by the same MEM-FBS without sepra.

### *Wound Healing*

Alveolar epithelial cells, cultured for 3 days in MEM-FBS medium on petri dishes, were injured mechanically with a P10 Gilson pipette tip. After injury, the monolayers were washed with MEM-FBS to remove detached, injured cells. The monolayers were then photographed with a NIKON camera under light microscopy after varied repair times (0, 24, and 48 h) in control conditions and in the presence of the K<sup>+</sup> channel modulators 25 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) and 5 μg/ml anti-EGF antibody (EGF-Ab; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and selective inhibitors of erbB1 (tyrphostin AG-1478, 10 μM; Sigma-Aldrich) and/or erbB2 (tyrphostin AG-825, 10 μM; Sigma-Aldrich) receptors.

Wound width was measured by ImageJ software and represented as percentage of the initial wound width. At the end of the experiment, the monolayers were fixed and processed for alkaline phosphatase assay to identify epithelial ATII cells as described previously (7). Briefly, the cells were fixed for 30 s at room temperature in cold paraformaldehyde/acetone solution [4% paraformaldehyde (wt/vol), 0.02% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wt/vol), 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (wt/vol), 45% acetone (vol/vol), pH 6.6], rinsed for 1 min in distilled water, and air-dried. Fixed cells were incubated for 90 min at 37°C in a fresh staining solution containing 0.05% Fast Blue BB salt in stock staining solution (30 mg naphthol-AS-phosphate in 0.5 ml *N,N*-dimethylformamide filled up to 100 ml with 0.2 M Tris base). The samples were then rinsed with distilled water for 1 min and air-dried. The cells were counterstained with 0.1% neutral red solution for 3 min at room temperature, rinsed for 1 min, air-dried, and photographed.

Conditioned media were also collected for migration assay. Briefly, alveolar monolayers were cultured for 3 days in MEM-FBS medium on petri dishes. A first group of petri dishes was washed three times with FBS-free MEM; one-half of them was injured mechanically, whereas the other half was not. All petri dishes were then washed with FBS-free MEM to remove detached or injured cells. The “wounded” or “unwounded”, FBS-free conditioned media were collected after 1 h. The same protocol was repeated with a second group of petri dishes in the presence of MEM-FBS to obtain wounded or unwounded complete MEM-FBS conditioned media.

### *Time-Lapse Experiments*

Time-lapse images were taken with a ×10 objective and an Olympus microscope at 5-min intervals with a digital camera connected to a microscope over a 12-h time period. Small wounds (half-size compared with standard wound-healing experiments) were performed to reduce the duration of these experiments. Complete closure was observed after ~12 h.

### *Cell Migration in Boyden-Type Chamber*

Alveolar cells were cultured on plastic supports for 2 days in MEM-FBS medium, washed in PBS, and separated with trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen). Cell suspensions were collected by centrifugation, and the cells were suspended in FBS-free MEM and counted. Cell viability after trypsinization was verified with Trypan blue. In addition, an alkaline phosphatase test was employed to verify the ATII phenotype of these cells. Briefly, an aliquot of cell suspension was seeded on plastic supports. After adherence, the cells were fixed and subjected to alkaline phosphatase assay, as described above. About 90% of the cells were positive, which indicated that the trypsinization of ATII cells did not affect their phenotype. For the migration assay, the cell suspension obtained after trypsinization was placed (150,000 and 75,000 cells for 6 and 24 h migration, respectively) in the upper compartment of 8-μm pore filters (0.33 cm<sup>2</sup>, Thin Certs-TC inserts, Greiner Bio-one; MJS Biolynx, Brockville, ON). The lower compartment was filled with FBS-free MEM in the presence or absence of the K<sup>+</sup> channel modulators EGF or EGF-Ab. After a 6- or 24-h migration period, the filters were washed with PBS, and

migrating cells that passed through the lower face of the filters were fixed with a paraformaldehyde/acetone solution and stained overnight with crystal violet (0.1% in 20% methanol). After some washings, nonmigrating cells of the upper compartment were scraped off with Q-Tips (Fischer, Napean, ON). The filters were examined by microscopy at  $\times 40$  enlargement, and cells that had migrated were counted in five different fields.

In migration assays with conditioned medium, alveolar cell suspensions were resuspended in FBS-free MEM or MEM-FBS media and placed in the upper compartment of the filters. The lower compartment was filled with the relevant wounded or unwounded FBS-free MEM or MEM-FBS conditioned medium (see *Wound Healing*) in the presence or absence of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EGF-Ab.

#### Cell Proliferation

Freshly isolated alveolar cells were seeded at low density (150,000 cells/well) in 12-well cell culture clusters (Costar; Corning, Corning, NY) and cultured for 3 days in MEM-FBS-septum medium (until 50% confluence). On *day 3*, the culture medium was replaced by MEM-FBS medium containing 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [<sup>3</sup>H]thymidine (MP Biomedical, Irvine, CA) in the presence of the K<sup>+</sup> channel modulators EGF or EGF-Ab. After a 24-h period, the [<sup>3</sup>H]thymidine medium was removed by inversion and replaced by ice-cold trichloroacetic acid (TCA 5%, 5–10 min). TCA was then discarded, and the plates were washed in three successive ice-cold water baths. The cells were lysed with 0.1 N NaOH, transferred to scintillation tubes, and counted (Bq/cm<sup>2</sup>) in a beta counter (Tri-carb, 1600TR liquid scintillation analyzer; Canberra Packard). Protein contents were estimated by Coomassie blue assay (Bradford, Pierce, Rockford, IL) of an aliquot of each sample. [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was corrected for protein content and presented as a percentage of control values (without modulators).

#### Immunoblotting

Total proteins were extracted from alveolar cells (obtained from at least 4 different rats), cultured on plastic dishes for 3 days, and treated or not with EGF or EGF-Ab. In some experiments, the monolayers were wounded 30 min before protein extraction.

For the detection of phosphorylated forms of EGF-R (p-EGF-R or p-erbB1) and erbB2, the monolayers were washed two times with ice-cold PBS, and proteins were extracted after cell scraping in the presence of 3 $\times$  hot (95°C) Laemmli buffer (15%  $\beta$ -mercaptoethanol, 7.5% SDS, 30% glycerol, 300 mM Tris·HCl, pH 6.8, bromophenol blue) for immediate inhibition of cellular proteases and phosphatases. Protein contents were estimated in an equivalent cell preparation after extraction with 1 N NaOH. Proteins (200–400  $\mu\text{g}$ ) were separated by SDS-PAGE (7.5%) and transferred to Hybond C extra nitrocellulose membranes (Amersham/GE, Baie D'Urfé, QC). The nitrocellulose membranes were first incubated with 4% fraction V BSA in TBS containing Tween 20 (TBST, 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The erbB1 and erbB1 phosphorylated on tyrosine-1148 or -845 as well as erbB2 and erbB2 phosphorylated on tyrosine-877 were then blotted with a 1:1,000 dilution of commercially available specific antibodies in TBST plus 2% fraction V BSA [erbB1 (no. 2232; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA), phosphorylated (p)-EGF-R<sup>1148</sup> (no. 4404; Cell Signaling Technologies), p-EGF-R<sup>845</sup> (no. 2231; Cell Signaling Technologies), and erbB2 (no. E3451-27; USBiological)] for at least 2 h at room temperature and detected with goat horseradish peroxidase-labeled rabbit immunoglobulins (Jackson Immunoresearch). Ponceau staining was performed, and  $\beta$ -actin protein was revealed with the monoclonal AC15 antibody at a 1:50,000 dilution (Sigma-Aldrich) to ensure equivalent loading.

For KvLQT1 and Kir6.1 K<sup>+</sup> channel detection (27), the cells were detached by gentle scraping, and the cell suspension was centrifuged

at 2,800 g at 4°C for 15 min. The cell pellet was solubilized in lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl, pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail; Roche, Mannheim, Germany)] for 1 h on ice and centrifuged at 12,000 g for 15 min. The supernatants were collected, and protein contents were measured. The proteins were then solubilized at 95°C for 5 min in 2 $\times$  sample buffer (62.5 mM Tris·HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.2% bromophenol blue, and 4%  $\beta$ -mercaptoethanol). Proteins (40  $\mu\text{g}$ ) were separated by SDS-PAGE (7.5%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were first blocked with 10% dried milk in TBST for 1 h at room temperature and then stained with commercial polyclonal anti-Kir6.1 (dilution 1:200, sc-11224; Santa Cruz Biotechnology), or anti-KvLQT1 (dilution 1:500, sc-10645; Santa Cruz Biotechnology) in TBST plus 10% milk for 16 h at 4°C. After being washed with TBST, the membranes were incubated with a donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) linked to horseradish peroxidase for 1 h. Proteins were revealed by chemiluminescence reagent (ECL Plus; Amersham) and exposed to Kodak Biomax light film. The anti-Kir6.1 and anti-KvLQT1 antibodies, respectively, recognized an ~50- and 75-kDa protein (27). The specificity of anti-Kir6.1 and anti-KvLQT1 antibodies was verified with their respective blocking peptide (sc-11224P and sc10645P; Santa Cruz Biotechnology; see Ref. 27). Ponceau staining was also performed, and  $\beta$ -actin protein was revealed with a purified mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal Ab (dilution 1:2,500, CLT9001; Cedarlane Laboratory Limited) to ensure equivalent loading. The intensity of each specific band corresponding to K<sup>+</sup> channel protein was quantified with ImageJ software and normalized to the  $\beta$ -actin signal.

#### Semiquantitative PCR

**RNA purification.** Total RNA from alveolar epithelial cells cultured on filters for 4 days was purified with TRIzol reagent according to the manufacturer's (Invitrogen) instructions.

**PCR amplification of ionic channels.** Total RNA (5  $\mu\text{g}$ ) purified from cultured alveolar epithelial cells (on permeant filters) was reverse transcribed to cDNA with Moloney murine leukemia virus RT (Invitrogen) in the presence of oligo(dT) primers. cDNAs were amplified with Taq polymerase (Invitrogen), employing specific primers designed from sequences of the following cloned K<sup>+</sup> channels: rat KvLQT1 (sense: 5'-cccatctcagaaaagcaaa-3', antisense: 5'-tcttggtgagctccagattc-3', 1  $\mu\text{M}$  final concentration of each, 462-bp PCR product) and rat Kir6.1 (sense: 5'-cgccccggggacatctatgc-3', antisense: 5'-aggggctacgttatcaat-3', 1  $\mu\text{M}$  final concentration of each, 544-bp PCR product). EGF expression was also evaluated using the rat EGF primer pair (sense: 5'-gaaggagtagacagccaga-3', antisense: 5'-tgggtgacctacatcgttct-3', 1  $\mu\text{M}$ , 408-bp PCR product). Finally, the  $\beta$ -actin primer pair (sense: 5'-ctaggccaaccgtgaaaag-3' and antisense: 5'-gccatctcttctcgaagtc-3', 0.25  $\mu\text{M}$ ) amplified a 311-bp product (7, 27). Primer pairs were designed in distinct exons to avoid genomic DNA amplification. Semiquantitative RT-PCR amplification was undertaken according to a well-established laboratory protocol (7, 26, 27). Briefly, cDNA amplification curves as a function of the number of amplification cycles were first charted for each primer pair to define the optimum number of cycles in the linear phase of amplification. The KvLQT1 product was amplified for 24 cycles and Kir6.1 for 30 cycles, whereas  $\beta$ -actin amplification was stopped after 17 cycles. Because  $\beta$ -actin amplification remains stable under all test conditions, even in the linear phase of amplification (26), PCR products were normalized with the  $\beta$ -actin signal for each cDNA sample. The RT-PCR products were finally separated on agarose gels, stained with ethidium bromide, and analyzed with the Typhoon Gel Imager (7, 26, 27).

**Electrophysiology.** The electrophysiological characteristics of alveolar monolayers were studied by short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber (26, 27). First, alveolar epithelial cells were cultured on filters (4 cm<sup>2</sup>; Costar Transwell) for 3 days until they

formed a tight epithelium ( $>1,200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). The monolayers were then treated or not for 24 h with EGF. After being washed, the alveolar monolayers were mounted in a heated (37°C) Ussing chamber and perfused on the apical and basolateral sides with warm physiological solution. To quantify the amount of active K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane after treatment with EGF,  $I_{sc}$  was measured after establishment of a K<sup>+</sup> gradient and permeabilization of the apical membrane with 7.5  $\mu\text{M}$  amphotericin B. The apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient was created by bathing the apical side with a high-K<sup>+</sup> physiological solution [containing (in mM): 81 NaCl, 65.4 KCl, 0.78 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 15 HEPES, pH 7.4], whereas, for the basolateral side, 60 mM of KCl was replaced by an equivalent amount of *N*-methyl-D-glucamine chloride. Trans-epithelial potential difference was clamped to zero by an external voltage-clamp amplifier (VCCMC2; Physiological Instruments) with KCl agar-calomel half-cells and Ag-AgCl electrodes, and the resulting  $I_{sc}$  was recorded continuously on a computer with a PowerLab system (ADInstrument, Toronto, ON; see Ref. 26). Membrane resistance was verified with 1-mV pulses every minute.

**Statistics** The data are represented as means  $\pm$  SE collected from at least four different animals ( $n > 4$ ). Comparison between groups was made by paired *t*-test or one-group *t*-test with StatView software (SAS Institute, Cary, NC). A probability of  $P < 0.05$  was considered to be significant ( $P$  values were reported for each experiment).

## RESULTS

### Wound Healing of Alveolar Monolayers

To study the regulatory mechanisms of injury responses and repair processes of alveolar epithelia, we adapted a model of wound injury to primary cultured alveolar cell monolayers. A mechanical injury protocol was chosen because it gave more standardized and reproducible results than chemical injury in our cell model. The wound healing of alveolar monolayers, cultured in an undefined MEM-FBS medium (MEM supplemented with FBS) on plastic supports, was followed over a 48-h period (Fig. 1A). We found

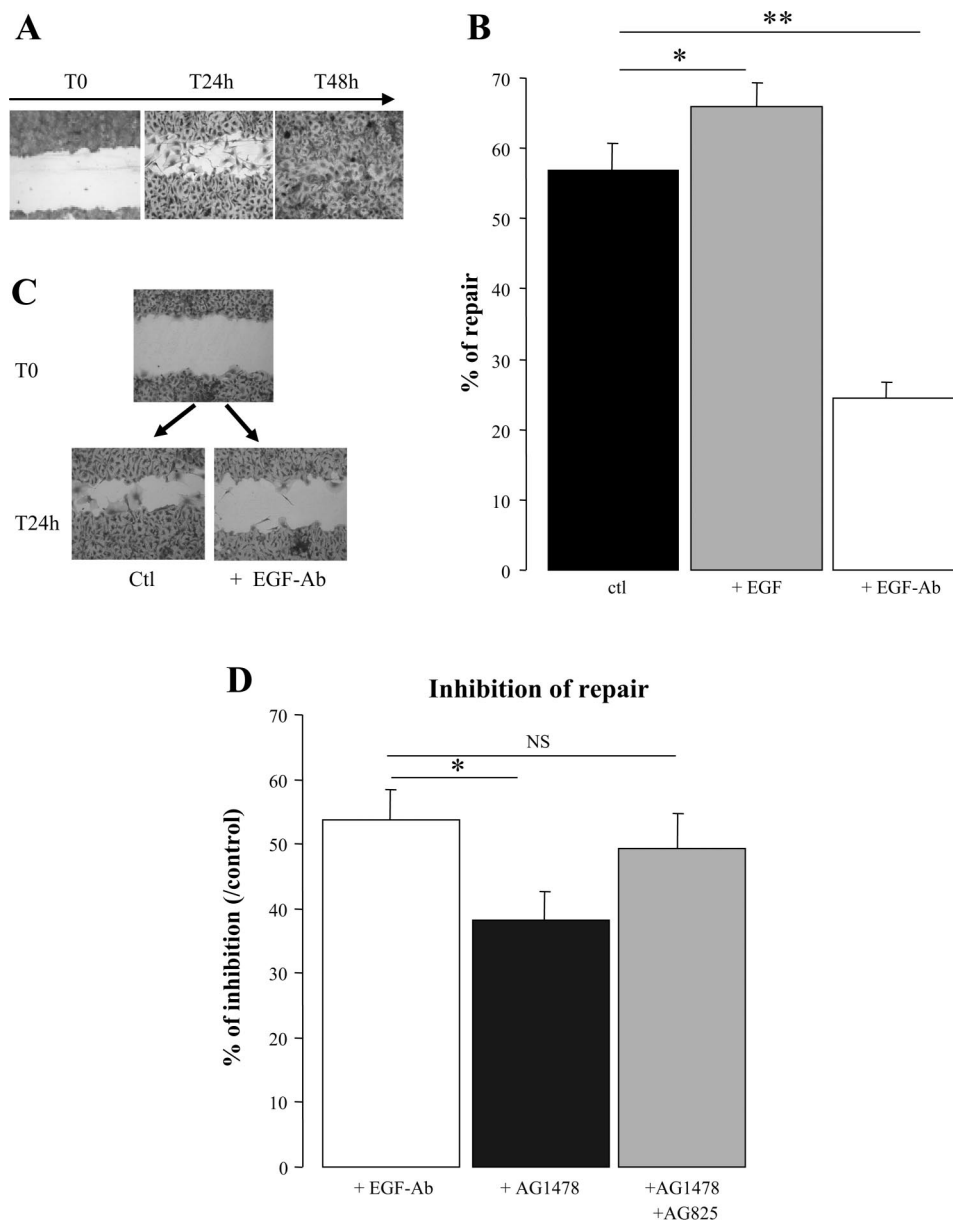


Fig. 1. Effect of epidermal growth factor (EGF) on alveolar wound healing. Alveolar epithelial cells in primary culture (for 3 days) were injured mechanically, and wound healing was followed over a 24- to 48-h period. Photographs of alveolar monolayers taken just after wounding [*time* (*T*) 0] and at 24 h (T24h) and 48 (T48h) h of repair are shown in A. Monolayers were stained with alkaline phosphatase and counterstained with neutral red. In B, the percent of repair, after mechanical injury, was compared in control monolayers ("ctl", MEM-FBS medium) and monolayers treated with EGF ("+EGF", MEM-FBS + 25 ng/ml EGF,  $n = 31$ ,  $*P = 0.002$ ) and anti-EGF antibody ("+EGF-Ab", MEM-FBS + 5  $\mu\text{g/ml}$  EGF-Ab,  $n = 28$ ,  $**P < 0.0001$ ). Images of alveolar monolayers taken just after wounding (T0) and at 24 h of repair in control ("T24h") and EGF-Ab-treated ("T24h + EGF-Ab") conditions are shown in C. The inhibitory effects of EGF-Ab and of the specific inhibitors of erbB1 and erbB2 receptors (AG-1478 and AG-825, respectively) were then compared. Inhibition of repair by EGF-Ab (MEM-FBS + 5  $\mu\text{g/ml}$  EGF-Ab,  $n = 28$ ), AG-1478 (MEM-FBS + 10  $\mu\text{M}$  AG-1478,  $n = 5$ ), and AG-1478 + AG-825 (MEM-FBS + 10  $\mu\text{M}$  AG-1478 + 10  $\mu\text{M}$  AG-825,  $n = 5$ ) compared with control non-treated monolayers is shown in D. NS, not significant.  $*P = 0.03$ .



54 ± 3% repair at 24 h after injury and 94.1 ± 2.4% at 48 h (Fig. 1A). We decided in future experiments to study the regulation of alveolar repair at 24-h postinjury to be able to observe a decrease and increase in cell repair. The presence of FBS in culture medium was crucial since an FBS starvation for 24 h affected monolayer integrity and dramatically reduced wound healing (15.5 ± 4.2% repair after 24 h, *n* = 4). Future wound-healing experiments were then performed in the presence of MEM-FBS medium.

The role of EGF in alveolar monolayer repair was first explored. The addition of EGF to the culture medium during wound healing slightly increased repair at 24 h (56.8 ± 3.9 and 66.0 ± 3.4% repair in the absence and presence of EGF, respectively, *n* = 31, *P* = 0.002, Fig. 1B). In the absence of exogenous EGF addition, incubation with an anti-EGF-Ab, which binds free EGF (contained in FBS or potentially released by injured alveolar cells), reduced wound healing at 24 h by one-half (*n* = 28, *P* = 0.001, Fig. 1, B-D). These results are consistent with an EGF autocrine pathway (16).

Because other ligands, such as TGF- $\alpha$  or HB-EGF, could be involved in EGF-R signaling, we tested the impact on wound healing of erbB1 and erbB2 receptor inhibition by using tyrphostin AG-1478 and AG-825, respectively. AG-1478 (10  $\mu$ M) significantly reduced wound healing; however, the observed inhibition was smaller (38.2 ± 4.4% inhibition, *n* = 5) than that measured in the presence of EGF-Ab (*P* = 0.03, Fig. 1D). Inhibition of both erbB1 and erbB2 receptors, in the presence of AG-1478 and AG-825, reduced alveolar repair by 48.2 ± 6.1% (*n* = 5), an effect comparable to that of EGF-Ab (difference: 5.9 ± 5.3%, *P* = 0.3, not significant). These results suggested that, in our experimental conditions, alveolar repair regulation by erbB1 signaling (and to a lesser extent, erbB2) is mostly the result of their activation through EGF. For this reason, we focused our study on EGF ligand in future experiments.

#### Activation of EGF-R Upon Injury Through an Autocrine EGF Loop

Because EGF-Ab reduced wound healing probably through binding to secreted EGF, we first verified the EGF expression in alveolar epithelial cells. As shown in Fig. 2A, the rat EGF primer pair amplified, as expected, a 408-bp product from the cDNA of primary cultured epithelial alveolar cells.

Because wound repair was sensitive to erbB1 and erbB2 inhibitors, the presence of these two receptors was explored by Western blotting. Although erbB1 was consistently detected with 200  $\mu$ g protein (Fig. 2B), erbB2 was barely detectable (data not shown). These results are in accord with the negligible effect of AG-825 when applied alone. Activation of the erbB1 receptor, estimated by the phosphorylation level of tyrosine-1148 or -845 (p-EGF-R<sup>1148</sup> and p-EGF-R<sup>845</sup>), was evaluated by immunoblotting. As shown in Fig. 2C, the erbB1 receptor of alveolar cells cultured on petri dishes was phosphorylated upon EGF stimulation (10 min), whereas 24 h treatment with EGF-Ab decreased the level of phosphorylation. The impact of injury on EGF-R phosphorylation was also evaluated. In this experiment, alveolar monolayers were injured mechanically as usual, and proteins were extracted after 30–60 min. ErbB1 phosphorylation was enhanced in wounded compared with intact monolayers (Fig. 2D). A smaller stimu-

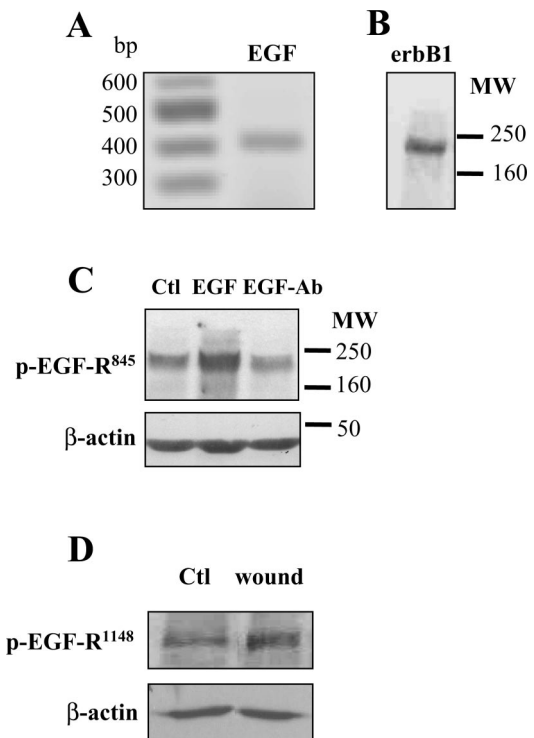


Fig. 2. Activation of EGF-receptor upon injury and EGF stimulation. A: representative agarose gel showing the PCR product amplified by the rat EGF primer pair from alveolar cell cDNA. B: erbB1 protein expression was detected by Western blotting. MW, mol wt. The erbB1 tyrosine phosphorylation was compared by immunoblotting, using phosphorylated (p)-EGF-R<sup>1148</sup> and p-EGF-R<sup>845</sup> antibodies in intact monolayers cultured in control conditions (C and D), in the presence of EGF-Ab (5  $\mu$ g/ml, 24 h, *n* = 5; C), or stimulated for 10 min before protein extraction with EGF (EGF, 25 ng/ml, *n* = 5; C) as well as in injured monolayers ("wound," the injured area represents 10–13% of the total surface, *n* = 3; D).  $\beta$ -Actin protein was revealed after antibody stripping to ensure equivalent loading.

lation of erbB2 was observed in some wounded monolayers (data not shown). These results support EGF autocrine loop involvement in alveolar wound healing.

#### Effect of K<sup>+</sup> Channel Modulators on Alveolar Wound Healing

We recently identified the presence of functional K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and IK<sub>Ca</sub> channels in alveolar cells (26, 27). The impact of K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and IK<sub>Ca</sub> channel modulators was explored on wound healing of alveolar monolayers under basic and EGF-stimulated conditions. We observed that the presence of pinacidil (100  $\mu$ M, an efficient dose to stimulate K<sub>ATP</sub> when added in acute or chronic protocols; see Ref. 27), applied just after injury, did not significantly modify wound repair measured at 24 h (Fig. 3A) under basic conditions (without EGF) and after exogenous EGF addition (with EGF). On the other hand, K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 inhibitors [glibenclamide (15  $\mu$ M) and clofilium (5  $\mu$ M), respectively] slightly reduced basic (Fig. 3A, left) and EGF-stimulated (Fig. 3A, right) wound repair. Applied in combination, these inhibitors severely inhibited alveolar repair in basic (65.5 ± 6.2% in untreated monolayers vs. 31.1 ± 7% in glibenclamide + clofilium-treated monolayers, *n* = 8, *P* = 0.0003; Fig. 3A, left) and EGF-stimulated (74.4 ± 5.6% in untreated monolayers vs. 40.4 ± 6.8% in

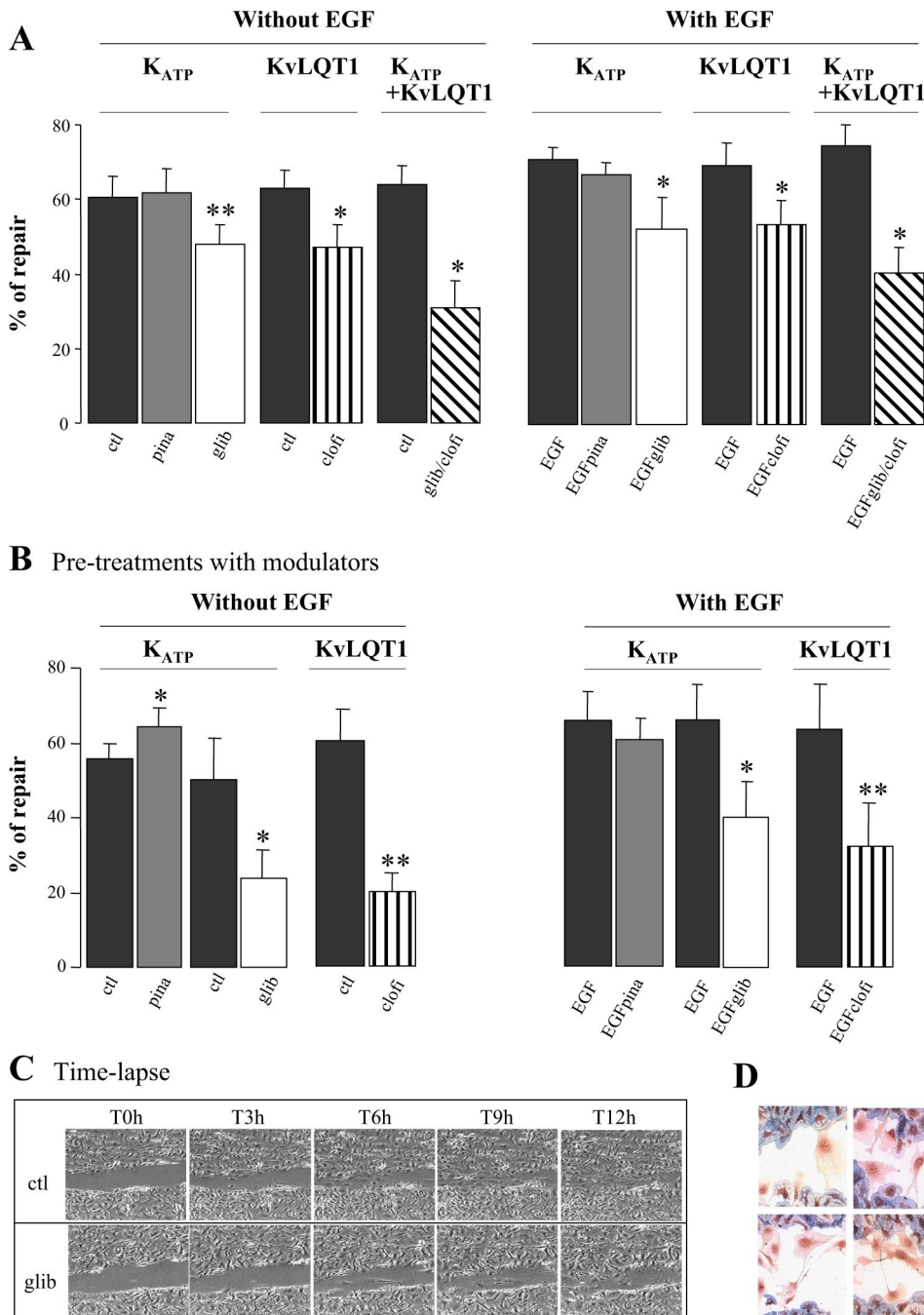


Fig. 3. Effect of K<sup>+</sup> channel modulators on wound healing. *A*: alveolar epithelial cell monolayers were injured mechanically, and the percentage of wound healing measured after 24 h was compared with control monolayers (“ctl”, MEM-FBS medium) and monolayers treated with pinacidil [an activator of ATP-dependent K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels, “pina”, 100 μM, *n* = 13], glibenclamide (an inhibitor of K<sub>ATP</sub> channels, “glib”, 15 μM, *n* = 13), clofilium (an inhibitor of KvLQT1 channels, “clofi”, 5 μM, *n* = 14), or a combination of glibenclamide plus clofilium (“glib/clofi”, *n* = 8) in the absence (*left*) or presence (*right*) of EGF (25 ng/ml). \**P* < 0.02 and \*\**P* < 0.0001. In *B*, alveolar epithelial cell monolayers were pretreated with pinacidil (100 μM, *n* = 13), glibenclamide (15 μM, *n* = 6), or clofilium (5 μM, *n* = 6) for 24 h before injury. Monolayers were then wounded, and the percentage of repair measured after 24 h was compared in control monolayers and pinacidil-, glibenclamide-, or clofilium-treated monolayers in the absence (*left*) or presence (*right*) of EGF (25 ng/ml). \**P* < 0.02 and \*\**P* < 0.002. *C* shows time-lapse images taken at 0, 3, 6, 9, and 12 h after injury in control and glibenclamide-treated alveolar monolayers. Small wounds (half size compared with wounds in Fig. 1) were produced in these experiments to reduce the duration of the time-lapse experiments. In these conditions, complete closure was observed after ~12 h. Enlargements of wounded alveolar monolayers during repair are presented in *D*. Cells in the wound are undifferentiated (absence of blue, alkaline phosphatase activity) and spread, and lamellipodia stretch out to connect the wound edges. Some cells with 2 nuclei are in division after 24 h.

glibenclamide + clofilium-treated monolayers, *n* = 8, *P* = 0.004; Fig. 3*A*, *right*) conditions. Inhibitors of IK<sub>Ca</sub> channels (charybdotoxin or Tram-34) were without effect (data not shown).

We noted a higher contribution of K<sup>+</sup> channel modulators on the repair capacity of alveolar cells when the monolayers were first pretreated with these agents 24 h before wounding. In the absence of EGF, pinacidil (100 μM) slightly enhanced alveolar repair (55.5 ± 4.2% in untreated monolayers vs. 64.2 ± 5% in pinacidil-treated monolayers, *n* = 13, *P* = 0.013, Fig. 3*B*, *left*). However, we observed that pinacidil did not further enhance wound healing in EGF-stimulated conditions (Fig. 3*B*, *right*). This absence of additional stimulatory effect

of EGF and pinacidil suggested that they could share a common pathway. Inhibition of K<sub>ATP</sub> or KvLQT1 channels with 15 μM glibenclamide or 5 μM clofilium reduced wound healing at 24 h by 40–60% in basic (Fig. 3*B*, *left*) and EGF-stimulated (Fig. 3*B*, *right*) conditions. As seen in the absence of pretreatments, charybdotoxin and Tram-34 had no effect on basic and EGF-stimulated wound healing (data not shown). Finally, we verified that the vehicle (DMSO) had no effect on wound healing.

The inhibitory effect of glibenclamide was also evaluated in time-lapse experiments under videomicroscopy. In these experiments, time-lapse images of wound healing in alveolar monolayers treated or not for 24 h with glibenclamide were

taken at 5-min intervals over a 12-h period. Observation of video 1 (control condition, *time 0–7 h* after injury) and video 2 (15  $\mu$ M glibenclamide, *time 0–7 h* after injury) confirmed that inhibition of K<sub>ATP</sub> channels severely reduced alveolar cell motility and the rate of repair (Supplemental material for this article can be found at the *American Journal of Physiology: Lung, Cellular and Molecular Physiology* website). Figure 3C shows images taken 3, 6, 9, and 12 h after injury.

#### Effect of EGF and K<sup>+</sup> Channel Modulators on Alveolar Cell Migration and Proliferation

In a previous paper (7), we have reported that ATII cells progressively changed their phenotype in primary culture (decrease of surfactant protein expression and alkaline phosphatase activity, a marker of ATII cells). However, as shown in Fig. 3D, enlargement of the injured monolayer labeled for alkaline phosphatase activity revealed that intact cells still developed alkaline phosphatase activity (cells stained in blue). Conversely, alveolar cells in the wound changed their phenotype with a more widespread appearance and absence (red cells) of alkaline phosphatase activity. Similarly, it has been established in vivo that alveolar repair involves transdifferentiation from ATII cells onto ATI cells as well as cell migration and proliferation (3, 15). In our in vitro model, we observed 24 h after injury (Fig. 3D) that lamellipodia of some of the dedifferentiated cells stretched out to connect the wound edges, indicating a migratory process. Cell mitosis could also be seen by the presence of two nuclei in some cells.

Because wound healing was regulated by EGF and K<sup>+</sup> channel activity, we decided to evaluate their effect on migration and proliferation processes involved in epithelial repair. Migration of ATII cells was first measured over a 6-h period in a Boyden-type migration chamber, in the presence of FBS-free and EGF-free MEM in both the upper and lower compartments. We first observed that FBS addition, in the lower compartment or in both the lower and upper compartments, enhanced the number of migrating cells by sixfold ( $n = 10$ ,  $P = 0.006$ ) or ninefold ( $n = 10$ ,  $P = 0.012$ ), respectively. The addition of EGF-Ab (5  $\mu$ g/ml) decreased by 50% the number of migrating cells measured in the presence of FBS, suggesting that part of the FBS stimulatory effect was because of the presence of EGF in FBS medium. For better control of medium composition, further migration experiments were performed in the absence of FBS.

The stimulatory effect of exogenous EGF was then evaluated. As illustrated in Fig. 4A, addition of EGF in FBS-free medium induced fourfold ( $n = 15$ ,  $P = 0.006$ , Fig. 4A) increases in cell migration. The hypothesis that EGF release by injured cells stimulates cell migration was then explored. In this experiment, conditioned FBS-free MEM, collected from alveolar monolayers 1 h after injury, was applied in the lower compartment of the Boyden-type chamber. The conditioned medium increased the number of migrating cells by threefold (Fig. 4B, compare bars 1 and 2,  $n = 6$ ,  $P = 0.026$ ); the stimulatory effect was completely abolished by the presence of EGF-Ab in the lower compartment (Fig. 4B, bar 3,  $n = 6$ ,  $P = 0.035$ ). This observation favors an autocrine EGF loop modulating cell migration and wound healing through activation of EGF-R following EGF release after injury. The presence of conditioned medium from noninjured monolayers did not sig-

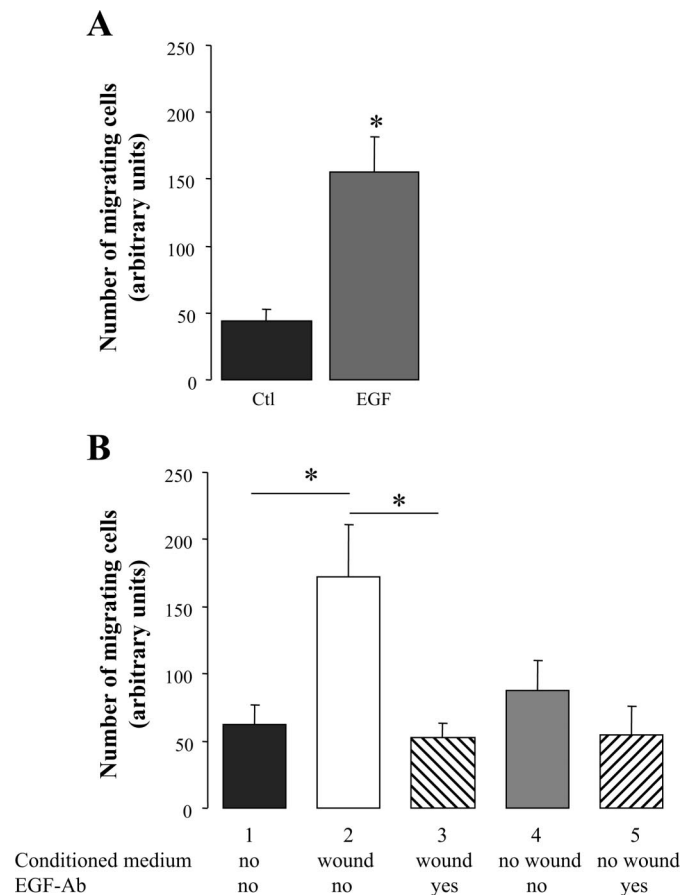


Fig. 4. Effect of EGF and conditioned medium from injured monolayers on alveolar cell migration. *A*: no. of migrating cells was measured over a 6-h period in a Boyden chamber in control conditions (FBS-free MEM) and in the presence of EGF (FBS-free MEM + EGF 25 ng/ml);  $n = 15$ . *B*: conditioned, FBS-free medium from injured monolayers (wound, collected 1 h after injury,  $n = 6$ ) or noninjured monolayers ("no-wound,"  $n = 6$ ) was applied in the lower chamber in the presence ("yes") or absence ("no") of EGF-Ab (5  $\mu$ g/ml). \* $P < 0.04$ .

nificantly augment cell migration, even if a tendency toward an increase was found (Fig. 4B, bars 4 and 5).

The impact of K<sup>+</sup> channel modulators on the phenomenon was then explored. The mean number,  $43 \pm 12$ , of migrating cells after 6 h in control conditions was enhanced to  $91 \pm 21$  cells in the presence of pinacidil in the lower chamber (2.2-fold increase,  $n = 5$ ,  $P = 0.0008$ , Fig. 5A). Conversely, glibenclamide and clofilium diminished alveolar cell migration by  $76 \pm 7\%$  ( $n = 5$ ,  $P = 0.0005$ ) and  $56 \pm 6\%$  ( $n = 5$ ,  $P = 0.0012$ ) when compared with their respective control (Fig. 5A). We then tested the effect of K<sup>+</sup> channel modulators on EGF-stimulated cell migration (Fig. 5B). We noted that pinacidil slightly potentiated the effect of EGF. However, pinacidil stimulation in the presence of EGF ( $33 \pm 8\%$  increment at 6 h,  $n = 5$ ,  $P = 0.01$ ; Fig. 5B) was smaller than the 2.2-fold increase observed in the absence of EGF (Fig. 5A), suggesting that EGF and pinacidil stimulation was mostly the result of the same pathway. Conversely, EGF-induced cell migration was reduced with glibenclamide ( $44 \pm 13\%$  inhibition,  $n = 5$ ,  $P = 0.03$ ) or clofilium ( $39 \pm 11\%$  inhibition,  $n = 6$ ,  $P = 0.02$ ; Fig. 5B). Cell migration was also evaluated over a longer period of time (24 h), corresponding to the duration of wound-healing

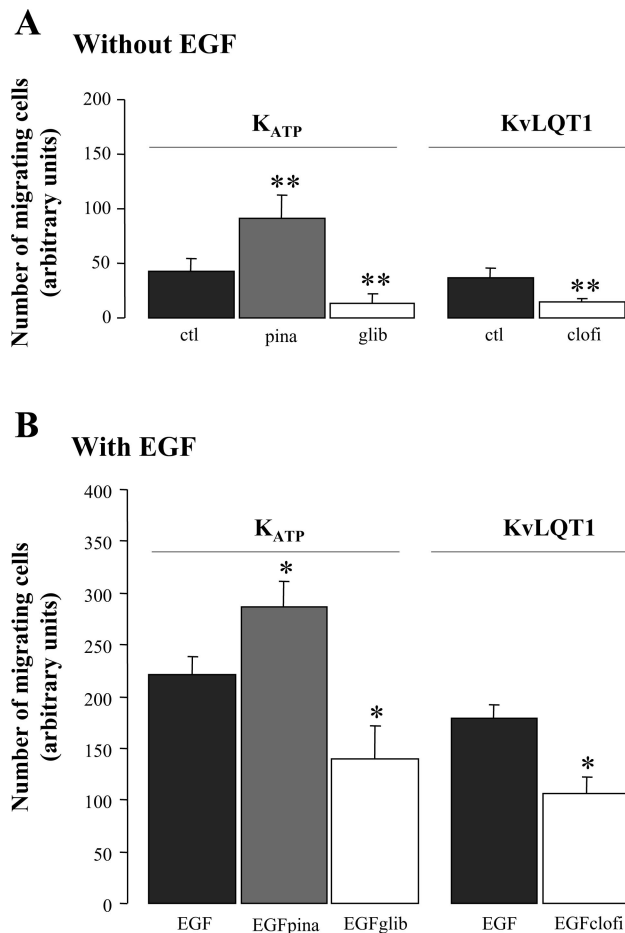


Fig. 5. Effect of K<sup>+</sup> channel modulators on alveolar cell migration. The effect of the K<sup>+</sup> channel modulators pinacidil (100  $\mu$ M), glibenclamide (15  $\mu$ M), and clofilium (5  $\mu$ M) on cell migration (6 h) are compared in the absence of EGF (without EGF, A) and in the presence of EGF (with EGF, B) in MEM-FBS-free medium;  $n = 5$ . \* $P < 0.03$  and \*\* $P < 0.002$ .

measurements. Similarly to the 6-h experiments, we observed a stimulation of cell migration at 24 h with pinacidil, whereas glibenclamide and clofilium inhibited both basic and EGF-stimulated migration (data not shown).

The effects of K<sup>+</sup> channel modulators and EGF on cell proliferation were then evaluated by measuring [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in low-density alveolar cell cultures (Fig. 6). We found that alveolar cell proliferation was highly dependent on the presence of FBS in MEM, as expected, since FBS starvation dramatically reduced thymidine incorporation (data not shown). Changes in EGF levels slightly modified alveolar cell proliferation. Indeed, the binding of soluble EGF by EGF-Ab (5  $\mu$ g/ml) diminished the proliferation by  $16 \pm 6\%$  ( $n = 5$ ,  $P < 0.04$ ; Fig. 6), whereas the addition of exogenous EGF (25 ng/ml) enhanced it by only  $11 \pm 3\%$  ( $n = 11$ ,  $P < 0.01$ ; Fig. 6). In the absence of exogenous EGF addition, neither K<sub>ATP</sub> stimulation nor K<sub>ATP</sub> inhibition significantly affected alveolar cell proliferation. KvLQT1 inhibition, however, reduced cell proliferation by  $25.7 \pm 5.5\%$  ( $n = 12$ ,  $P = 0.0007$ ; Fig. 6). Interestingly, EGF-stimulated cell proliferation (Fig. 6) was significantly reduced after inhibition of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channels with glibenclamide ( $26.4 \pm 10.3$  inhibition,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ) and

clofilium ( $16.4 \pm 5.3\%$  inhibition,  $n = 6$ ,  $P < 0.04$ ), whereas pinacidil potentiated the stimulatory effect of EGF ( $27.5 \pm 3\%$  increment,  $n = 7$ ,  $P < 0.0001$ ).

#### Effect of EGF on Transepithelial K<sup>+</sup> Transport Across Alveolar Monolayers

The impact of EGF on the presence of active K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane was then evaluated in an Ussing chamber after permeabilization of the apical membrane of alveolar monolayers (Fig. 7). In these experiments, an apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient was first created. The apical membrane was then permeabilized with amphotericin B. After stabilization of the K<sup>+</sup> currents, clofilium (Fig. 7A) or glibenclamide (Fig. 7B) was applied at the basolateral membrane to specifically inhibit KvLQT1 or K<sub>ATP</sub> currents. We observed that the clofilium-sensitive current ( $I_{\text{clofi}}$ ;  $4 \pm 1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) was higher than the glibenclamide-sensitive current ( $2.2 \pm 0.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). The effect of acute (10 min) or chronic (24 h) exposure to EGF on KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> currents was then evaluated. EGF was applied at the basolateral side, since EGF-R have been found to be segregated at this membrane (52).  $I_{\text{clofi}}$  increased by 1.7-fold ( $n = 4$ ,  $P = 0.022$ ) after a 10-min application of EGF (Fig. 7A, right). Similarly,  $2.2 \pm 0.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  of glibenclamide-sensitive current ( $I_{\text{glib}}$ ) rose to  $3.4 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  after 10 min in the presence of EGF (1.55-fold increment,  $n = 6$ ,  $P = 0.0107$ ; Fig. 7B, right). Longer EGF stimulation was also tested. In these experiments, the monolayers were pretreated with EGF for 24 h, and the cells were then washed just before Ussing experimentation to evaluate changes in the active number of K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane in the absence of immediate EGF stimulation. We found that this pretreatment induced a large increase in  $I_{\text{clofi}}$  that reached  $9.4 \pm 0.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 4$ ,  $P = 0.007$ , Fig. 7A, right panel). Similarly,  $I_{\text{glib}}$  was elevated by 2.3-fold ( $n = 4$ ,  $P = 0.008$ , Fig. 7B, right) after long-term exposure to EGF.

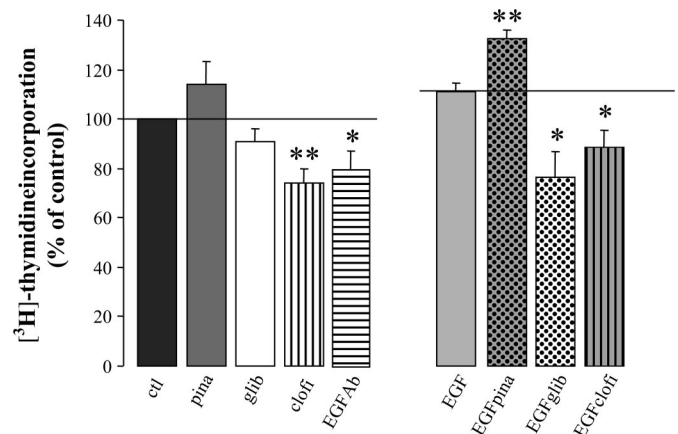
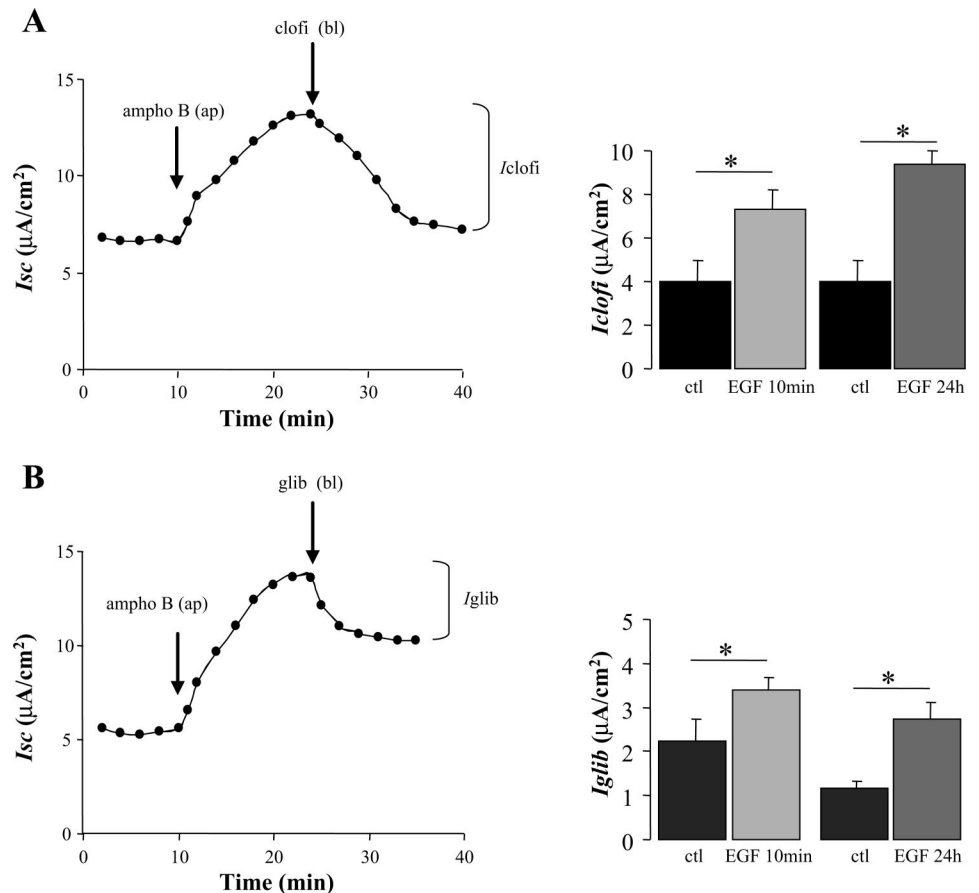


Fig. 6. Effect of EGF and K<sup>+</sup> channel modulators on alveolar cell proliferation. Cell proliferation was estimated by measuring [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in alveolar epithelial cells over a 24-h period in the presence of FBS (MEM-FBS medium). [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was then compared after treatment with EGF-Ab (MEM-FBS + 5  $\mu$ g/ml EGF-Ab,  $n = 5$ ) or EGF (MEM-FBS + 25 ng/ml EGF,  $n = 11$ ) and with the K<sup>+</sup> channel modulators pinacidil (100  $\mu$ M), glibenclamide (15  $\mu$ M), or clofilium (5  $\mu$ M) in the absence ( $n = 12$ ) or presence ( $n = 6$ ) of exogenous EGF (MEM-FBS  $\pm$  25 ng/ml EGF) and presented as %control values. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.001$ .

Fig. 7. Effect of acute and chronic treatments with EGF on K<sup>+</sup> channel activity. Alveolar epithelial cells were cultured on permeant filters for 3 days and treated or not for an additional 24 h at the basolateral side with EGF (25 ng/ml). After being washed, the filters were mounted in an Ussing chamber and bathed with an asymmetrical physiological solution [high-K<sup>+</sup> at the apical (ap) side and low-K<sup>+</sup> physiological solution at the basolateral (bl) side]. The apical membrane was then permeabilized by perfusion of the apical chamber with the same high-K<sup>+</sup> physiological solution supplemented with 7.5  $\mu$ M amphotericin B (ampho B). Upon stabilization of the current (10–20 min), clofilium (100  $\mu$ M, basolateral side, A) or glibenclamide (100  $\mu$ M, basolateral side, B) was applied. Clofilium-sensitive ( $I_{\text{clofi}}$ , A, right) and glibenclamide-sensitive ( $I_{\text{glib}}$ , B, right) currents were then compared in control monolayers (ctl) and after acute (EGF 10 min,  $n = 4$  for  $I_{\text{clofi}}$  and  $n = 6$  for  $I_{\text{glib}}$ ) or chronic (EGF 24 h,  $n = 4$ ) treatment with EGF (25 ng/ml).  $I_{\text{sc}}$ , short-circuit current.



The effect of EGF on KvLQT1 and Kir6.1 expression was also explored. We noted that neither KvLQT1 nor Kir6.1 mRNA was affected by 24 h treatment with EGF (Fig. 8A,  $n = 4$ ), whereas normalized total KvLQT1 ( $n = 9$ ) and K<sub>ATP</sub> ( $n = 7$ ) protein expressions, measured by Western blotting, were increased by 55–73% by 24 h EGF treatment (Fig. 8, B and C).

## DISCUSSION

The external mediators and intracellular signals that control pulmonary cell migration, proliferation, and differentiation processes are not clearly defined. In the present study, we confirmed the involvement, in primary epithelial alveolar cells, of an autocrine EGF loop acting on both erbB1 and erbB2 receptors in the control of epithelial alveolar wound healing as well as on alveolar cell migration and proliferation. We also demonstrated, for the first time, that the basic and EGF-stimulated repair processes of alveolar monolayers were, for the most part, dependent on K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 K<sup>+</sup> channel activities. Furthermore, close coupling between the EGF/EGF-R pathway and K<sup>+</sup> channels was highlighted, since both acute and chronic exposure of EGF stimulated K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 currents and protein expression.

### Role of EGF in Alveolar Repair Processes

We first explored the role of the EGF/EGF-R pathway in alveolar repair processes. EGF expression in primary cultured epithelial alveolar cells was first confirmed by PCR, as dem-

onstrated previously by Raaberg et al. (39). In addition, we performed Western blotting experiments to evaluate the nature of EGF-R in these cells. We detected erbB1 and traces of erbB2 expression in alveolar ATII cell extracts. Studies on the identity of EGF-R subtypes along the respiratory tract have shown that their expression varies with cell type. The erbB1 is expressed in the majority of lung epithelial cells (2, 5, 37), including alveolar cells (2, 18, 39). However, erbB2 and erbB3 expression has also been localized in the airways (37, 52). On the other hand, the level of EGF-R could be regulated after injury. Higher EGF-R expression has been reported, for example, in asthma (5, 38).

Our results have shown that exogenous addition of EGF enhanced alveolar wound healing as well as alveolar cell migration and proliferation. The contribution of EGF signaling in alveolar and airway repair (38, 61) and/or remodeling (5) has already been observed. More precisely, EGF ligand is thought to activate EGF-R at the wound edge, thus stimulating the migration and proliferation of epithelial cells and favoring the restoration of epithelial integrity. Indeed, our results showing an increase of cell migration (Fig. 4) and proliferation (Fig. 6) as well as erbB1 phosphorylation (Fig. 2) after EGF treatment or early after wounding are consistent with those obtained in other studies (1, 13, 29). In addition, we noted (Fig. 1) that EGF titration (by EGF-Ab) or erbB1/erbB2 inhibition (by AG-1478 and AG-825) similarly reduced wound healing, indicating that EGF-R activation was mostly the result of EGF binding.

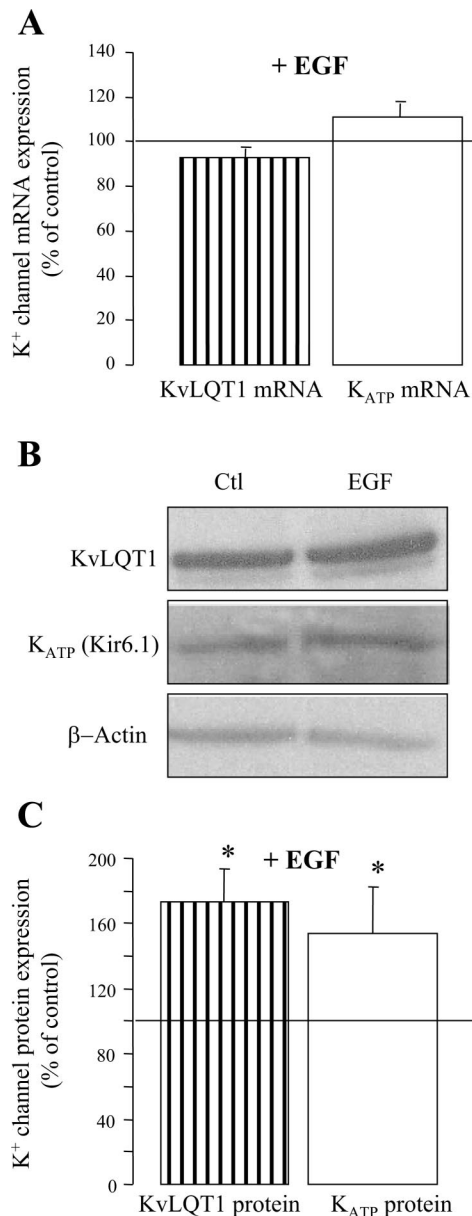


Fig. 8. Regulation of mRNA and protein expression of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channels by EGF. mRNA (A) and protein (B and C) expression of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channels was compared in alveolar cells cultured on filters and treated or not at the basolateral membrane with EGF (25 ng/ml) for 24 h before RNA ( $n = 4$ ) or protein extraction ( $n = 7-9$ ). Representative Western blotting of KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> (Kir 6.1) protein in control and EGF-treated conditions is shown in B. In C, KvLQT1 ( $n = 9$ ) and K<sub>ATP</sub> ( $n = 7$ ) protein expression after EGF treatment is represented as %untreated control monolayers and normalized with β-actin expression.

We found that the effect of exogenous EGF on cell migration was higher (4-fold) than that occurring on wound healing (15%). However, it must first be noted that the migration assays were performed on noninjured alveolar cells for 6 h in FBS-free MEM, whereas the wound-healing experiments were undertaken in the presence of FBS, which contains traces of EGF. These 24- to 48-h wound-healing experiments could not be conducted without FBS, since the integrity of the alveolar monolayers was altered in the absence of serum. Second, the injury of lung epithelial cells most probably induces EGF

release, which could basically control its repair. Elevated EGF levels have been reported in cystic fibrosis patients, for example (49). In our rat alveolar cells, mature EGF protein released from injured monolayers could not be measured with commercially available ELISA kits, since the EGF antibodies used are directed toward human EGF, which does not cross-react with rat EGF. However, we observed that conditioned FBS-free medium collected 1 h after injury of alveolar monolayers stimulated cell migration, whereas conditioned medium from noninjured cells had no significant effect. Interestingly, the stimulatory effect of injured conditioned medium was completely abolished by EGF-Ab (Fig. 4). In addition, this EGF-Ab severely inhibited wound healing. Our results showing an increase of EGF-R phosphorylation levels in wounded alveolar monolayers (Fig. 2) also confirmed EGF release by injured cells. Similarly, EGF-R activation (phosphorylation), in the absence of exogenous EGF, has been seen at the wound edge of 16HBE14o- cells (38). All together, our results suggested injury-induced autocrine EGF-R activation, following EGF release, during cell repair. This autocrine hypothesis could nicely explain the low additional increase of wound repair in the presence of exogenous EGF compared with the high stimulatory effect of EGF or wounded conditioned medium on the migration of intact alveolar cells. Such an autocrine EGF pathway is consistent with the results reported by Geiser et al. (16).

EGF-R activation induces a cascade of cellular events (20), including the phosphorylation of COOH-terminal tyrosine residues, as mentioned above. This activation of EGF-R then allows the docking of numerous downstream signaling molecules inducing the Ras/Raf-mitogen-activated protein kinase (59) and phosphatidylinositol-3-phosphate/AKT (63) transduction pathways, both involved in migration and proliferation processes (59, 63), as well as phospholipase C/protein kinase C (9) that are implicated in EGF stimulation of cell motility. As demonstrated in the present study, K<sup>+</sup> channel activity could also be a crucial step in EGF-mediated EGF-R signaling.

#### Role of K<sup>+</sup> Channel Activity in Alveolar Repair Processes

Our results have shown that modulation of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channel activities regulated alveolar wound healing in basic conditions. In the absence of pretreatment, the K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 inhibitors (glibenclamide and clofilium) slightly reduced (by 25%) alveolar repair. The effect of K<sup>+</sup> inhibitors was additive (50% inhibition with combined treatment; Fig. 3A). Pretreatment with glibenclamide or clofilium, 24 h before injury, reduced wound healing by >50% (Fig. 3B), inhibition similar to that observed following the combined action of these agents in the absence of pretreatment (Fig. 3A). This observation suggested that inhibition of one type of K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub> or KvLQT1) could be compensated by activity of the other in a short period.

In the absence of pretreatment, K<sub>ATP</sub> activation with pinacidil did not increase wound healing. Similarly to experiments with K<sup>+</sup> channel inhibitors, it might be interesting to test the effect of combined activation of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channels. Unfortunately, no KvLQT1 activator channel was available commercially. In conditions where pinacidil was pretreated for 24 h before injury, a slight increment of wound repair was observed. It should be noted that the presence of EGF (from

FBS and released by injured cells) already stimulated wound healing in basic conditions. A common stimulatory pathway of EGF and pinacidil could explain the absence or low level of stimulation in the presence of pinacidil. Accordingly, the small stimulatory effect of pinacidil (Fig. 3B, left) was not observed in the presence of EGF (Fig. 3B, right). Moreover, in conditions where the EGF/EGFR pathway was not basically activated, i.e., during cell migration experiments of intact cells in the absence of FBS, pinacidil was highly effective (2.2-fold increment of cell migration).

Because alveolar repair mainly depends on migration and proliferation processes, we evaluated the impact of K<sup>+</sup> channel modulators on these processes. We observed that K<sub>ATP</sub> modulation regulated alveolar migration but had no significant effect on cell proliferation in basic conditions. This result suggested that K<sub>ATP</sub>-dependent alveolar wound healing was mostly controlled through the impact of K<sub>ATP</sub> activity on cell migration. Conversely, KvLQT1 inhibition affected basic cell migration and proliferation. Regulation of alveolar cell repair by KvLQT1 activity could be because of a cumulative action on alveolar cell migration and proliferation. An impact of K<sup>+</sup> channel activity on cell proliferation (6, 21, 24, 25, 32, 35, 36, 51, 54, 56, 57) and migration (11, 23, 30, 40, 43, 46, 47) has already been reported in several cell types, but we have demonstrated it for the first time in lung epithelial cells. Our results thus give a better understanding of the control of migration and proliferation processes, which are crucial in alveolar cell regeneration.

We also studied the effect of K<sup>+</sup> channel activity on EGF-stimulated alveolar cell repair processes to evaluate the direct involvement of K<sup>+</sup> channels in EGF-modulated wound-healing. We saw, for the first time, that K<sup>+</sup> channel inhibition severely reduced EGF-stimulated alveolar wound healing as well as cell migration and proliferation in the presence of EGF. These results are consistent with K<sup>+</sup>-dependent growth factors stimulation demonstrated in several other cell types. Indeed, it has been shown that HGF-stimulated migration of MDCK cells (23) as well as EGF-induced proliferation of corneal epithelial cells (41), VSMC (25), and myeloblastic cells (54, 60) are dependent on K<sup>+</sup> channel activation by these growth factors. Conversely, pinacidil slightly potentiated the EGF stimulation of alveolar cell migration and proliferation. However, the stimulation of cell migration in the presence of EGF (33%) was lower than the 2.2-fold increase measured in the absence of EGF. Again, this result supports the hypothesis that pinacidil and EGF stimulatory mechanisms are, for the most part, the result of a common pathway.

#### K<sup>+</sup> Channel Activation by EGF

We observed that acute application of EGF increased K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 currents, measured in an Ussing chamber, on apical permeabilized alveolar monolayers by 1.5- and 1.8-fold, respectively. It has already been shown that growth factors enhance intermediate (23, 25) and large-conductance (21) K<sub>Ca</sub> channels in VSMC and MDCK cells. In addition, the open probability of 4-aminopyridine-sensitive Kv channels from myeloblastic cells was increased with EGF through a cAMP (protein kinase A)-dependent pathway (54). In the lungs, EGF was found to augment acetylcholine-induced K<sup>+</sup> currents of the tracheal acinar gland (22). In alveolar cells, our results

demonstrated, for the first time, a stimulation of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 currents in lung epithelial cells. These short-term effects of EGF could be because of the modulation of K<sup>+</sup> channel gating through a second messenger (step 3 of the recapitulative scheme presented in Fig. 9). However, in the absence of patch-clamp experiments, we cannot prove that single K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channel activities were increased with EGF. Rapid membrane insertion of new K<sup>+</sup> channels could not be excluded.

We also tested the impact of long exposure to EGF (24 h). In these experiments, exogenous EGF was washed before Ussing experimentation to avoid a direct effect on K<sup>+</sup> channel activity. We observed that 24 h pretreatment with EGF increased KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> currents by 2.3-fold. This result suggested that EGF enhanced the number of active KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels at the basolateral membrane. However, we saw that the mRNA expression of KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels was unaffected by EGF treatment, whereas a 55–75% increase in total protein expression was detected. It must be noted, however, that this increase was smaller than the augmentation of K<sup>+</sup> currents. We hypothesized that the long-term effect of EGF on alveolar K<sup>+</sup> channels could be because of stimulation of K<sup>+</sup> conductance through heightened K<sup>+</sup> channel protein expression and K<sup>+</sup> channel insertion at the basolateral membrane from intracellular pools (step 4 of the recapitulative scheme presented in Fig. 9). Such an impact of EGF on ion channel trafficking has already been reported, since ENaC currents are inhibited by EGF through alteration of ENaC protein trafficking at the apical membrane (8). Stimulation of K<sup>+</sup> currents and channel expression with EGF indicated that K<sup>+</sup> current activation could be downstream of the EGF activation pathway.

#### Coupling of K<sup>+</sup> Channels, EGF, and Repair Processes

Based on the results obtained from in vitro experiments, we propose an integrated model (Fig. 9) where EGF, secreted by

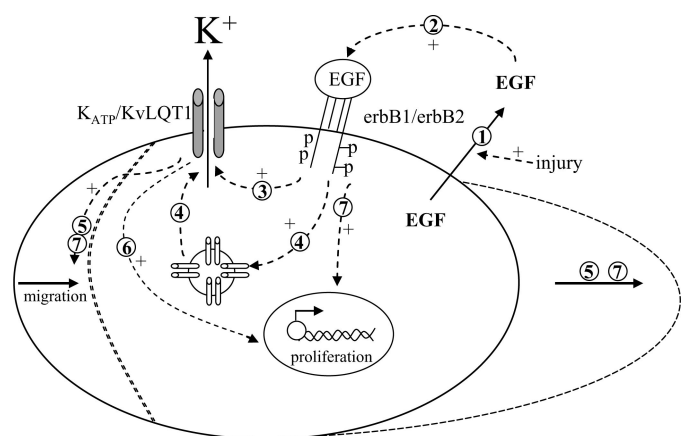


Fig. 9. Schematic model of the EGF and K<sup>+</sup> channel-dependent alveolar cell repair observed in vitro. In this model, EGF, released by basal and to a higher extent by injured alveolar cells (step 1), activates erbB1 and erbB2 receptors (step 2), leading to the stimulation of alveolar K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 currents (step 3) and channel expression at the cell membrane (step 4). Their activation then stimulates alveolar cell migration (step 5) and proliferation (step 6), favoring alveolar repair. Direct stimulation of these processes by EGF signaling pathways could also be involved (step 7). Inhibition of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels prevents, in large part, basic and EGF-stimulated repair processes.

injured alveolar cells, stimulates the activity and expression of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channels through erbB1 and, to a lower extent, erbB2 activation. According to our results, EGF-stimulated alveolar cell migration, proliferation, and wound healing are dependent on K<sup>+</sup> channel stimulation, since their inhibition prevented the major part of EGF stimulation. A change in K<sup>+</sup> channel activity could affect migration and proliferation processes through several pathways, which remain to be determined. Subsequent change in cell volume, after the modification of K<sup>+</sup> flux, could be a possible candidate. It has been proposed, for example, that cell shrinkage of the cell pole, after K<sup>+</sup> efflux through IK<sub>Ca</sub> channels, could facilitate migration of the rear part of MDCK cells (47). An increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and a change in cell volume have also been proposed to be responsible for the K<sup>+</sup> stimulation of cell proliferation (58). On the other hand, K<sup>+</sup> channel activity could affect EGF signaling. Indeed, Xu et al. (60) have suggested that K<sup>+</sup> channel activity is required for initiation of growth factor-mediated mitogenic signal transduction through mitogen-activated protein kinase pathways in myeloblastic cells.

In conclusion, our study constitutes the first demonstration of such an involvement of K<sup>+</sup> channel activity in in vitro EGF-mediated alveolar epithelia repair.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the editorial assistance of Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), and Karl-Philippe Guérard for invaluable help with the time-lapse experiments.

#### GRANTS

This work was supported by the Cystic Fibrosis Foundation and research credits from the Fonds de recherche en santé du Québec-Groupe d'Études des Protéines Membranaires and CHUM Research Centre Foundation.

#### REFERENCES

- Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI, Hiemstra PS. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol* 72: 167–174, 2002.
- Aida S, Tamai S, Sekiguchi S, Shimizu N. Distribution of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human lung: immunohistochemical and immunoelectron-microscopic studies. *Respiration* 61: 161–166, 1994.
- Berthiaume Y. Mechanisms of edema clearance. In: *Pulmonary Edema*, edited by Weir EK and Reeves JT. Armonk, NY: Futura, 1998, p. 77–94.
- Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* 54: 150–160, 1999.
- 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* 27: 208–229, 2006.
- Braun GS, Veh RW, Segerer S, Horster MF, Huber SM. Developmental expression and functional significance of Kir channel subunits in ureteric bud and nephron epithelia. *Pflugers Arch* 445: 321–330, 2002.
- Brochiero E, Dagenais A, Prive A, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Evidence of a functional CFTR Cl<sup>-</sup> channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L382–L392, 2004.
- Cao L, Owsianik G, Becq F, Nilius B. Chronic exposure to EGF affects trafficking and function of ENaC channel in cystic fibrosis cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 503–511, 2005.
- Chen P, Xie H, Sekar MC, Gupta K, Wells A. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J Cell Biol* 127: 847–857, 1994.
- 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.
- Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K<sup>+</sup> channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* In press.
- Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 134: 141–145, 1986.
- Edelson JD, Chan S, Jassal D, Post M, Tanswell AK. Vitamin D stimulates DNA synthesis in alveolar type-II cells. *Biochim Biophys Acta* 1221: 159–166, 1994.
- Feng ZP, Clark RB, Berthiaume Y. Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 248–254, 1993.
- Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury—a translational approach. *Swiss Med Wkly* 133: 586–590, 2003.
- Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, Matthay MA. Interleukin-1beta augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1184–L1190, 2000.
- Guo TB, Lu J, Li T, Lu Z, Xu G, Xu M, Lu L, Dai W. Insulin-activated, K<sup>+</sup>-channel-sensitive Akt pathway is primary mediator of ML-1 cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C257–C263, 2005.
- Hardie WD, Bejarano PA, Miller MA, Yankaskas JR, Ritter JH, Whitsett JA, Korfhagen TR. Immunolocalization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in lungs of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Dev Pathol* 2: 415–423, 1999.
- Hollande E, Cantet S, Ratovo G, Daste G, Bremont F, Fanjul M. Growth of putative progenitors of type II pneumocytes in culture of human cystic fibrosis alveoli. *Biol Cell* 96: 429–441, 2004.
- Hsuan JJ, Tan SH. Growth factor-dependent phosphoinositide signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 415–435, 1997.
- Ivanov A, Gerzanich V, Ivanova S, Denhaese R, Tsybalyuk O, Simard JM. Adenylate cyclase 5 KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle. *J Physiol* 570: 73–84, 2006.
- Iwase N, Sasaki T, Oshiro T, Tamada T, Nara M, Sasamori K, Hattori T, Shirato K, Maruyama Y. Differential effect of epidermal growth factor on serous and mucous cells in porcine airway submucosal gland. *Respir Physiol Neurobiol* 132: 307–319, 2002.
- Jin M, Defoe DM, Wondergem R. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates Ca<sup>2+</sup>-activated membrane K<sup>+</sup> current and migration of MDCK II cells. *J Membr Biol* 191: 77–86, 2003.
- Kleppisch T, Winter B, Nelson MT. ATP-sensitive potassium channels in cultured arterial segments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271: H2462–H2468, 1996.
- Kohler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kampfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG, Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108: 1119–1125, 2003.
- 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.
- Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L1207–L1219, 2006.
- Leslie CC, McCormick-Shannon K, Shannon JM, Garrick B, Damm D, Abraham JA, Mason RJ. Heparin-binding EGF-like growth factor is a mitogen for rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 379–387, 1997.
- 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.
- Liu LY, Hu CL, Ma LJ, Zhang ZH, Mei YA. ET-1 inhibits B-16 murine melanoma cell migration by decreasing K(+) currents. *Cell Motil Cytoskeleton* 58: 127–136, 2004.
- 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.
- Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadican SO, Spray DC, McDonald TV, Gupta S. KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for



- liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* 275: 26050–26057, 2000.
33. **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.
  34. **Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K.** Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 283–289, 2000.
  35. **Pardo LA.** Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 19: 285–292, 2004.
  36. **Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC.** Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 471: 157–164, 2003.
  37. **Polosa R, Prosperini G, Leir SH, Holgate ST, Lackie PM, Davies DE.** Expression of c-erbB receptors and ligands in human bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 914–923, 1999.
  38. **Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE.** Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 14: 1362–1374, 2000.
  39. **Raaberg L, Nexø E, Buckley S, Luo W, Snead ML, Warburton D.** Epidermal growth factor transcription, translation, and signal transduction by rat type II pneumocytes in culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 44–49, 1992.
  40. **Rao JN, Platoshyn O, Li L, Guo X, Golovina VA, Yuan JX, Wang JY.** Activation of K(+) channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C885–C898, 2002.
  41. **Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L.** Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. *J Membr Biol* 196: 41–50, 2003.
  42. **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.
  43. **Schilling T, Stock C, Schwab A, Eder C.** Functional importance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci* 19: 1469–1474, 2004.
  44. **Schwab A.** Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F739–F747, 2001.
  45. **Schwab A.** Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci* 16: 29–33, 2001.
  46. **Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J, Dartsch PC.** Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflugers Arch* 438: 330–337, 1999.
  47. **Schwab A, Wulf A, Schulz C, Kessler W, Nechyporuk-Zloy V, Romer M, Reinhardt J, Weinhold D, Dieterich P, Stock C, Hebert SC.** Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J Cell Physiol* 206: 86–94, 2006.
  48. **Shimazu K, Takeda K, Yu ZX, Jiang H, Liu XW, Nelson PG, Guroff G.** Multiple acute effects on the membrane potential of PC12 cells produced by nerve growth factor (NGF). *J Cell Physiol* 203: 501–509, 2005.
  49. **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.
  50. **Sugahara K, Mason RJ, Shannon JM.** Effects of soluble factors and extracellular matrix on DNA synthesis and surfactant gene expression in primary cultures of rat alveolar type II cells. *Cell Tissue Res* 291: 295–303, 1998.
  51. **Sullivan LP, Wallace DP, Gover T, Welling PA, Yamaguchi T, Maser R, Eppler JW, Grantham JJ.** Sulfonylurea-sensitive K(+) transport is involved in Cl(-) secretion and cyst growth by cultured ADPKD cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2619–2627, 2002.
  52. **Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO, Rokhlina T, Kern JA, Zabner J, Welsh MJ.** Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422: 322–326, 2003.
  53. **Vermeer PD, Panko L, Karp P, Lee JH, Zabner J.** Differentiation of human airway epithelia is dependent on erbB2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L175–L180, 2006.
  54. **Wang L, Xu B, White RE, Lu L.** Growth factor-mediated K<sup>+</sup> channel activity associated with human myeloblastic ML-1 cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C1657–C1665, 1997.
  55. **Wang Z.** Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch* 448: 274–286, 2004.
  56. **Wickenden A.** K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther* 94: 157–182, 2002.
  57. **Wondergem R, Cregan M, Strickler L, Miller R, Suttles J.** Membrane potassium channels and human bladder tumor cells. II. Growth properties. *J Membr Biol* 161: 257–262, 1998.
  58. **Wonderlin WF, Strobl JS.** Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* 154: 91–107, 1996.
  59. **Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, Kwiatkowski DJ, Lauffenburger DA, Murphy-Ullrich JE, Wells A.** EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci* 111: 615–624, 1998.
  60. **Xu D, Wang L, Dai W, Lu L.** 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: 139–145, 1999.
  61. **Zahm JM, Debordeaux C, Raby B, Klossek JM, Bonnet N, Puchelle E.** Motogenic effect of recombinant HGF on airway epithelial cells during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 185: 447–453, 2000.
  62. **Zahm JM, Kaplan H, Herard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, Puchelle E.** Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton* 37: 33–43, 1997.
  63. **Zhang Y, Akhtar RA.** Epidermal growth factor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1139–1148, 1997.

## EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair

Nguyen Thu Ngan Trinh,<sup>1,2</sup> Anik Privé,<sup>1</sup> Emilie Maillé,<sup>1</sup> Josette Noël,<sup>3</sup> and Emmanuelle Brochiero<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM)-Hôtel-Dieu, and <sup>2</sup>Département de médecine and <sup>3</sup>GÉPROM, Département de physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Submitted 12 March 2008; accepted in final form 25 August 2008

**Trinh NT, Privé A, Maillé E, Noël J, Brochiero E.** EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L866–L880, 2008. First published August 29, 2008; doi:10.1152/ajplung.90224.2008.— Severe lesions of airway epithelia are observed in cystic fibrosis (CF) patients. The regulatory mechanisms of cell migration and proliferation processes, involved in the repair of injured epithelia, then need to be better understood. A model of mechanical wounding of non-CF (NuLi) and CF (CuFi) bronchial monolayers was employed to study the repair mechanisms. We first observed that wound repair, under paracrine and autocrine EGF control, was slower (up to 33%) in CuFi than in NuLi. Furthermore, EGF receptor (EGFR) activation, following wounding, was lower in CuFi than in NuLi monolayers. Cell proliferation and migration assays indicated a similar rate of proliferation in both cell lines but with reduced (by 25%) CuFi cell migration. In addition, cell migration experiments performed in the presence of conditioned medium, collected from NuLi and CuFi wounded bronchial monolayers, suggested a defect in EGF/EGFR signaling in CF cells. We (49) recently demonstrated coupling between the EGF response and K<sup>+</sup> channel function, which is crucial for EGF-stimulated alveolar repair. In CuFi cells, lower EGF/EGFR signaling was accompanied by a 40–70% reduction in K<sup>+</sup> currents and KvLQT1, ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>), and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (KCa3.1) channel expression. In addition, EGF-stimulated bronchial wound healing, cell migration, and proliferation were severely decreased by K<sup>+</sup> channel inhibitors. Finally, acute CFTR inhibition failed to reduce wound healing, EGF secretion, and K<sup>+</sup> channel expression in NuLi. In summary, the delay in CuFi wound healing could be due to diminished EGFR signaling coupled with lower K<sup>+</sup> channel function, which play a crucial role in bronchial repair.

airways; potassium channels; cystic fibrosis; wound repair

IN CYSTIC FIBROSIS (CF), mutations of the gene coding for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl<sup>-</sup> channels (43) cause dysfunction of Cl<sup>-</sup> secretion, resulting in imbalanced Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, and fluid transport with reduced mucociliary clearance (10). Accumulation of viscous mucus, obstructing the small airways, favors bacterial colonization and chronic inflammation. Persistence of infection and inflammation then leads to progressive damage of the pulmonary epithelia and remodeling of the small and large airways, which ultimately evoke respiratory failure.

Chronic bronchiectasis is the most commonly observed structural abnormality in CF patients. Analyses of CF lung morphology initially reveal alterations of the small airways, whereas inflammation and mucus plugging of the large airways

occur later. Ultrastructural studies also disclose nonspecific ciliary abnormalities, goblet cell hyperplasia, squamous cell metaplasia in airways, as well as areas of alveolar epithelium injury and regeneration (11, 17, 47). Most of these morphological changes seem not to be specific to CF disease and could be secondary to chronic bacterial infection and inflammation. Indeed, the release of proteases by neutrophils or bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* for example, contributes to tissue damage in CF (41, 47, 50). Overproduction of proinflammatory cytokines by inflammatory and epithelial cells in CF lungs also plays a role in injury and remodeling of respiratory epithelia (5, 47). After injury, epithelial cells, macrophages, and fibroblasts release growth factors such as hepatocyte growth factor (HGF; Refs. 13, 37, 47), EGF (1, 3, 13, 38, 47), keratinocyte growth factor (KGF; Refs. 13, 37, 47), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ; Refs. 3, 47). After binding to their respective receptors on the injured airways and alveolar epithelia, these factors induce mitogenic, motogenic, and/or morphogenic cellular responses involved in their repair. However, the relative roles of inflammatory mediators and growth factors in the complex balance between lung injury, repair, and remodeling are not completely understood. In addition, the elevated levels of growth factors, observed in CF lungs, seem insufficient to protect lung epithelia against injury and remodeling (47). Thus it is crucial to better understand the repair mechanisms of lung epithelia to develop strategies that promote CF tissue healing.

We (49) have recently confirmed the involvement, in primary cultured alveolar epithelial cells, of an autocrine EGF loop acting on both erbB1 and erbB2 EGF receptors (EGFR) in the control of wound healing as well as cell migration and proliferation. We (49) have also demonstrated that ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels, expressed at the basolateral membrane of alveolar cells (25, 26), play a role in repair processes. Indeed, basal and EGF-stimulated repair processes are, for the most part, dependent on the activity of these K<sup>+</sup> channels. Furthermore, close coupling between EGF signaling and K<sup>+</sup> channel activity and expression has been highlighted. It was the first evidence of K<sup>+</sup> channel involvement in EGF-stimulated lung epithelia repair. Our results were consistent with previous studies showing that K<sub>ATP</sub> channels, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (KCa3.1), and channels from the voltage-dependent Kv family control the basal- or growth factor-mediated proliferation and migration of various cell types (4, 7, 21–23, 35, 40, 42, 45, 54, 56).

The aim of the present study was to evaluate the role of EGF signaling and K<sup>+</sup> channel activity in the repair processes of

Address for reprint requests and other correspondence: E. Brochiero, Centre de recherche, CHUM-Hôtel-Dieu, 3850, St-Urbain, Montréal, Québec H2W 1T7, Canada (e-mail: emmanuelle.brochiero@umontreal.ca).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

normal and CF bronchial epithelia. We chose two cell lines, NuLi-1 and CuFi-1, derived from normal (NuLi) and CF (CuFi-1,  $\Delta 508/\Delta 508$  genotype) human airway epithelial cells (HAE) (57). We first evaluated the repair capacity of NuLi and CuFi monolayers after wounding. We then determined the respective involvement of EGF/EGFR signaling and K<sup>+</sup> channels in the repair processes. We observed that the delayed repair of CuFi monolayers was coupled with decreased EGF secretion and/or EGFR activation as well as reduced K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and KCa3.1 activities and expression that are crucial for bronchial epithelia repair.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** Repair processes of normal and CF bronchial epithelia were studied in two cell lines, NuLi-1 and CuFi-1, a generous gift from Dr. J. Zabner, University of Iowa (57). The NuLi-1 (normal lung) line was derived from HAE of normal genotype, whereas the CuFi-1 line was derived from a CF patient with  $\Delta 508/\Delta 508$  genotype. The NuLi-1 and CuFi-1 bronchial epithelial cell lines were obtained by transformation of normal and CF primary HAE with a RT component of telomerase and human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes.

For the wound healing, cell proliferation, and migration experiments, NuLi and CuFi cells, from *passages 11 to 17*, were seeded at a specified density on Petri dishes coated with human placental collagen type VI (C7521; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and cultured in bronchial epithelial cell growth medium (BEBM; Lonza, Walkersville, MD) supplemented (BEGM) with EGF, hydrocortisone, bovine pituitary extract, transferrin, bovine insulin, triiodothyronine, epinephrine, retinoic acid, penicillin-streptomycin (0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), genistein (0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and fluconazole (0.002  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). This normal BEGM contained 0.5 ng/ml EGF (BEGM-EGF<sup>0.5</sup>). Some wound healing, cell proliferation, and migration experiments were performed in the absence of EGF (BEGM not supplemented with EGF: BEGM-EGF<sup>free</sup>).

For electrophysiology experiments, NuLi and CuFi were plated at  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> on Costar Transwell permeant filters (Costar Transwell, Toronto, Ontario, Canada) coated with collagen type VI and grown in DMEM/F-12 (GIBCO, Grand Island, NY). This medium was supplemented with 5% fetal bovine serum (26140-079, GIBCO) for the first 24 h and then replaced by Ultrosor G (2%, 15950-017; Biosepra, Cergy-Saint-Christophe, France), which enhances ion transport (57). Medium at the apical side was aspirated every 2–3 days until establishment of an air-liquid interface. The basolateral culture medium was replaced at the same time. After 4–6 wk, the NuLi and CuFi cells formed a polarized, differentiated epithelium with high transepithelial resistance and ion transport expected for the genotype (57).

**Wound healing.** Normal and CF bronchial epithelial cells, cultured for 8 days in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> in Petri dishes, were injured mechanically with a P10 pipette tip (6 wounds per Petri dish). After injury, the monolayers were washed with BEGM-EGF<sup>0.5</sup> to remove detached, injured cells. The monolayers were then photographed with a Nikon camera under light microscopy (*time 0*) and after 6 h in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> or 18 h in the presence of BEGM-EGF<sup>free</sup>. The repair processes were compared in control conditions (BEGM-EGF<sup>0.5</sup>), in the absence of EGF (BEGM-EGF<sup>free</sup>), in the presence of 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-EGF antibody (BEGM-EGF<sup>free</sup>+Ab; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or in the presence of K<sup>+</sup> channel modulators. Wound width (a mark on the Petri dishes allowed us to photograph the wounds exactly at the same place at various times) was measured by ImageJ software and represented as percentage of initial wound width. This commonly employed “wound-healing assay” gives an estimation of the capacity of cells to migrate and proliferate to repair monolayers after mechanical injury. At the end of the experiment, the monolayers were fixed at room temperature in cold paraformaldehyde-acetone

solution (4% paraformaldehyde wt/vol, 0.02% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wt/vol, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wt/vol, 45% acetone vol/vol, pH 6.6), rinsed three times with distilled water, and air-dried.

Conditioned media were also collected for migration assays. Briefly, NuLi and CuFi monolayers were cultured for 8 days in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> in Petri dishes. After washing with BEGM-EGF<sup>free</sup>, some Petri dishes were injured mechanically (the injured area represented 10–13% of the total surface) while the others were not. All cells were then washed with BEGM-EGF<sup>free</sup> to remove detached or injured cells, and fresh BEGM-EGF<sup>free</sup> medium was added. EGF<sup>free</sup> conditioned media from “wounded” (WCM) or “unwounded” monolayers were collected after 1 h.

**Cell migration in the Boyden-type chamber.** The migratory capacity of NuLi and CuFi cells was evaluated by Boyden-type migration assay (49). Bronchial epithelial cells were cultured on plastic supports for 8 days in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> and then washed with PBS and dissociated with trypsin-EDTA (0.25%; GIBCO-Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Cell suspensions were collected, pelleted by centrifugation, and resuspended in BEGM-EGF<sup>free</sup>. The cells were counted, and cell viability was verified with trypan blue. They were then seeded (75,000 cells/well) in the upper compartment of inserts with 8- $\mu\text{m}$  pores (0.33 cm<sup>2</sup>, Thin Certs-TC inserts; Greiner Bio-one, MJS Biolyntx, Brockville, Ontario, Canada) coated on the lower side with human placental collagen type VI (C7521, Sigma-Aldrich). In some experiments (EGF<sup>0.5</sup>), 0.5 ng/ml EGF was added in the upper compartment. The lower compartment was filled with BEGM-EGF<sup>0.5</sup> or BEGM-EGF<sup>free</sup> in the presence or absence of K<sup>+</sup> channel modulators. After a 6-h period, the filters were washed with PBS, and migrating cells that passed through the lower face of the filters were fixed with paraformaldehyde-acetone solution and stained for 48 h with crystal violet (0.1% in 20% methanol). After some washes, nonmigrating cells of the upper compartment were scraped off with cotton-tipped applicators (Fisher, Nepean, Ontario, Canada). The filters were examined by microscopy at  $\times 40$  enlargement, and cells that had migrated were counted in five different fields.

In migration assays with conditioned media, bronchial epithelial cell suspensions were resuspended in BEGM-EGF<sup>free</sup> and placed in the upper compartment of the filters. The lower compartment was filled with the relevant wounded (WCM) or unwounded BEGM-EGF<sup>free</sup> conditioned media (see *Wound healing*) in the presence or absence of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EGF Ab or CFTR<sub>inh</sub>-172 (C2992; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada).

**Cell proliferation.** NuLi and CuFi cell proliferation was evaluated by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assays (over an 18-h period) as well as by counting the cell number (at *day 3* of culture).

For [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay, NuLi and CuFi cells were seeded at low density (75,000 cells/well) in 12-well plates (Costar-Corning, Corning, NY), coated with human placental collagen type VI (C7521, Sigma-Aldrich) and cultured for 48 h in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> (until 50% confluence). The culture medium was then replaced by BEGM-EGF<sup>free</sup> containing 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [<sup>3</sup>H]thymidine (MP Biomedical, Irvine, CA) in the presence of K<sup>+</sup> channel modulators and/or EGF<sup>0.5</sup>. After an 18-h period of incorporation, the [<sup>3</sup>H]thymidine medium was removed by inversion and replaced by ice-cold TCA (5%, 5–10 min). TCA was then discarded, and the plates were washed in three successive ice-cold water baths. The cells were lysed with 0.1 N NaOH, transferred into scintillation tubes, and counted (Bq/cm<sup>2</sup>) in a beta counter (Tri-Carb 1600TR liquid scintillation analyzer, Canberra Packard). Protein content was measured by Bradford assay (Pierce, Rockford, IL). [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation (counts per minute) was presented as percentage of NuLi incorporation (in BEGM-EGF<sup>free</sup>).

Cell proliferation was also evaluated by measuring cell number after 3 days of culture. NuLi and CuFi cells were seeded at low density (150,000 cells) in 35-mm Petri dishes coated with human placental collagen type VI and cultured for 3 days in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>. The cells were then separated with trypsin-EDTA (0.25%) and counted with an hemacytometer.

**Immunoblotting.** Total proteins were extracted from bronchial epithelial cells cultured on collagen-coated plastic dishes for 8 days in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>. Twenty-four hours before extraction, some of them were treated with EGF (25 ng/ml EGF, BEGM-EGF<sup>25</sup>), BEGM-EGF<sup>free</sup>, BEGM-EGF<sup>free</sup>+Ab, or CFTR<sub>inh</sub>-172. In other experiments, the monolayers were wounded 30–60 min before protein extraction.

EGFR (erbB1), erbB2, and phosphorylated forms of EGFR and erbB2 (p-EGFR and p-erbB2) were detected by immunoblotting as we have described previously (49). Briefly, proteins (100–200 µg) were separated by SDS-PAGE (7.5%), transferred to Hybond-C extra nitrocellulose membranes (Amersham/GE, Baie D'Urfé, Québec, Canada), and blocked by 4% fraction V BSA in TBS containing Tween 20 (TBST; 500 mM NaCl, 20 mM Tris·HCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. ErbB1 and erbB1 phosphorylated on tyrosine 845 as well as erbB2 and erbB2 phosphorylated on tyrosine 877 were then blotted with a 1:1,000 dilution of commercially available specific antibodies in TBST plus 2% BSA [erbB1 (cat. no. 2232; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), p-EGFR<sup>845</sup> (cat. no. 2231, Cell Signaling Technology), erbB2 (cat. no. E3451-27, USBiological, Swampscott, MA), and p-erbB2<sup>877</sup> (cat. no. 2241, Cell Signaling Technology)] for at least 2 h at room temperature and detected with goat horseradish peroxidase-labeled rabbit immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Ponceau staining was performed, and β-actin protein was revealed with monoclonal AC15 Ab at 1:50,000 dilution (Sigma-Aldrich) after Ab stripping to ensure equivalent loading. The intensity of p-EGFR and p-erbB2 bands was quantified with ImageJ software, normalized to the EGFR and erbB2 signals, respectively, and presented as percentage of NuLi in the control (EGF<sup>0.5</sup>) condition.

For KvLQT1, Kir6.1 (K<sub>ATP</sub>), and KCa3.1 K<sup>+</sup> channel detection (26, 49), the cells were solubilized in lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl, pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail; Roche, Mannheim, Germany)] for 1 h on ice and centrifuged at 12,000 g for 15 min. The supernatants were collected, and protein content was measured. After denaturation [at 95°C for 5 min in 2× sample buffer (62.5 mM Tris·HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.2% bromophenol blue, and 4% 2-mercaptoethanol)], the proteins (20–60 µg for KvLQT1 and Kir6.1, 120 µg for KCa3.1) were separated by SDS-PAGE (7.5%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were first blocked with 10% dried fat-free milk in TBST for 1 h (18 h for KCa3.1) at room temperature and then incubated with commercial polyclonal anti-Kir6.1 (dilution 1:200, sc-11224; Santa Cruz Biotechnology), anti-KvLQT1 (dilution 1:1,000, sc-10645, Santa Cruz Biotechnology), or anti-KCa3.1 (dilution 1:300, APC-064; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) in TBST plus 10% milk, overnight at 4°C (KCa3.1 Ab was incubated for 6 h at room temperature before overnight blotting at 4°C). After washing with TBST, the membranes were incubated with donkey anti-goat (for KvLQT1 and Kir6.1, Santa Cruz Biotechnology) and goat anti-rabbit (for KCa3.1, Cell Signaling Technology) IgG linked to horseradish peroxidase for 1 h. The anti-Kir6.1, anti-KCa3.1, and anti-KvLQT1 antibodies, respectively, recognized a ~50-kDa (Kir6.1, KCa3.1) and 75-kDa (KvLQT1) protein (26, 49). The specificity of anti-Kir6.1, anti-KvLQT1, and anti-KCa3.1 antibodies was verified with their respective blocking peptide (sc-11224P, sc10645P, Santa Cruz Biotechnology; APC-064-peptide, Alomone Labs) (26, 49). Ponceau staining was also performed, and β-actin protein was revealed (on the same blot) with a purified mouse anti-β-actin monoclonal Ab (dilution 1:2,500, CLT9001; Cedarlane Laboratory, Burlington, Ontario, Canada) to ensure equivalent loading. The intensity of each specific band corresponding to K<sup>+</sup> channel protein was quantified with ImageJ software and normalized to the β-actin signal.

**PCR amplification of K<sup>+</sup> channels.** Total RNA from bronchial epithelial cells was purified with TRIzol reagent according to the

manufacturer's instructions (Invitrogen). Five micrograms of total RNA were reverse-transcribed to cDNA with Moloney murine leukemia virus (MMLV) RT (Invitrogen) in the presence of oligo(dT) primers. cDNAs were amplified with *Taq* polymerase (Invitrogen), employing specific primers designed from sequences of the following cloned K<sup>+</sup> channels: human KvLQT1 (GenBank acc. no. NM\_000218.2), KCa3.1 (GenBank acc. no. NM\_002250.2), Kir6.1 (GenBank acc. no. NM\_004982), and SUR2B (GenBank acc. no. NM\_020297). KvLQT1 primers (sense: 5'-taaggaagagccaacactg-3', exon 11; antisense: 5'-cgatcctgtctctttctga-3', exon 15; 1 µM final concentration of each, 355-bp PCR product), KCa3.1 primers (sense: 5'-cggcctctgctcaacg-3', exon 5; antisense: 5'-caccagcaggctgtgcag-3', exon 6; 1 µM, 337-bp PCR product), Kir6.1 (sense: 5'-ttcaccactggacatctc-3', exon 1; antisense: 5'-tttggtaccatgaggaaga-3', exon 2; 1 µM, 499-bp PCR product), and SUR2B primers (sense: 5'-gatgaggcaacagctccat-3'; antisense: 5'-cgcaacaaaagaagcaaa-3'; 1 µM, 223-bp PCR product) served to explore the presence of these K<sup>+</sup> channels in bronchial cells. The PCR products were separated on agarose gels, stained with ethidium bromide, and analyzed by Typhoon Gel Imager (25, 26).

**Electrophysiology.** The electrophysiological characteristics of bronchial epithelial layers were studied by short-circuit current (*I*<sub>sc</sub>) measurements in an Ussing chamber (25, 26, 49). First, bronchial epithelial cells were cultured on filters (4 cm<sup>2</sup>, Costar Transwell, coated with human collagen type VI) for 6–8 wk until they reached an air-liquid interface (see *Cell culture*) and formed a polarized epithelium with high resistance (>1,200 Ω·cm<sup>2</sup>). The cells were then treated or not for 24 h with EGF (25 ng/ml) at the basolateral side. After washing, the alveolar monolayers were mounted in a heated (37°C) Ussing chamber and perfused on the apical and basolateral sides with warm physiological solution. Some short-circuit experiments were also performed with acute EGF treatment (10 min). To evaluate the amount of active K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane, *I*<sub>sc</sub> was measured after establishment of a K<sup>+</sup> gradient and permeabilization of the apical membrane with 7.5 µM amphotericin B. The apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient was created by bathing the apical side with high K<sup>+</sup> physiological solution (containing in mM: 81 NaCl, 65.4 KCl, 0.78 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 15 HEPES, pH 7.4), whereas for the basolateral side, 60 mM KCl was replaced by an equivalent amount of *N*-methyl-D-glucamine chloride (NMDGCl). Transepithelial potential difference was clamped to zero by an external voltage clamp amplifier (VCCMC2, Physiological Instruments) with KCl agar-calomel half-cells and Ag-AgCl electrodes, and the resulting *I*<sub>sc</sub> was recorded continuously on a computer with a PowerLab system (ADInstruments, Toronto, Ontario, Canada) (25). Membrane resistance was verified with 1-mV pulses every minute.

**Statistics.** The data are represented as means ± SE collected from at least 4 different passages (*n* > 4). Groups were compared by paired *t*-test or the one-group *t*-test with StatView software (SAS Institute, Cary, NC). A probability of *P* < 0.05 was considered to be significant (*P* values were reported for each experiment).

## RESULTS

**Wound healing of normal and CF bronchial monolayers.** The repair processes of normal and CF bronchial epithelia were studied in our model of mechanical wound injury (49), adapted to the normal and CF bronchial cell lines NuLi and CuFi, respectively. Wound healing was then compared in NuLi and CuFi monolayers, in various EGF conditions (Fig. 1). First, the wound healing of NuLi and CuFi monolayers was followed over an 18-h period in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> (Fig. 1A). We observed 33.7% ± 2.3% of repair for NuLi monolayers at 6 h after injury. Wound healing was complete after 18 h (99.5% ± 2%, *n* = 44). Wound repair was slower in CuFi monolayers (22.5% ± 1.9% at 6 h, i.e., a 1/3 decrease compared with NuLi,

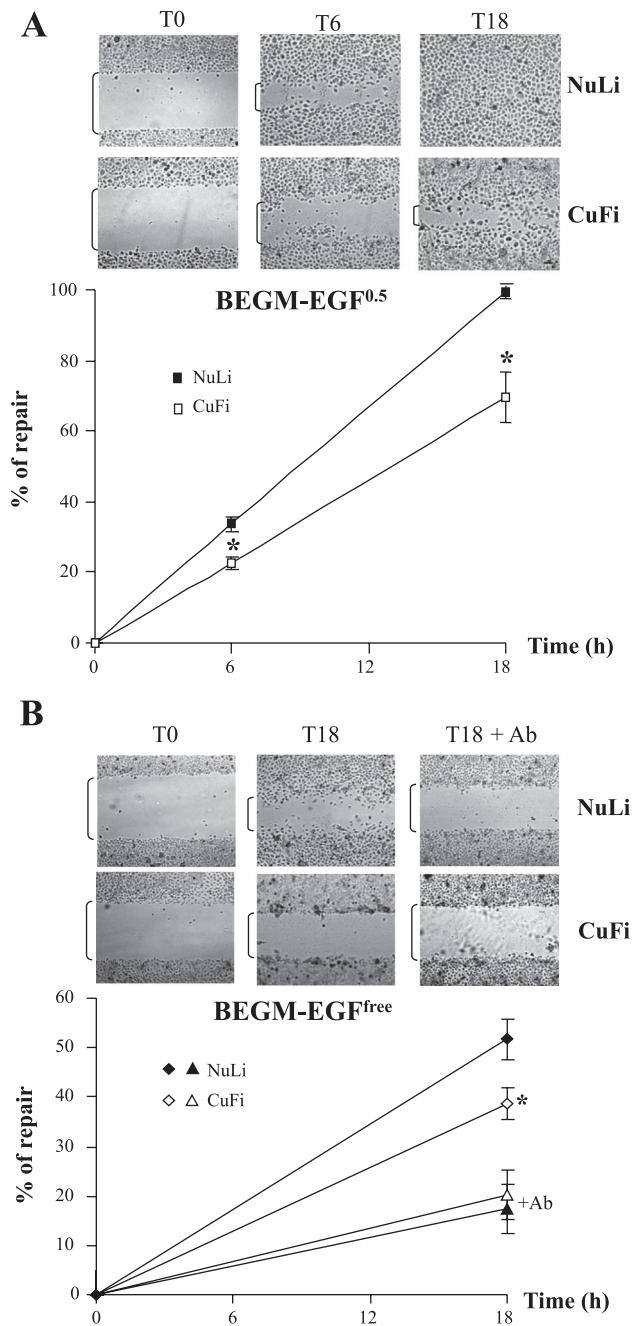


Fig. 1. Wound healing of normal and cystic fibrosis (CF) bronchial cell monolayers. Bronchial epithelial cells (NuLi and CuFi) were cultured for 8 days in bronchial epithelial cell growth medium supplemented with 0.5 ng/ml EGF (BEGM-EGF<sup>0.5</sup>) before mechanical injury. Wound repair in NuLi and CuFi was then followed over an 18-h period, and the percentage of repair was measured in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> (A) or BEGM not supplemented with EGF (BEGM-EGF<sup>free</sup>; B) in the absence or presence of anti-EGF antibody (+Ab, 5  $\mu$ g/ml). Photographs taken 30 min (time 0, T0), 6 h (T6), and 18 h (T18) after NuLi or CuFi monolayer injury, in the presence of BEGM-EGF<sup>0.5</sup> (A) or BEGM-EGF<sup>free</sup> (B) in the absence or presence of anti-EGF Ab (+Ab, 5  $\mu$ g/ml), are also presented. \* $P < 0.0001$ .

$n = 46$ ;  $P < 0.0001$ ). We also noted a delay (1/3 reduction compared with NuLi) in CuFi repair after 18 h, suggesting that the mechanism of repair is defective in CuFi cells.

The absence of EGF in culture medium (BEGM-EGF<sup>free</sup>) reduced wound healing of NuLi monolayers by one-half

(51.8%  $\pm$  4.1% of repair at 18 h,  $n = 43$ , Fig. 1B, instead of 99.5% in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>, Fig. 1A). We then decided, in subsequent wound-healing experiments, to study bronchial wound repair in the presence of EGF at 6 h after injury and in the absence of EGF at 18 h postinjury.

Similar to findings in the BEGM-EGF<sup>0.5</sup> condition, wound healing in BEGM-EGF<sup>free</sup> was significantly lower in CuFi (38.8%  $\pm$  3.2% repair at 18 h,  $n = 43$ ; Fig. 1B) than in NuLi ( $P < 0.0001$ ). An EGF Ab was then added to BEGM-EGF<sup>free</sup> to titrate EGF, potentially released from injured cells. This EGF Ab induced a dramatic decrease in wound repair, reaching 17.5%  $\pm$  4.9% and 20.2%  $\pm$  5% at 18 h after injury in NuLi and CuFi, respectively (Fig. 1B, BEGM-EGF<sup>free</sup> + Ab). It has to be noted that wound repair in the complete absence of exogenous or secreted EGF (Fig. 1B, +Ab) was similar in NuLi and CuFi monolayers, indicating that the EGF-independent signaling mechanisms contributing to wound repair are not affected in CuFi cells. However, in the presence of secreted EGF (BEGM-EGF<sup>free</sup> in the absence of EGF Ab; Fig. 1B), stimulation of wound healing was higher for NuLi than for CuFi cells ( $P < 0.0001$ ), suggesting that EGF secretion was lower in CF cells. These results indicated that lower EGF secretion and/or EGF signaling could contribute to the delay in CF monolayer repair.

*EGFR activity in normal and CF bronchial monolayers during repair.* Since bronchial wound repair was dependent on EGF, EGFR expression and EGFR activation (phosphoprotein) were evaluated by immunoblotting (Fig. 2A). The level of erbB1 (EGFR; Fig. 2A) receptor protein expression was evaluated first. We observed that EGFR expression was not affected by elevation of EGF concentration (EGF<sup>0.5</sup> to EGF<sup>25</sup>;  $P = 0.9$ ), whereas 24-h treatment with EGF Ab induced a small (14%) but nonsignificant ( $P = 0.26$ ) decrease in EGFR. Comparison of EGFR expression in NuLi and CuFi extracts revealed a 20% reduction of EGFR in CuFi cells ( $P < 0.02$ ).

EGFR activation was then evaluated by quantifying the ratio of p-EGFR to EGFR signals (p-EGFR/EGFR, presented as percentage of this ratio measured in NuLi extracts in the EGF<sup>0.5</sup> condition). As seen in Fig. 2A, EGFR was activated (2.5-fold increase of p-EGFR/EGFR in NuLi) by 10-min exposure to 25 ng/ml EGF (EGF<sup>25</sup>). In contrast, the presence of 5  $\mu$ g/ml EGF Ab for 24 h in BEGM-EGF<sup>free</sup> (EGF Ab) severely lowered the NuLi p-EGFR<sup>845</sup> level. EGFR activation was also evaluated in bronchial monolayers during repair. In this experiment, proteins were extracted 30–60 min after mechanical injury of the monolayers. Interestingly, EGFR activation was enhanced by 51.6%  $\pm$  18% in injured (wound) compared with intact NuLi monolayers (EGF<sup>0.5</sup>). These results indicated activation of the EGF/EGFR autocrine loop during bronchial monolayer repair.

Comparison of EGFR activation in normal and CF monolayers revealed that the p-EGFR/EGFR level (Fig. 2A) was lower in CuFi than in NuLi cells in basal conditions (EGF<sup>0.5</sup>;  $P = 0.04$ ) as well as after EGF stimulation (10 min, EGF<sup>25</sup>;  $P = 0.04$ ). Finally, p-EGFR<sup>845</sup> activation in wounded bronchial monolayers was also lower in CuFi than in NuLi cells (Fig. 2A, wound;  $P = 0.01$ ). These data indicated that lower EGF secretion and/or EGFR activation during repair could be postulated in CF bronchial cells.

ErbB2 and p-erbB2 levels were also evaluated. Unlike erbB1, erbB2 protein expression was found to be similar in

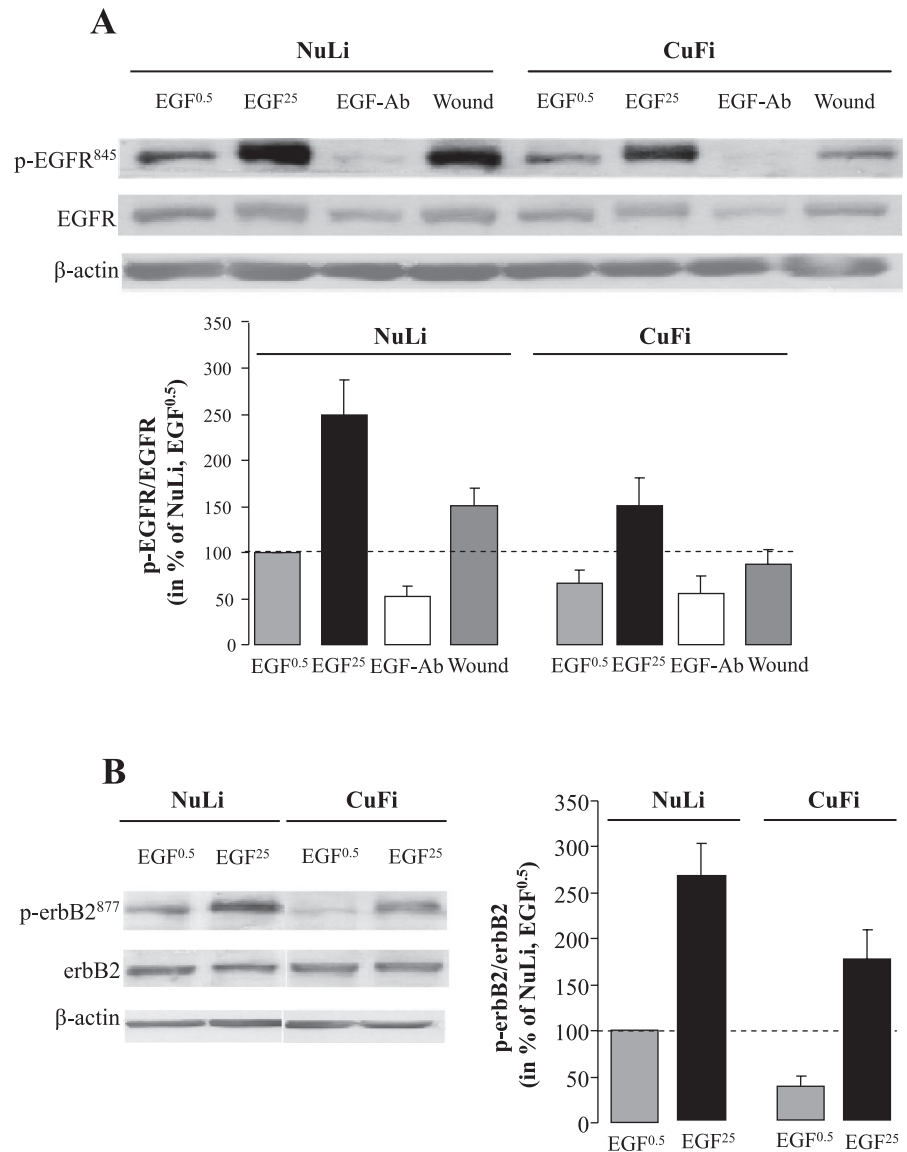


Fig. 2. EGF receptor (EGFR) activation on injury and EGF stimulation in normal and CF bronchial cells. EGFR (A) and erbB2 (B) expression as well as EGFR and erbB2 tyrosine phosphorylation, p-EGFR (A) and p-erbB2 (B), respectively, was compared by immunoblotting. Total cell lysates were extracted from intact NuLi and CuFi monolayers cultured in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> (EGF<sup>0.5</sup>), stimulated with 25 ng/ml EGF (for 10 min before extraction, EGF<sup>25</sup>), or treated with an EGF Ab (5  $\mu$ g/ml in BEGM-EGF<sup>free</sup>, for 24 h before extraction, EGF Ab). Expression in lysates of injured monolayers (wound) was also evaluated. The  $\beta$ -actin signal was used as loading control. EGFR and erbB2 activation was estimated by the ratio of p-EGFR/EGFR signals (A) and p-erbB2/erbB2 signals (B), respectively, and presented as percentage of the ratio measured in NuLi extracts in EGF<sup>0.5</sup>.

NuLi and CuFi cells as well as in EGF<sup>0.5</sup> or EGF<sup>25</sup> conditions. We also discerned a 2.8-fold increase in the p-erbB2<sup>877</sup> level after EGF activation (EGF<sup>25</sup>). On the other hand, p-erbB2 stimulation in wounded monolayers was not detectable (data not shown). Finally, the p-erbB2/erbB2 level was lower in CuFi than in the NuLi in EGF<sup>0.5</sup> as well as in the EGF<sup>25</sup> condition, indicating that erbB2 signaling could also be reduced in CF cells.

**Role of EGF in bronchial cell migration and proliferation.** Since cell migration and proliferation are involved in epithelial regeneration after injury, we also analyzed these processes in NuLi and CuFi cells in various EGF conditions. Migration of NuLi and CuFi cells was evaluated over a 6-h period in a Boyden-type migration chamber, with BEGM-EGF<sup>free</sup> in both the upper and lower compartments. The number of migrating NuLi cells (Fig. 3A, column 1) was higher than the number of CuFi migrating cells (75.8%  $\pm$  3.9% of NuLi cell migration,  $n = 37$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 3A, column 6). This reduced cell migration of CF cells could explain the delay in CF monolayer repair.

The impact of wounded conditioned BEGM-EGF<sup>free</sup> medium (WCM), collected from NuLi (NuLi-WCM) and CuFi (CuFi-WCM) monolayers 1 h after injury, applied at the lower side of the migration chamber, was then tested. The WCM collected from NuLi-injured cells (NuLi-WCM) increased the number of NuLi migrating cells by 43.9%  $\pm$  7.5% ( $n = 27$ ;  $P < 0.0002$ ; Fig. 3A, column 2), a value similar to that observed after the addition of exogenous EGF (0.5 ng/ml, column 5). In addition, the stimulatory effect of NuLi-WCM was completely abolished by the presence of EGF Ab (column 3). On the other hand, the conditioned medium collected from noninjured NuLi monolayers did not significantly (NS) stimulate NuLi cell migration (5.8%  $\pm$  4.5%,  $n = 9$ , NS, data not shown). These results confirm the autocrine activation of cell migration through EGFR activation after EGF secretion postinjury.

The WCM collected from CuFi (CuFi-WCM) also stimulated the migration of CuFi cells (Fig. 3A, column 7;  $P = 0.0003$ ). However, the number of CuFi-migrating cells in the presence of CuFi-WCM (column 7) remained significantly

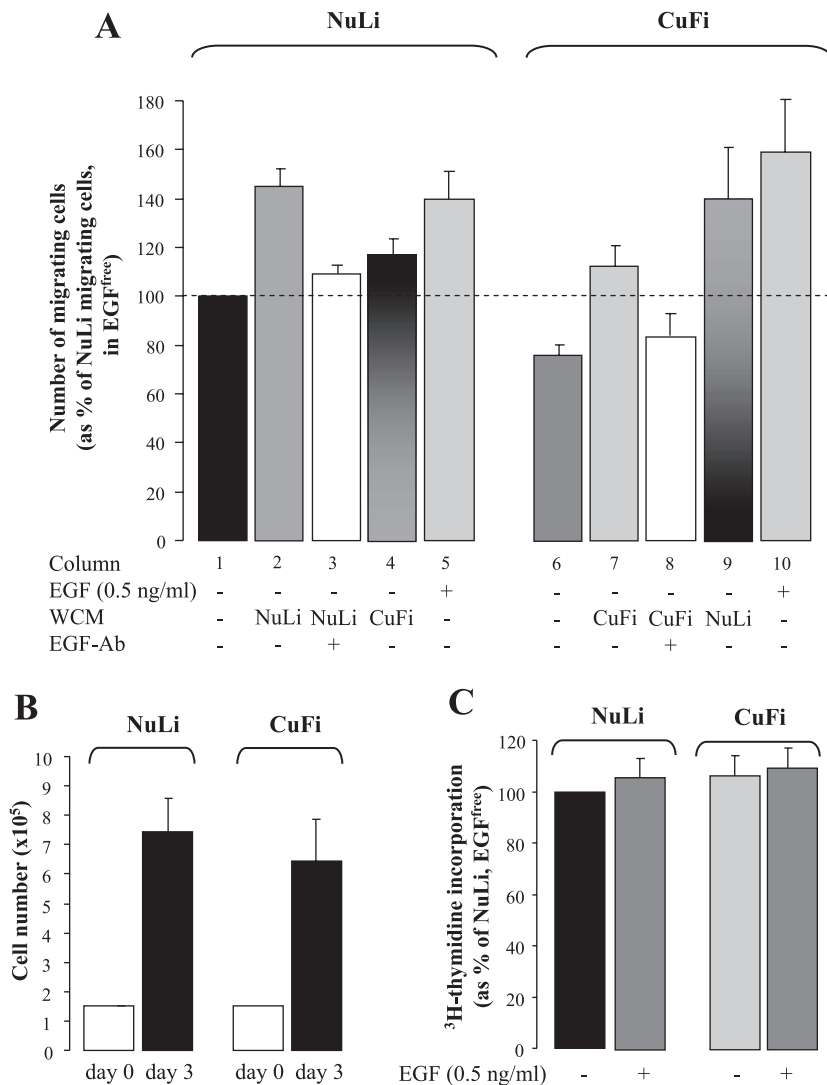


Fig. 3. Role of EGF in bronchial cell migration and proliferation. **A**: the number of NuLi (columns 1–5) and CuFi (columns 6–10) migrating cells was measured over a 6-h period in a Boyden-type chamber in BEGM-EGF<sup>free</sup>. In columns 1 and 6, NuLi and CuFi cell migration, respectively, are measured in the BEGM-EGF<sup>free</sup> control condition. The effect of EGF<sup>free</sup>-conditioned medium, collected 1 h after injury (wounded conditioned medium, WCM) from NuLi (NuLi-WCM, columns 2, 3, and 9) or CuFi (CuFi-WCM, columns 4, 7, and 8) monolayers, was tested on NuLi and CuFi cell migration. EGF Ab (5  $\mu$ g/ml) reversed the stimulatory effect of WCM on NuLi (column 3) and CuFi (column 8) cell migration. Finally, the impact of EGF addition (EGF<sup>0.5</sup>) during migration assay was tested on NuLi (column 5) and CuFi (column 10). The results are presented as percentage of the number of NuLi-migrating cells in BEGM-EGF<sup>free</sup>. NuLi and CuFi cell proliferation assays are reported in **B** and **C**. NuLi and CuFi cell number at *day 0* and after 3 days of culture are compared in **B**. Cell proliferation was also evaluated by [<sup>3</sup>H]thymidine assay, over an 18-h period in NuLi and CuFi in the absence or presence of EGF (0.5 ng/ml).

( $P = 0.002$ ) lower than the number of NuLi-migrating cells measured in the presence of NuLi-WCM (column 2). NuLi-WCM had a higher stimulatory effect on CuFi cell migration (column 9;  $P = 0.002$ ). Conversely, CuFi-WCM was less effective on NuLi cell migration (column 4). These results confirmed higher EGF secretion/EGFR signaling in injured NuLi than CuFi cells.

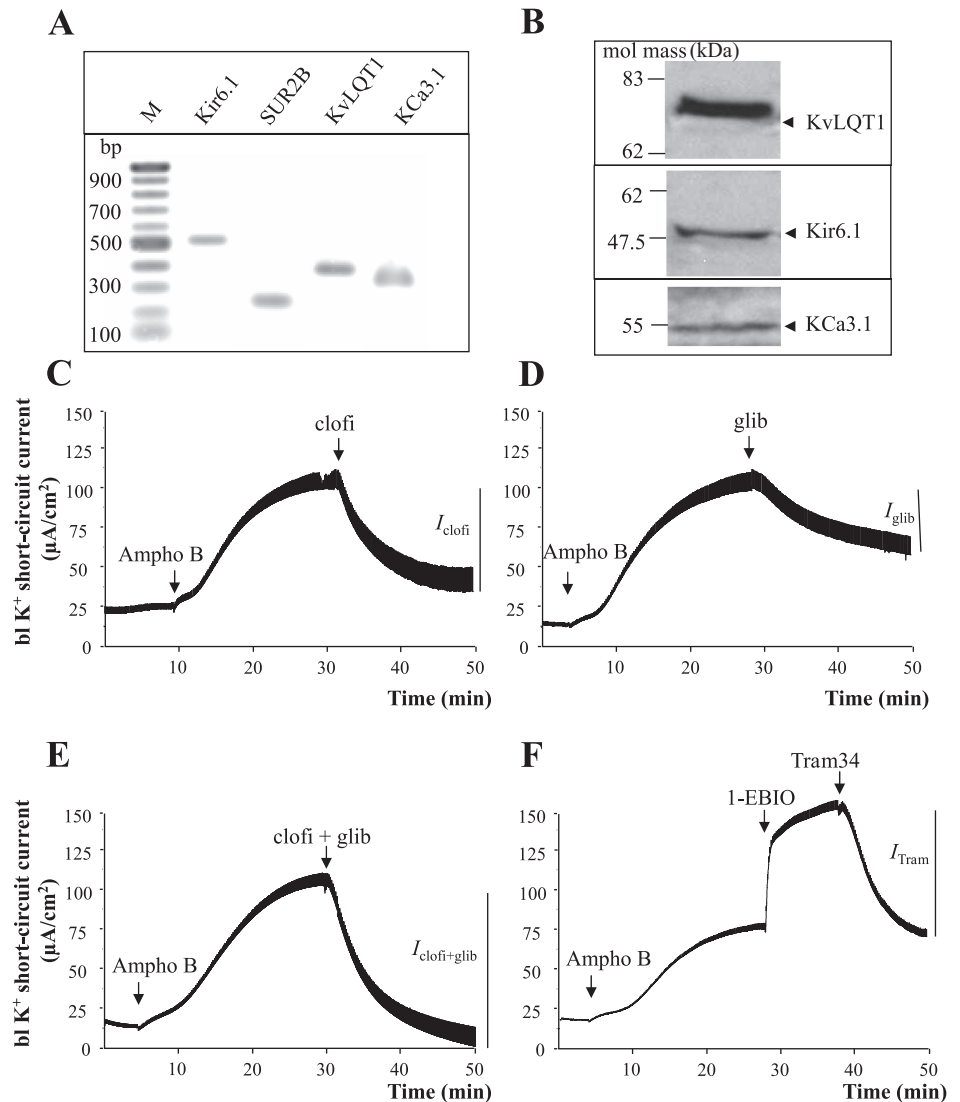
NuLi and CuFi cell proliferation was then compared by evaluating the increase in cell number over a 3-day period of culture (Fig. 3B); 150,000 NuLi or CuFi cells were seeded at *day 0*. After 3 days of culture in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>, the number of cells, counted after detachment with trypsin, was not significantly different in NuLi vs. CuFi. Cell proliferation was also estimated by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay over an 18-h period (Fig. 3C). As with cell count measurements, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in CuFi (106.5%  $\pm$  12% of NuLi,  $n = 20$ ) was not lower than in NuLi cells (Fig. 3C). The presence of EGF (0.5 ng/ml) during the assay elicited a nonsignificant increase in [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in NuLi and CuFi cells (Fig. 3C).

Our migration and proliferation assays indicate that a decrease in cell migration, rather than cell proliferation, could explain the delay in CuFi monolayer repair.

*Evidence of KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 channels in bronchial cells.* We (49) recently demonstrated coupling between EGF signaling and K<sup>+</sup> channels as well as the involvement of K<sup>+</sup> channel activity in EGF-stimulated wound repair of primary cultured alveolar type II cells. Since EGF signaling seems to be downregulated in CuFi cells, we decided to compare K<sup>+</sup> function in NuLi and CuFi bronchial epithelia.

We first defined the identity of K<sup>+</sup> channels, which was not determined yet in NuLi and CuFi cells. As illustrated in Fig. 4A, cDNA transcripts of Kir6.1 and SUR2B (forming a K<sub>ATP</sub> channel) as well as KvLQT1 and KCa3.1 were detected in bronchial cells. K<sub>ATP</sub> (Kir6.1), KvLQT1, and KCa3.1 proteins were also revealed by Western blotting (Fig. 4B). We explored the presence of K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and KCa3.1 activities in bronchial monolayers. NuLi cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and mounted in an Ussing chamber to measure transepithelial  $I_{sc}$ . In these experiments, the apical membrane was permeabilized with amphotericin B and an apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient was established to estimate the presence of active K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane. Clofilium (Fig. 4C; an inhibitor of KvLQT1 channels) or glibenclamide (Fig. 4D; an inhibitor of K<sub>ATP</sub> channels) applied at the basolateral membrane revealed

Fig. 4. Evidence of functional ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>), KvLQT1, and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (KCa3.1) channels in the NuLi bronchial epithelium. **A**: representative RT-PCR amplification of Kir6.1 and SUR2B (forming the K<sub>ATP</sub> channel), KvLQT1, and KCa3.1 transcripts from NuLi cells. M, marker. **B**: detection of KvLQT1, Kir6.1, and KCa3.1 proteins by Western blot analysis of NuLi cell lysates. The presence of active KvLQT1 (**C**), K<sub>ATP</sub> (**D**), and KCa3.1 (**F**) K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane (bl) of NuLi epithelia was evaluated by measuring short-circuit transepithelial currents in an Ussing chamber. In these experiments, filters were bathed with asymmetrical physiological medium (high K<sup>+</sup> at the apical side and low K<sup>+</sup> at the basolateral side). The apical membrane was then permeabilized by perfusion of the apical chamber with the same high-K<sup>+</sup> medium supplemented with 7.5 μM amphotericin B (Ampho B). On stabilization of the current (~20 min), various K<sup>+</sup> channel modulators were applied at the basolateral side: clofilium (clofi, a KvLQT1 inhibitor, 100 μM; **C**), glibenclamide (glib, a K<sub>ATP</sub> inhibitor, 100 μM; **D**), a combination of clofilium and glibenclamide (**E**), and 1-EBIO (an opener of KCa3.1, 1 mM) followed by TRAM-34 (an inhibitor of KCa3.1, 5 μM; **F**). Clofilium (*I*<sub>clofi</sub>-), glibenclamide (*I*<sub>glib</sub>-), clofilium and glibenclamide (*I*<sub>clofi+glib</sub>-), and TRAM-34 (*I*<sub>Tram</sub>-sensitive currents were thus evaluated.



the presence of clofilium (*I*<sub>clofi</sub>-) and glibenclamide-sensitive (*I*<sub>glib</sub>) *I*<sub>sc</sub> through functional KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels, respectively. It has to be noted that a combination of clofilium and glibenclamide completely abolished total basolateral K<sup>+</sup> currents (Fig. 4E). We also observed that 1-EBIO (an opener of KCa3.1 channels) stimulated basolateral K<sup>+</sup> *I*<sub>sc</sub>. This current was reversed by TRAM-34 (*I*<sub>Tram</sub>), a specific inhibitor of KCa3.1 (Fig. 4F).

**Comparison of K<sup>+</sup> currents in normal and CF bronchial monolayers.** We then quantified and compared K<sup>+</sup> currents through the basolateral membrane of NuLi and CuFi cells in an Ussing chamber, after apical membrane permeabilization and establishment to an apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient (Fig. 5). Total K<sup>+</sup> currents through the basolateral membrane of NuLi and CuFi were compared first. We recorded 99 ± 11 and 67 ± 6 μA/cm<sup>2</sup> K<sup>+</sup> currents through the basolateral membrane of NuLi and CuFi monolayers, respectively, i.e., a one-third decrease in CF cells (*P* < 0.0001; *n* = 16; Fig. 5A).

Similarly to the experiments reported in Fig. 4, C and D, clofilium and glibenclamide were applied at the basolateral membrane to specifically inhibit KvLQT1 (clofilium-sensitive

K<sup>+</sup> current, *I*<sub>KvLQT1</sub>; Fig. 5, B and D) and K<sub>ATP</sub> (glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> current, *I*<sub>KATP</sub>; Fig. 5, C and E) currents. Clofilium-sensitive K<sup>+</sup> current and glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> current through the NuLi basolateral membrane were 54.6 ± 11 μA/cm<sup>2</sup> (*n* = 7; Fig. 5B) and 38 ± 7 μA/cm<sup>2</sup> (*n* = 6; Fig. 5C), respectively. The total of these two currents (54 + 38 = 92 μA/cm<sup>2</sup>) was similar to total K<sup>+</sup> current (99 μA/cm<sup>2</sup>; Fig. 5A) in the absence of the inhibitors. Consistently, we observed (Fig. 4E) that clofilium and glibenclamide, applied in combination, completely blocked total basolateral K<sup>+</sup> currents. These results indicate that KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels contribute to the major part of basolateral K<sup>+</sup> current through NuLi epithelia. In CuFi cells, KvLQT1 currents (26.6 ± 4.5 μA/cm<sup>2</sup>, *n* = 7; Fig. 5B) and K<sub>ATP</sub> currents (19.1 ± 2.4 μA/cm<sup>2</sup>, *n* = 6; Fig. 5C) were lower (*P* < 0.05) than in normal NuLi cells. We also compared KCa3.1 current after activation by 1-EBIO, which was found to be higher in NuLi (69.1 ± 13, *n* = 4) than in CuFi (21.3 ± 13, *n* = 4) epithelia. Taken together, our electrophysiological results demonstrated lower KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 currents through the basolateral membrane of CuFi than NuLi.



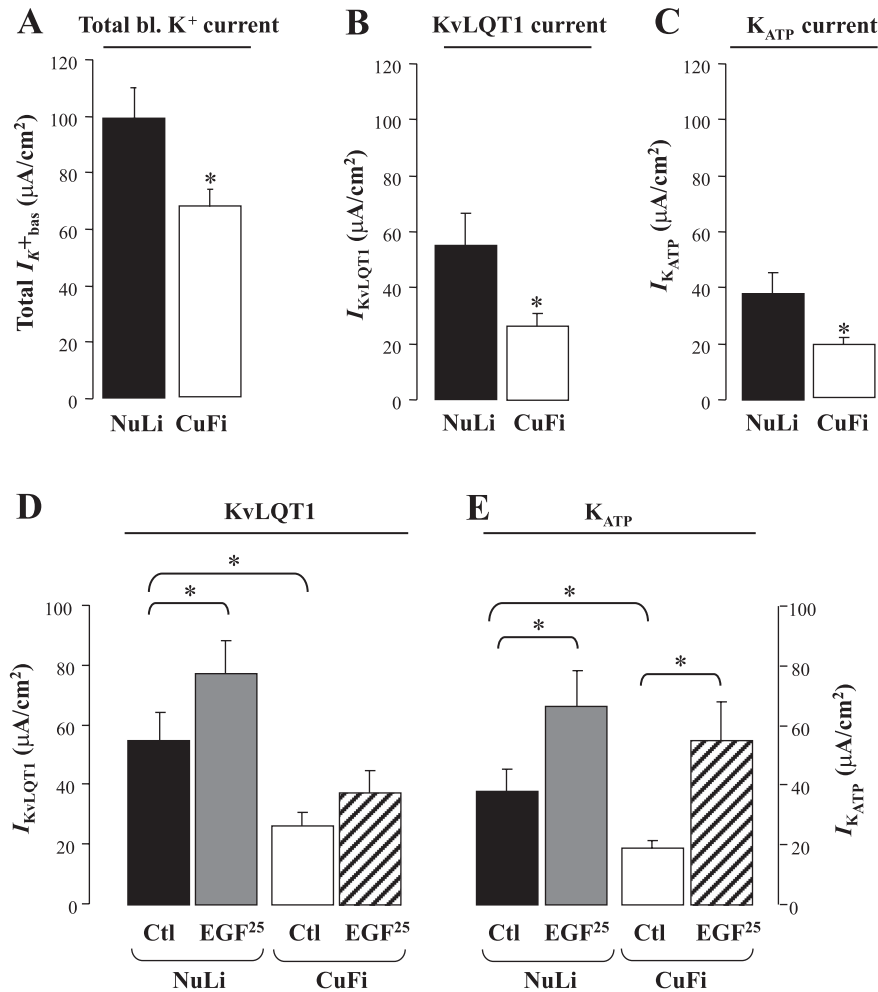


Fig. 5. Comparison of K<sup>+</sup> currents in NuLi and CuFi epithelia. A: total basolateral K<sup>+</sup> currents ( $I_{K^{+}bas}$ ) measured through NuLi and CuFi epithelia (cultured at the air-liquid interface) mounted in an Ussing chamber in the presence of a K<sup>+</sup> gradient (apical to basolateral) and after apical membrane permeabilization with amphotericin B (7.5  $\mu M$ ). Clofilium-sensitive current ( $I_{KvLQT1}$ ; B; see Fig. 4C for details of measurement of this current) as well as glibenclamide currents ( $I_{K_{ATP}}$ ; C; see Fig. 4D) were also compared in NuLi and CuFi epithelia. The effect of acute EGF application [25 ng/ml (EGF<sup>25</sup>)] at the basolateral side for 10 min before application of the specific K<sup>+</sup> channel inhibitor was tested on KvLQT1 (D) and K<sub>ATP</sub> (E) currents through NuLi and CuFi epithelia. \* $P < 0.05$ .

Since we (49) have shown previously that alveolar KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> currents are stimulated by acute (10 min) EGF exposure, we also evaluated the impact of EGF on K<sup>+</sup> currents in bronchial cells (Fig. 5, D and E). This acute EGF treatment stimulated KvLQT1 currents in NuLi cells ( $54.6 \pm 11.4$  and  $77.1 \pm 11.9 \mu A/cm^2$ , in the absence and presence of EGF,  $n = 7$ ;  $P = 0.009$ ), whereas it had a small (NS) effect in CuFi cells ( $26.6 \pm 4.5$  and  $37.7 \pm 7.4 \mu A/cm^2$ ,  $n = 7$ ;  $P = 0.13$ ). EGF also upregulated glibenclamide-sensitive K<sub>ATP</sub> current of NuLi ( $37.9 \pm 7.2$  and  $66.1 \pm 11.8 \mu A/cm^2$ , before and after EGF addition, respectively,  $n = 6$ ;  $P = 0.0036$ ) and CuFi epithelia ( $19.1 \pm 2.4$  and  $54.7 \pm 13.1 \mu A/cm^2$ , before and after EGF addition, respectively,  $n = 6$ ;  $P = 0.037$ ). On the other hand, acute EGF treatment had no effect on either NuLi or CuFi KCa3.1 current (data not shown). Finally, we tested the impact of 24-h EGF treatment on bronchial cells and noted that neither KvLQT1 nor K<sub>ATP</sub> K<sup>+</sup> currents were affected by this treatment (data not shown).

**Comparison of K<sup>+</sup> channel expression in normal and CF bronchial monolayers.** Because we observed lower K<sup>+</sup> currents in CuFi, we explored a possible decrease in K<sup>+</sup> channel expression in these CF cells. Comparison of K<sup>+</sup> channel expression in NuLi and CuFi cells measured by immunoblotting (Fig. 6) revealed lower expression of KvLQT1, Kir6.1, and KCa3.1 proteins in CF cells in all EGF conditions tested.

Indeed, the KvLQT1 expression level in CuFi cells was  $36.8\% \pm 5.5\%$  (EGF<sup>0.5</sup>,  $n = 8$ ;  $P = 0.0003$ ),  $33.8\% \pm 4.6\%$  (EGF<sup>free</sup>,  $n = 8$ ;  $P = 0.0001$ ), and  $30.2\% \pm 9.5\%$  (EGF<sup>25</sup>,  $n = 7$ ;  $P = 0.02$ ) lower than in NuLi cells. A severe decline of Kir6.1 expression was also apparent in CuFi cells (compared to NuLi cells) in all EGF conditions tested (decreases of  $69.7\% \pm 5.5\%$ ,  $53.9\% \pm 13\%$ , and  $44.5\% \pm 14\%$  with EGF<sup>free</sup>, EGF<sup>0.5</sup>, and EGF<sup>25</sup>, respectively,  $n = 5$ ). KCa3.1 channel protein expression was tested only in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> (Fig. 6C). Similar to KvLQT1 and Kir6.1 proteins, KCa3.1 was also reduced in CuFi cells ( $55.6\% \pm 14.8\%$  of NuLi cells,  $n = 4$ ).

Experiments in the Ussing chamber disclosed that chronic treatment with EGF (for 24 h) failed to increase K<sup>+</sup> currents. Consistent with this finding, we verified that KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> expression was not modified in bronchial monolayers treated for 24 h with EGF (25 ng/ml; Fig. 6, A and B). Similarly, K<sup>+</sup> channel expression was not affected by the absence of EGF (EGF 0; Fig. 6, A and B). These results indicated that EGF signaling could regulate bronchial K<sup>+</sup> channels through changes of channel activity and/or surface membrane expression rather than variation of total protein expression.

**Impact of K<sup>+</sup> channel modulators on bronchial wound healing, cell migration, and proliferation.** We (49) recently demonstrated that the repair processes of alveolar epithelia are

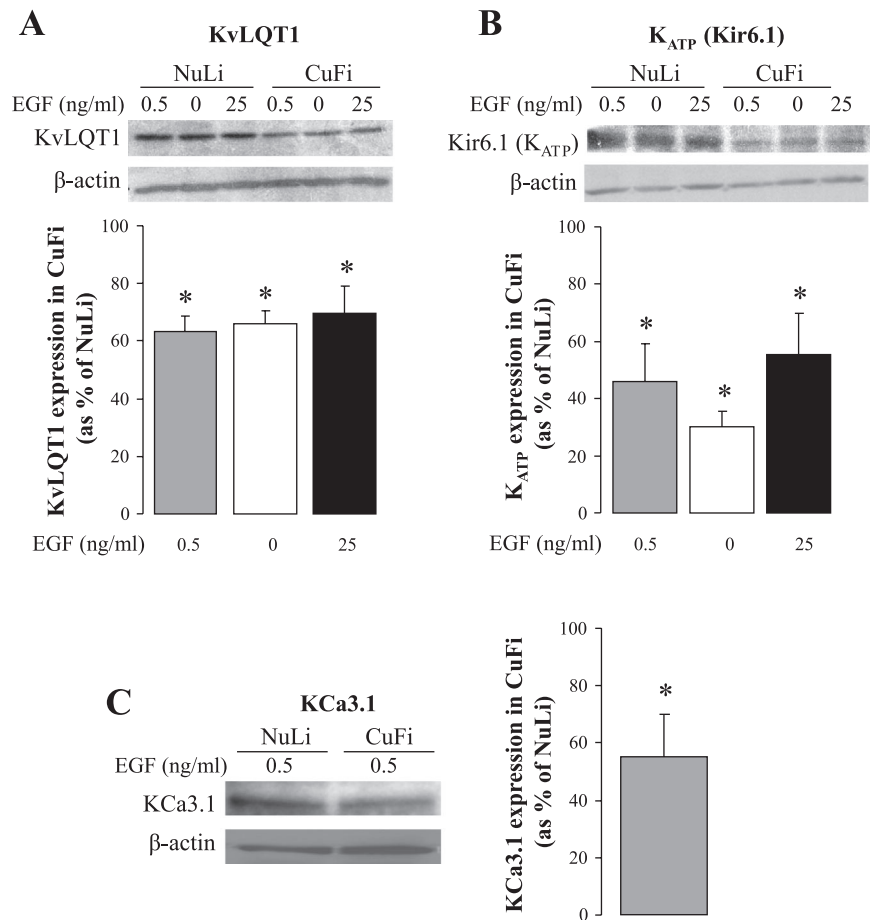
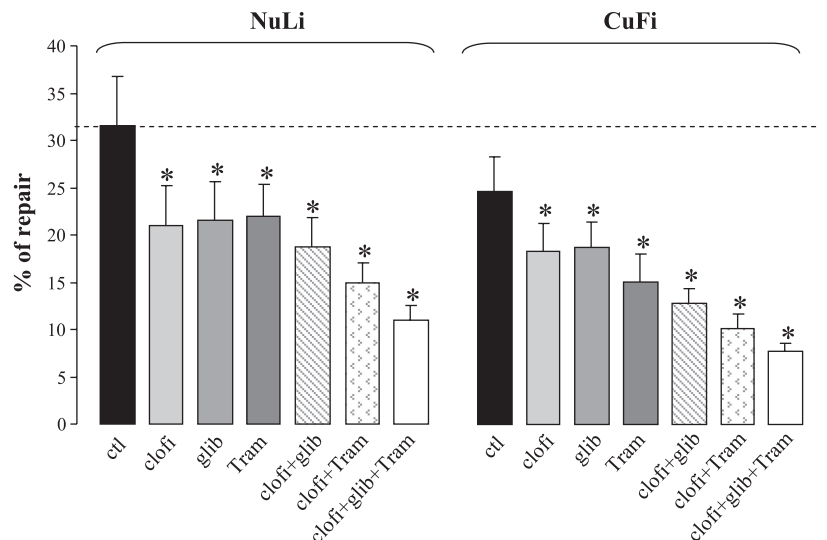


Fig. 6. Reduced K<sup>+</sup> channel expression in CF cells. KvLQT1 (A) and Kir6.1 (K<sub>ATP</sub>; B) protein expression was compared by immunoblotting in NuLi and CuFi cell extracts cultured in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>, BEGM-EGF<sup>free</sup> (EGF 0), and after the addition of EGF (BEGM-EGF<sup>25</sup>). KCa3.1 protein expression in NuLi and CuFi cells cultured in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> was also evaluated (C). Representative immunoblots are presented. K<sup>+</sup> channel expression in CuFi is reported as percentage of K<sup>+</sup> channel protein expression measured in NuLi cells. \**P* < 0.05.

dependent on K<sup>+</sup> channel activity. Their potential role in wound healing of normal and CF bronchial monolayers was now evaluated using K<sup>+</sup> channel inhibitors. In the presence of EGF (BEGM-EGF<sup>0.5</sup>; Fig. 7, left), wound repair of NuLi monolayers (31.5% ± 5.5% at 6 h after injury, in the absence of inhibitors) was significantly reduced by clofilium (21% ± 4.2% of repair, *n* = 12; *P* = 0.0011), glibenclamide (21.5% ± 4.1% of repair, *n* = 12; *P* = 0.016), and TRAM-34 (22% ± 3.3% of

repair, *n* = 12; *P* = 0.016). It is noteworthy that the inhibitory effects of these compounds were similar. A combination of two or three inhibitors decreased bronchial repair more severely (11% ± 1.5% of repair in their presence). The impact of these pharmacological agents was then tested on CuFi cell monolayers (Fig. 7, right). Similarly to Fig. 1A, we observed that wound healing of CuFi (24.6% ± 3.6%) was lower than that of NuLi (compare Fig. 7, left and right). In addition, wound

Fig. 7. Effect of K<sup>+</sup> channel inhibitors on bronchial wound healing. NuLi and CuFi bronchial epithelial cell monolayers were injured mechanically, and the percentage of wound healing measured after 6 h (in the presence of BEGM-EGF<sup>0.5</sup>) was compared in control monolayers (ctl) and monolayers treated with clofilium (an inhibitor of KvLQT1 channels, 5 μM, *n* = 12), glibenclamide (an inhibitor of K<sub>ATP</sub> channels, 100 μM, *n* = 12), TRAM-34 (an inhibitor of KCa3.1 channels, Tram, 5 μM, *n* = 9), or combination of clofilium and glibenclamide (clofi+glib, *n* = 9), clofilium and TRAM-34 (clofi+Tram, *n* = 9), or the 3 inhibitors together (*n* = 9). \**P* < 0.05. These results showed that the major part of bronchial repair was dependent on K<sup>+</sup> channel activity.



healing of CuFi was significantly inhibited by clofilium ( $P < 0.0001$ ), glibenclamide ( $P = 0.008$ ), TRAM-34 ( $P < 0.0001$ ), and a combination of two (clofi + glib or clofi + Tram) or three (clofi + glib + Tram) of these inhibitors ( $P < 0.001$ ). The results indicated that EGF-stimulated wound healing of NuLi and CuFi monolayers depends on K<sup>+</sup> channel activity.

We also tested the effect of pinacidil, a K<sub>ATP</sub> activator, on NuLi and CuFi wound repair. Unfortunately, pinacidil failed to increase NuLi and CuFi wound healing in either BEGM-EGF<sup>0.5</sup> or BEGM-EGF<sup>free</sup> (data not shown). It has to be noted, however, that in these conditions, EGF secreted by injured/repairing cells already stimulated K<sup>+</sup> channels and wound healing. Accordingly, cell migration of intact NuLi and CuFi cells measured in the Boyden-type chamber in BEGM-EGF<sup>free</sup> was efficiently stimulated by pinacidil, i.e., a 149% ± 17% increase in NuLi ( $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ; Fig. 8A, column 2) and 134.7% ± 10% in CuFi ( $n = 6$ ;  $P = 0.02$ ; Fig. 8A, column 6) cell migration. This stimulation was similar to that observed after the addition of EGF (BEGM-EGF<sup>0.5</sup>; Fig. 8A, columns 3 and 7;  $n = 22$ ).

EGF-stimulated cell migration was highly sensitive to K<sup>+</sup> channel inhibitors. Indeed, combined treatment with glibenclamide, clofilium, and TRAM-34 reduced NuLi and CuFi cell migration to 35.5% ± 7.9% (Fig. 8A, column 4) and 20.8% ± 2.2% (Fig. 8A, column 8) of NuLi cell migration in control conditions, demonstrating that K<sup>+</sup> activity is crucial for EGF-stimulated bronchial cell migration.

The impact of K<sup>+</sup> channel inhibitors was then tested on NuLi and CuFi cell proliferation measured in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>. The addition of K<sup>+</sup> channel inhibitors (glibenclamide, clofilium, and TRAM-34) severely reduced [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation (Fig. 8B;  $n = 6$ ;  $P < 0.0009$ ). Pinacidil failed to increase NuLi and CuFi cell proliferation (data not shown).

**Effect of CFTR inhibition on wound healing, cell migration, and K<sup>+</sup> channel expression.** The role of CFTR channel activity in NuLi bronchial wound healing was also evaluated. We saw that the presence of the CFTR inhibitor (CFTR<sub>inh</sub>-172, 10 μM) during repair induced a slight, nonsignificant decrease in NuLi wound repair (36.5% ± 5.5% and 27.2% ± 4% of repair in the absence or presence of CFTR<sub>inh</sub>-172,  $n = 7$ , NS). This negative control also confirmed that the observed inhibitory effect of glibenclamide (an inhibitor of K<sub>ATP</sub> and CFTR channels) was specific to K<sub>ATP</sub> channels. As expected, CFTR<sub>inh</sub>-172 had no significant impact (21.6% ± 2.9% and 17.7% ± 2.3% of repair in the absence and presence of CFTR<sub>inh</sub>-172) in CuFi cells, which did not express functional CFTR channels. It should be mentioned that this compound is toxic (several cells were detached after the 6-h period of treatment), probably explaining the slight decline in NuLi and CuFi monolayer repair. A lower concentration of CFTR<sub>inh</sub>-172 (5 μM) was less toxic. Subsequent experiments, reported in Fig. 9, were then performed in the presence of 5 μM CFTR<sub>inh</sub>-172. At this concentration, we recorded 28.9% ± 4.1% and 24.3% ± 4.2% of NuLi repair in the absence and presence of CFTR<sub>inh</sub>-172 ( $n = 6$ , NS; Fig. 9A, NuLi). Pretreatment with CFTR<sub>inh</sub>-172 24 h before the wound assay, followed by another treatment at *time 0*, did not elicit a greater inhibitory effect on NuLi repair (23.8% ± 3.3% of repair,  $n = 6$ , NS). Similarly, we observed a slight, nonspecific inhibition of CuFi wound healing in the presence of CFTR<sub>inh</sub>-172 (Fig. 9A, CuFi).

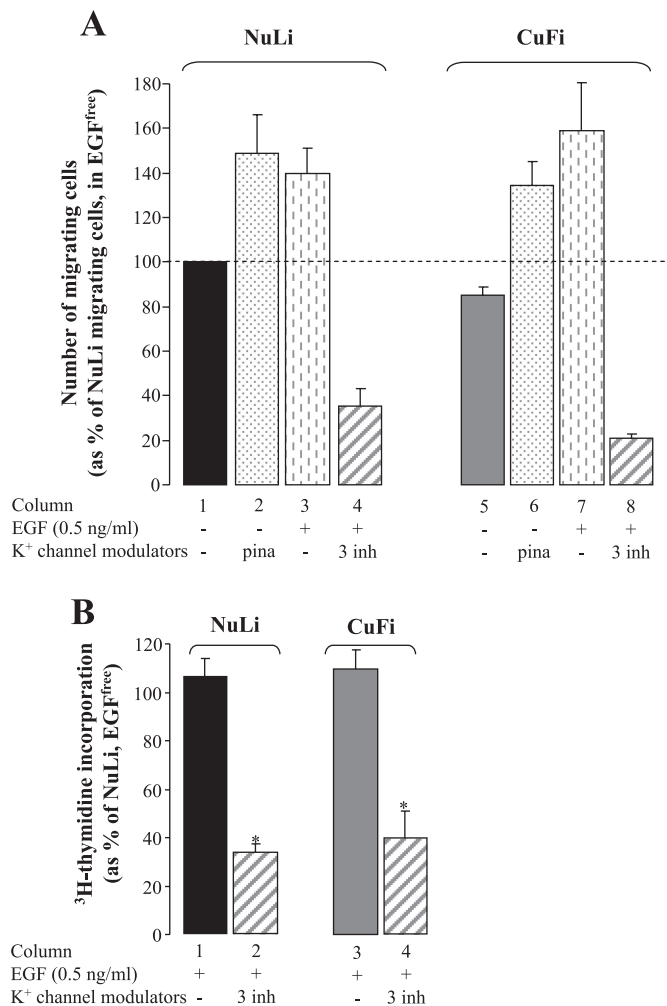
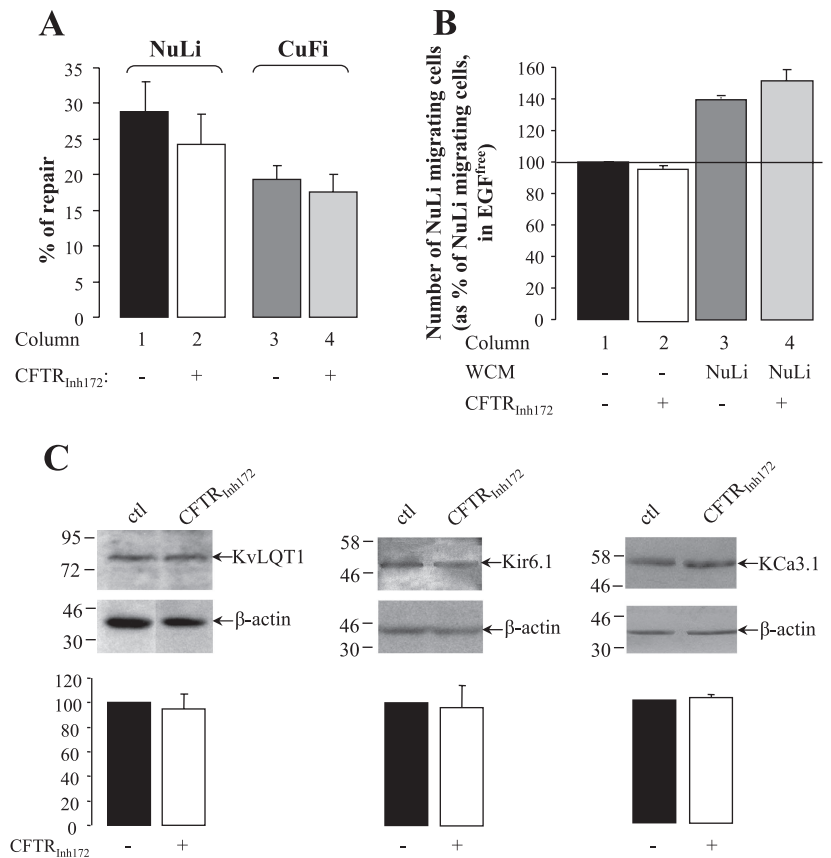


Fig. 8. Effect of K<sup>+</sup> channel modulators on bronchial cell migration and proliferation. A: the number of NuLi (columns 1–4) and CuFi (columns 5–8) migrating cells was measured over a 6-h period in a Boyden-type chamber. NuLi (columns 1 and 2) and CuFi (columns 5 and 6) cell migration was 1st measured in BEGM-EGF<sup>free</sup> in the absence (columns 1 and 5) or presence of pinacidil (pina, an activator of K<sub>ATP</sub> channels, 100 μM, columns 2 and 6). NuLi (columns 3 and 4) and CuFi (columns 7 and 8) cell migration, stimulated by BEGM-EGF<sup>0.5</sup>, was then compared in the absence (columns 3 and 7) or presence of K<sup>+</sup> channel inhibitors (100 μM glibenclamide + 5 μM clofilium + 5 μM TRAM-34, 3 inh, columns 4 and 8). The results are presented as percentage of the number of NuLi-migrating cells in BEGM-EGF<sup>free</sup>. B: NuLi and CuFi cell proliferation, estimated by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, was also compared in the absence (columns 1 and 3) and presence (columns 2 and 4) of K<sup>+</sup> channel inhibitors (100 μM glibenclamide + 5 μM clofilium + 5 μM TRAM-34) in BEGM-EGF<sup>0.5</sup>. \* $P < 0.05$ .

NuLi cell migration was not affected by CFTR<sub>inh</sub>-172 (Fig. 9B, column 2). We also evaluated a possible impact of CFTR inhibition on EGF secretion and signaling, estimated by migration assay in the presence of conditioned medium. In these experiments, we compared the stimulatory effect on NuLi cell migration of WCM from NuLi monolayers treated or not during repair with CFTR<sub>inh</sub>-172. As illustrated in Fig. 9B (columns 3 and 4), CFTR<sub>inh</sub>-172 was ineffective, suggesting that EGF secretion by injured/repairing cells was not reduced after CFTR inhibition.

Because K<sup>+</sup> channel expression was reduced in CuFi cells, we evaluated whether CFTR current inhibition, with CFTR<sub>inh</sub>-

Fig. 9. Impact of CFTR inhibition on wound healing, cell migration, and K<sup>+</sup> channel expression. **A**: wound healing after NuLi (columns 1 and 2) and CuFi (columns 3 and 4) monolayer injury, measured in the absence (–, columns 1 and 3) or presence (+, columns 2 and 4) of the CFTR inhibitor, CFTR<sub>inh</sub>-172 (5 μM). **B**: NuLi cell migration in the Boyden-type chamber was measured in the absence (–, columns 1 and 3) or presence (+, columns 2 and 4) of CFTR<sub>inh</sub>-172 (5 μM). The stimulatory effect on NuLi cell migration of conditioned medium, collected from NuLi-injured monolayers (WCM, NuLi, columns 3 and 4), treated (column 4) or not (column 3) during repair with CFTR<sub>inh</sub>-172 was also compared. Finally, the effect of CFTR<sub>inh</sub>-172 on KvLQT1, Kir6.1, and KCa3.1 channel protein was also evaluated (C) and quantified as percentage of channel expression in the absence of the inhibitor normalized by β-actin signal.



172, could decrease K<sup>+</sup> channel expression in NuLi cells. We found (Fig. 9C) that KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 channels were not affected by CFTR<sub>inh</sub>-172, indicating that 24-h inhibition of CFTR currents failed to downregulate NuLi K<sup>+</sup> channel expression to the level in CuFi cells.

## DISCUSSION

The regulatory mechanisms that control the repair processes of injured CF bronchial epithelia need to be better understood. Using a model of normal (NuLi) and CF (CuFi) bronchial epithelia, we demonstrated that EGF signaling is a crucial component of bronchial repair. Indeed, wound healing and bronchial cell migration were highly dependent on EGF, probably secreted by bronchial cells during repair. Furthermore, we observed that wound healing of non-CF monolayers was faster than that of CF monolayers. This delay in CuFi repair probably arose from reduced cell migration. Our results also suggested lower EGF secretion by injured/repairing CuFi cells as well as decreased EGFR activation in CuFi cells during repair. Coupled to this decline of EGF signaling, we demonstrated reduced KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 K<sup>+</sup> currents and protein expression in CuFi cells. The activity of these K<sup>+</sup> channels seems crucial for EGF-stimulated wound healing as well as for cell migration and proliferation, which are largely sensitive to K<sup>+</sup> channel inhibitors. In summary, our results indicated that defective EGF/EGFR signaling and responsiveness in CuFi cells, coupled with reduced K<sup>+</sup> channel expression and function, could contribute to the delay in CF monolayer repair.

*Delayed CF wound healing in response to EGF.* The role of the EGF/EGFR pathway in the repair processes of normal and

CF bronchial epithelia was evaluated in a mechanical wounding model of human bronchial NuLi and CuFi monolayers. Our results showed that bronchial wound healing was stimulated by exogenous EGF (2-fold increase in BEGM-EGF<sup>0.5</sup> compared with BEGM-EGF<sup>free</sup>). EGF also stimulated bronchial cell migration, whereas bronchial cell proliferation was not regulated by EGF in the conditions of this assay. Stimulation of wound repair by EGF could then probably be secondary to an increment of cell migration rather than cell proliferation.

Titration of EGF with an EGF Ab in BEGM-EGF<sup>free</sup> dramatically reduced bronchial repair. This result indicated stimulation of wound healing after EGF secretion by epithelial cells during repair. Consistently, we discerned EGFR activation (elevated p-EGFR level) in wounded NuLi monolayers. Similarly, EGFR activation was seen at the wound edge of 16HBE14o- cells (39). We also demonstrated that conditioned medium collected from injured bronchial monolayers stimulated cell migration to a level similar to that recorded after exogenous EGF addition. The stimulatory effect of the conditioned medium was abolished in the presence of EGF Ab. These data, favoring an autocrine EGF loop in the control of bronchial epithelial repair, are in agreement with previous studies showing the contribution of EGF signaling in airway repair and remodeling (3, 18, 39, 47, 53).

Comparison of wound repair rates in normal NuLi and CF CuFi established that wound healing of CuFi monolayers was delayed compared with NuLi in the presence of secreted and/or exogenous EGF. This result indicated that the response to EGF could be defective in CF cells. Our NuLi and CuFi cell migration and proliferation assays disclosed a decrease in CuFi

cell migration, whereas NuLi and CuFi cell proliferation was similar. These results suggested that the observed delay in CuFi wound healing could be consecutive to decreased cell migration rather than cell proliferation. This delay in CF epithelial repair is consistent with the findings of Hajj and colleagues (15), demonstrating delayed and abnormal regeneration of CF tracheal epithelia in a xenograft model. They reported that the two first repair steps, i.e., cell migration and proliferation, were not defective in CF epithelia compared with the controls. In fact, higher cell proliferation rates were found in CF-repairing epithelia (15). In contrast, our proliferation assay, performed on intact subconfluent cultures, showed similar proliferation levels of NuLi and CuFi cells. Hajj and colleagues (15) also reported epithelial remodeling, delayed differentiation/reepithelization, as well as altered proinflammatory and matrix metalloproteinase (MMP) responses in their CF model. More precisely, IL-8, MMP-7, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) levels were elevated in CF epithelia. As detailed below, our findings suggested that EGF signaling and K<sup>+</sup> function could also be affected in CF cells.

*EGFR expression, activation, and ligands in CF cells.* ErbB1 (and, at a lower level, erbB2) receptors were detected in NuLi and CuFi cell extracts. The presence of these receptors was consistent with the reported distribution of erbB receptors in airways (1, 3, 38, 51, 52). Several studies have shown that EGFR expression could be affected in lung pathologies characterized by injury and remodeling. In asthmatic airways, for example, higher EGFR expression has been reported (3, 39). In CF, Voynow et al. (52) predominantly detected EGFR in proliferative areas (mainly basal cells) of CF lung sections. Another study demonstrated that EGFR staining intensity did not differ in airway and alveolar tissues from CF and control lungs. Surprisingly, EGFR staining was reduced in the CF peribronchial submucosal region, which was characterized by a higher number of proliferative cells (16). In our study, total erbB1 (EGFR) expression was slightly (20%) lower in CF (CuFi) than in normal (NuLi) cell extracts, whereas total erbB2 receptor expression was similar in NuLi and CuFi. Our results, like those of Hardie et al. (16), support the hypothesis that EGFR ligands (EGF, TGF- $\alpha$ , etc.) and/or EGFR activation, rather than total EGFR expression level, could be regulated in injured CF airways. Indeed, we noted that erbB1 and erbB2 activation, estimated by their normalized phosphorylation levels, was significantly lower in CuFi than in NuLi cells. Interestingly, p-EGFR stimulation in wounded CuFi monolayers was reduced compared with wounded NuLi monolayers. This defect could be due to the decreased synthesis of pro- or mature EGF and/or reduced EGF secretion by injured/repairing cells. Lower expression at the plasma membrane of activable EGFR and/or defective EGFR tyrosine kinase activity cannot be disregarded. Cell migration data obtained in the presence of WCM favor lower EGF secretion by CF cells during repair. Indeed, we observed that CuFi cell migration, stimulated by WCM from CuFi (CuFi-WCM), was lower than NuLi cell migration in the presence of NuLi-WCM. In the presence of NuLi-WCM, CuFi cell migration was significantly enhanced. Conversely, CuFi-WCM was less effective on NuLi cell migration, confirming that EGF secretion by repairing CuFi cells could be lower.

We are aware that our results, suggesting lower EGFR signaling and/or EGF secretion during CF bronchial epithelia repair in vitro, are not necessarily representative of the complex mechanisms involved in airway repair in vivo. Indeed, growth factor signaling in vivo involves several types of molecules, such as TGF- $\beta$ , HGF, KGF, or EGF, secreted by different cell types, including epithelial and endothelial cells, fibroblasts, and macrophages. These factors act together to control epithelial repair and remodeling. Elevated TGF- $\beta$ , KGF, and VEGF levels have been detected in the airways, sputum, and serum of CF patients (47). To our knowledge, there is actually no clear evidence in the literature of up- or downregulation of EGF secretion by CF airway epithelial cells. As pointed out in a review by Shute et al. (47), elevated levels of some growth factors (TGF- $\beta$ , KGF, and VEGF) in CF airways seem insufficient to protect lung epithelia against the progression of injury and remodeling. For this reason, we thought that it was necessary to better understand the regulatory mechanisms of airway epithelia remodeling and to identify some alternative pathways involved in tissue repair.

*Evidence of KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 channels in bronchial epithelia.* Many types of K<sup>+</sup> channels are expressed in airway and lung epithelial cells. Among them, KvLQT1 is expressed in the upper and lower airways (9, 14, 31) as well as in alveoli (26). A calcium-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance, KCa3.1, is also detected in tracheal, bronchial, and alveolar cells (6, 26, 32). Evidence of KvLQT1 and KCa3.1 mRNA and proteins in human bronchial NuLi and CuFi cells is thus consistent with their tissular distribution in the lungs. These channels have been mostly studied in airways since they play a crucial role in Cl<sup>-</sup> secretion (6, 28, 30, 48). We recently reported the presence of another K<sup>+</sup> channel, a K<sub>ATP</sub> channel (25), which is involved in ion and fluid absorption through the alveolar epithelium (25, 26). In the current study, we demonstrated this K<sub>ATP</sub> channel in NuLi and CuFi bronchial cells.

Short-circuit experiments in the Ussing chamber showed that KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 channels were functional in NuLi and CuFi cells. However, a major part of basolateral K<sup>+</sup> current (measured through apically permeabilized bronchial epithelia) was driven by KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> channels. Indeed, the addition of clofilium-sensitive (55  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>) and glibenclamide-sensitive (38  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>) currents amounted to total K<sup>+</sup> currents (99  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>) measured in the absence of the inhibitors (Fig. 5). Consistently, these two inhibitors, employed in combination, reduced basolateral  $I_{sc}$  to zero (Fig. 4E). In basal conditions, intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) is probably too low to activate KCa3.1 channels. Nevertheless, it was possible to activate them with the 1-EBIO opener; this current was reversed by TRAM-34 (Fig. 4F).

The membrane localization of K<sup>+</sup> channels in lung epithelia revealed multiple types of K<sup>+</sup> channels at both apical and basolateral membranes. Until recently, basolateral K<sup>+</sup> channels of airways and alveolar epithelia, which control the membrane potential of these cells, were studied more extensively than apical K<sup>+</sup> channels. However, recent evidence has revealed the presence of apical K<sup>+</sup> channels in airway epithelial cells. Indeed, KvLQT1 currents have been reported at the apical membrane of Calu-3 cells (33). The same group also identified two-pore K<sup>+</sup> channels at the same membrane (8). In the human bronchial cell line 16HBE14o-, Bernard et al. (2)

identified KCa3.1 currents at both apical and basolateral membranes. In addition, multiple Kv channels have been localized at the apical membrane of alveolar cells and could be involved in K<sup>+</sup> secretion (34). Our short-circuit experiments have shown evidence of KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 currents through the basolateral membrane of bronchial NuLi and CuFi cells. The presence of apical channels was not investigated in this study. Nevertheless, in our wound-healing experiments and migration/proliferation assays performed on nonpolarized bronchial cells, K<sup>+</sup> channel modulators could act on K<sup>+</sup> channels expressed at apical and/or basolateral membranes in polarized epithelia.

**Coupling between EGF signaling and K<sup>+</sup> channel function.** Coupling mechanism between K<sup>+</sup> channel activity and growth factor signaling has been reported in multiple cell types. Indeed, the open probability of 4-aminopyridine-sensitive Kv channels from myeloblastic cells was increased with EGF through protein kinase A-dependent phosphorylation (54). Similarly, 4-aminopyridine-sensitive K<sup>+</sup> channels from corneal epithelial cells were activated by EGF (42). This growth factor also stimulated calcium-activated K<sup>+</sup> channels from VSMC (19, 23) and mucous airway cells (20). Consistently, we observed a stimulation of K<sup>+</sup> currents by EGF in bronchial monolayers (Fig. 5, D and E). Indeed, we found that acute application (10 min) of EGF significantly increased KvLQT1 current through the basolateral membrane of NuLi cells. It has to be noted that this treatment did not significantly enhance CuFi KvLQT1 current, indicating defective EGF responsiveness of KvLQT1 channels in these CF cells. Furthermore, basolateral K<sub>ATP</sub> current was significantly stimulated by EGF in both NuLi and CuFi cells. On the other hand, KCa3.1 current, preactivated with 1-EBIO, was not further elevated by the addition of EGF.

In alveolar type II cells, we (49) previously found activation of KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> currents after acute (10 min) and chronic (24 h) treatment with EGF. Our immunoblotting experiments also revealed an increase in alveolar KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> protein expression after 24-h treatment with EGF (49). In NuLi and CuFi, only acute EGF was effective, whereas 24-h EGF treatment failed to stimulate K<sup>+</sup> currents and protein expression. This short-term effect of EGF is probably due to modulation of K<sup>+</sup> channel activity. However, rapid membrane insertion of new K<sup>+</sup> channels cannot be excluded.

**Comparison of K<sup>+</sup> channel expression and K<sup>+</sup> currents in NuLi and CuFi cells.** Because K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channel activity was coupled to EGF and lower EGF/EGFR signaling was observed in CuFi cells, we hypothesized that ion transport by K<sup>+</sup> channels could be reduced in CuFi monolayers. Our results showed that total basolateral currents as well as KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 currents were lower in CuFi than in NuLi (Fig. 5). Consistently, KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 channel expression was severely reduced (by 40–70%) in CuFi compared with NuLi cells (Fig. 6). This is the first demonstration of a decrease in K<sup>+</sup> channel expression and activity, coupled with diminished EGF signaling in CF cells. It is not certain, however, whether this decline in CuFi cells could be directly attributed to the CF genotype/phenotype or could be due to another genotype difference between the two patients from whom NuLi and CuFi cells were derived. It would be interesting, in future experiments, to further evaluate K<sup>+</sup> chan-

nel expression/activity as well as EGFR activation in other non-CF and CF models.

**Role of K<sup>+</sup> channels in the control of bronchial repair processes.** As detailed earlier, K<sup>+</sup> channel activity seemed to be coupled to EGF signaling. Moreover, it has been shown in several cell types that stimulation of proliferation and/or migration processes by growth factors depends on this K<sup>+</sup> channel activation (21, 23, 42). Until recently, the main recognized K<sup>+</sup> channel function in epithelia was to participate in transepithelial ion transport. However, a detailed review of the literature revealed that K<sup>+</sup> channel activity also controls the mitogenic and motogenic properties of several cells (4, 21, 29, 35, 40, 45). We recently hypothesized that lung epithelia repair could be regulated by K<sup>+</sup> channels. In a previous study, we (49) demonstrated that EGF-stimulated alveolar repair processes were controlled, to a large extent, by K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 channels. We then evaluated the role of K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and KCa3.1 channels in wound healing, migration, and proliferation of normal and CF bronchial epithelia. We observed that K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and KCa3.1 channel inhibitors (glibenclamide, clofilium, and TRAM-34) elicited a similar inhibitory effect (26–33%) on NuLi and CuFi wound healing measured in the presence of EGF (Fig. 7). These pharmacological agents had no influence in the absence of EGF (BEGM-EGF<sup>free</sup>), indicating that K<sup>+</sup> channels controlled EGF-dependent wound repair. Glibenclamide, clofilium, and TRAM-34 in combination evoked a larger (68%) decrease in repair, suggesting that their actions were additive. Combined application of these three K<sup>+</sup> channel inhibitors also reduced bronchial cell migration and proliferation in the presence of EGF (Fig. 8). Indeed, the number of migrating cells was four (NuLi)- to sevenfold (CuFi) lower after K<sup>+</sup> channel inhibition. Similarly, cell proliferation was also affected by the K<sup>+</sup> channel inhibitors. A concomitant decrease in cell migration and proliferation could be responsive to the wound repair inhibition observed in the presence of K<sup>+</sup> channel blockers.

In polarized bronchial epithelia cultured on filters (as in the Ussing chamber experiments), K<sub>ATP</sub> and CFTR channels are expressed at the basolateral and apical sides, respectively. In these conditions, basolateral or apical application of glibenclamide specifically blocks K<sub>ATP</sub> or CFTR channels. However, in wound-healing experiments (performed on plastic supports), the inhibitory effect of glibenclamide could be attributed to K<sub>ATP</sub> and/or CFTR channels. We then tested the impact on NuLi wound healing of the specific inhibitor of CFTR, CFTR<sub>inh-172</sub>. The absence of significant repair inhibition with this agent confirmed that the action of glibenclamide was due to the K<sub>ATP</sub> channel.

It should be noted that TRAM-34, an inhibitor of KCa3.1 channels, induced a decrease in wound repair similar to that elicited by glibenclamide or clofilium. This result could be surprising since basolateral K<sup>+</sup> permeability was mainly driven by KvLQT1 and K<sub>ATP</sub> rather than KCa3.1 channels. In fact, it has been shown that [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation could activate K<sup>+</sup> efflux through KCa3.1 channels during cell migration and proliferation processes (44–46, 55). The regulatory pathways that link K<sup>+</sup> channels to migration and proliferation processes are not clearly identified. However, it has been postulated that changes in K<sup>+</sup> currents could also control these processes by altering membrane potential, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, cell volume, and/or growth factor-mediated mitogenic and motogenic signaling.

A common stimulatory pathway of EGF and K<sup>+</sup> channels could explain the absence of wound-healing stimulation by the K<sub>ATP</sub> activator pinacidil. Indeed, as demonstrated by the inhibitory effect of EGF Ab (in BEGM-EGF<sup>free</sup>), the presence of EGF, released by injured/repairing cells, already stimulated wound repair (and probably K<sup>+</sup> channels) in basal conditions. In that case, further addition of pinacidil could be ineffective. Accordingly, during the cell migration experiments on intact cells, conditions where the EGFR pathway was not basically activated, pinacidil enhanced cell migration to a level similar to that noted in the presence of exogenous EGF or conditioned medium from wounded monolayers (Fig. 8). Similarly to combined treatments with K<sup>+</sup> channel inhibitors, it might be more effective to employ activators of K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and KCa3.1 channels in combination. Unfortunately, the presence of 1-EBIO was toxic over a long period (cell detachment occurred). In addition, no KvLQT1 activator is commercially available.

*Impact of CFTR inhibition on wound healing, EGF signaling, and K<sup>+</sup> channels.* Of course, the absence of functional CFTR channels in CuFi cells could be directly responsible for the observed delay in repair. It has been shown, for example, that CFTR blockers inhibit the proliferation of MDCK cells (27). In addition, in utero *cftr* gene transfer in CFTR-deficient (knockout) mice accelerated lung secretory cell proliferation and differentiation. On the other hand, the rate of intestinal cell migration and proliferation was enhanced in CFTR null mice (12). Thus the possible role of CFTR channels in proliferation, migration, and repair processes is not clearly defined in airway cells. Our wound-healing experiments did not demonstrate a significant impact of acute CFTR current inhibition by CFTR<sub>inh</sub>-172 (Fig. 9). Indeed, we observed a similar slight decrease in NuLi and CuFi wound repair that could be attributed to a toxic effect of CFTR<sub>inh</sub>-172 (several cells were detached after 6-h treatment with 10 μM CFTR<sub>inh</sub>-172). A less toxic concentration (5 μM) was also ineffective when applied during repair or repeated two times (24-h pretreatment before wounding, followed by additional treatment during repair). No inhibition of NuLi and CuFi cell migration was apparent. We also evaluated the possibility that the absence of CFTR current could affect EGF secretion by injured bronchial cells. However, conditioned medium collected from injured NuLi monolayers (NuLi-WCM) treated or not during repair with CFTR<sub>inh</sub>-172 similarly stimulated NuLi cell migration. Finally, our results revealed that KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and KCa3.1 channel expression was not affected by CFTR channel inhibition. In summary, wound healing, cell migration, EGF secretion and K<sup>+</sup> channel expression are not sensitive to a short-term (max 24 h) inhibition of CFTR current. It might be interesting to evaluate the impact of chronic CFTR inhibition on epithelial repair. Perez et al. (36) recently developed a CF model through continuous inhibition (for 3–5 days) of CFTR with CFTR<sub>inh</sub>-172 (10–20 μM). Unfortunately, these conditions could not be reproduced with NuLi and CuFi monolayers, which were severely damaged by the high doses of CFTR<sub>inh</sub>-172.

In addition to its Cl<sup>-</sup> channel function, CFTR protein could interact with several other proteins, including ion channels, via PDZ domains (24). As part of the multiprotein complex, the CFTR could also interfere with several signaling pathways. However, to our knowledge, there is no clear evidence of an EGF responsiveness defect in the absence of functional CFTR.

In fact, it remains uncertain whether all specific CF phenotypes are related to Cl<sup>-</sup> transport dysfunction or to the absence of CFTR protein. It might thus be interesting to evaluate the repair of CF epithelia from various genotypes. In addition, it could be useful to establish whether CFTR correction (by transfection of wild-type CFTR by adenovirus vector in CuFi cells; Ref. 57) could lead to normal wound-healing, EGF/EGFR signaling, and/or K<sup>+</sup> channel activity/expression in CuFi.

In conclusion, our results demonstrated, for the first time, that EGFR and K<sup>+</sup> channel activation could play a crucial role in normal and CF bronchial epithelia repair. Furthermore, the delay in CuFi monolayer repair was coupled with decreased cell migration, lower EGF secretion, and/or EGFR activation as well as reduced K<sup>+</sup> current and channel expression.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Joseph Zabner for providing the NuLi and CuFi cell lines. We acknowledge the editorial assistance of Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

#### GRANTS

This work was supported by the Cystic Fibrosis Foundation (E. Brochiero) and research credits from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec-Groupe d'étude des protéines membranaires (FRSQ-GÉPROM) (J. Noël and E. Brochiero) and CHUM Research Centre Foundation (E. Brochiero). J. Noël is a Senior Research Scholar of FRSQ.

#### REFERENCES

1. Aida S, Tamai S, Sekiguchi S, Shimizu N. Distribution of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human lung: immunohistochemical and immunoelectron-microscopic studies. *Respiration* 61: 161–166, 1994.
2. Bernard K, Bogliolo S, Soriani O, Ehrenfeld J. Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *J Membr Biol* 196: 15–31, 2003.
3. 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* 27: 208–229, 2006.
4. Braun GS, Veh RW, Segerer S, Horster MF, Huber SM. Developmental expression and functional significance of Kir channel subunits in ureteric bud and nephron epithelia. *Pflügers Arch* 445: 321–330, 2002.
5. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3: 223–231, 2004.
6. 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.
7. Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K<sup>+</sup> channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* 61: 880–885, 2006.
8. Davis KA, Cowley EA. Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflügers Arch* 451: 631–641, 2006.
9. Demolombe S, Franco D, de Boer P, Kupersmidt S, Roden D, Peroon Y, Jarry A, Moorman AF, Escande D. Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C359–C372, 2001.
10. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 9: 486–491, 2003.
11. Dovey M, Wiseman 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.
12. Gallagher AM, Gottlieb RA. Proliferation, not apoptosis, alters epithelial cell migration in small intestine of CFTR null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G681–G687, 2001.
13. Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury—a translational approach. *Swiss Med Wkly* 133: 586–590, 2003.

14. **Grahammer 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.
15. **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.
16. **Hardie WD, Bejarano PA, Miller MA, Yankaskas JR, Ritter JH, Whitsett JA, Korfhagen TR.** Immunolocalization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in lungs of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Dev Pathol* 2: 415–423, 1999.
17. **Hollande E, Cantet S, Ratovo G, Daste G, Bremont F, Fanjul M.** Growth of putative progenitors of type II pneumocytes in culture of human cystic fibrosis alveoli. *Biol Cell* 96: 429–441, 2004.
18. **Ingram JL, Bonner JC.** EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases. *Curr Mol Med* 6: 409–421, 2006.
19. **Ivanov A, Gerzanich V, Ivanova S, Denhaese R, Tsybalyuk O, Simard JM.** Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle. *J Physiol* 570: 73–84, 2006.
20. **Iwase N, Sasaki T, Oshiro T, Tamada T, Nara M, Sasamori K, Hattori T, Shirato K, Maruyama Y.** Differential effect of epidermal growth factor on serous and mucous cells in porcine airway submucosal gland. *Respir Physiol Neurobiol* 132: 307–319, 2002.
21. **Jin M, Defoe DM, Wondergem R.** Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates Ca<sup>2+</sup>-activated membrane K<sup>+</sup> current and migration of MDCK II cells. *J Membr Biol* 191: 77–86, 2003.
22. **Kleppisch T, Winter B, Nelson MT.** ATP-sensitive potassium channels in cultured arterial segments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271: H2462–H2468, 1996.
23. **Kohler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kampfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG, Hoyer J.** Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108: 1119–1125, 2003.
24. **Kunzelmann K.** CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci* 16: 167–170, 2001.
25. **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.
26. **Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E.** Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L1207–L1219, 2006.
27. **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* 66: 1926–1938, 2004.
28. **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.
29. **Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadcani SO, Spray DC, McDonald TV, Gupta S.** KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* 275: 26050–26057, 2000.
30. **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.
31. **Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K.** Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 283–289, 2000.
32. **McCann JD, Matsuda J, Garcia M, Kaczorowski G, Welsh MJ.** Basolateral K<sup>+</sup> channels in airway epithelia. I. Regulation by Ca<sup>2+</sup> and block by charybdotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 258: L334–L342, 1990.
33. **Moser SL, Harron SA, Crack J, Fawcett JP, Cowley EA.** Multiple KCNQ potassium channel subtypes mediate basal anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3. *J Membr Biol* 221: 153–163, 2008.
34. **O'Grady SM, Lee SY.** Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689–L700, 2003.
35. **Pardo LA.** Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 19: 285–292, 2004.
36. **Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB.** CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L383–L395, 2007.
37. **Plantier L, Marchand-Adam S, Marchal-Somme J, Leseche G, Fournier M, Dehoux M, Aubier M, Crestani B.** Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L641–L647, 2005.
38. **Polosa R, Prosperini G, Leir SH, Holgate ST, Lackie PM, Davies DE.** Expression of c-erbB receptors and ligands in human bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 914–923, 1999.
39. **Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE.** Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 14: 1362–1374, 2000.
40. **Rao JN, Platoshyn O, Li L, Guo X, Golovina VA, Yuan JX, Wang JY.** Activation of K<sup>+</sup> channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C885–C898, 2002.
41. **Rejman J, Di Gioia S, Bragonzi A, Conese M.** *Pseudomonas aeruginosa* infection destroys the barrier function of lung epithelium and enhances polyplex-mediated transfection. *Hum Gene Ther* 18: 642–652, 2007.
42. **Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L.** Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K<sup>+</sup> channel activity. *J Membr Biol* 196: 41–50, 2003.
43. **Rowntree RK, Harris A.** The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 67: 471–485, 2003.
44. **Schwab A.** Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F739–F747, 2001.
45. **Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J, Dartsch PC.** Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflügers Arch* 438: 330–337, 1999.
46. **Schwab A, Wulf A, Schulz C, Kessler W, Nechyporuk-Zloy V, Romer M, Reinhardt J, Weinhold D, Dieterich P, Stock C, Hebert SC.** Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J Cell Physiol* 206: 86–94, 2006.
47. **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.
48. **Singh AK, Devor DC, Gerlach AC, Gondor M, Pilewski JM, Bridges RJ.** Stimulation of Cl<sup>-</sup> secretion by chlorzoxazone. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 778–787, 2000.
49. **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* 293: L870–L882, 2007.
50. **Venaille TJ, Ryan G, Robinson BW.** Epithelial cell damage is induced by neutrophil-derived, not pseudomonas-derived, proteases in cystic fibrosis sputum. *Respir Med* 92: 233–240, 1998.
51. **Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO, Rokhlina T, Kern JA, Zabner J, Welsh MJ.** Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422: 322–326, 2003.
52. **Voynow JA, Fischer BM, Roberts BC, Proia AD.** Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1013–1018, 2005.
53. **Wadsworth SJ, Nijmeh HS, Hall IP.** Glucocorticoids increase repair potential in a novel in vitro human airway epithelial wounding model. *J Clin Immunol* 26: 376–387, 2006.
54. **Wang L, Xu B, White RE, Lu L.** Growth factor-mediated K<sup>+</sup> channel activity associated with human myeloblastic ML-1 cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C1657–C1665, 1997.
55. **Wang Z.** Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Arch* 448: 274–286, 2004.
56. **Wondergem R, Cregan M, Strickler L, Miller R, Suttles J.** Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties. *J Membr Biol* 161: 257–262, 1998.
57. **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.



## Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells

Olivier Bardou,<sup>1,2</sup> Nguyen Thu Ngan Trinh,<sup>1,2</sup> and Emmanuelle Brochiero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôtel-Dieu and <sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

**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. First published December 5, 2008; doi:10.1152/ajplung.90525.2008.— Multiple K<sup>+</sup> channels are expressed in the respiratory epithelium lining airways and alveoli. Of the three main classes [1) voltage-dependent or Ca<sup>2+</sup>-activated, 6-transmembrane domains (TMD), 2) 2-pores 4-TMD, and 3) inward-rectified 2-TMD K<sup>+</sup> channels], almost 40 different transcripts have already been detected in the lung. The physiological and functional significance of this high molecular diversity of lung epithelial K<sup>+</sup> channels is intriguing. As detailed in the present review, K<sup>+</sup> channels are located at both the apical and basolateral membranes in the respiratory epithelium, where they mediate K<sup>+</sup> currents of diverse electrophysiological and regulatory properties. The main recognized function of K<sup>+</sup> channels is to control membrane potential and to maintain the driving force for transepithelial ion and liquid transport. In this manner, KvLQT1, KCa and K<sub>ATP</sub> channels, for example, contribute to the control of airway and alveolar surface liquid composition and volume. Thus, K<sup>+</sup> channel activation has been identified as a potential therapeutic strategy for the resolution of pathologies characterized by ion transport dysfunction. K<sup>+</sup> channels are also involved in other key functions in lung physiology, such as oxygen-sensing, inflammatory responses and respiratory epithelia repair after injury. The purpose of this review is to summarize and discuss what is presently known about the molecular identity of lung K<sup>+</sup> channels with emphasis on their role in lung epithelial physiology.

Kv channels; KCa channels; Kir channels; K<sub>2</sub>P channels; lung; ion transport; epithelial repair; oxygen sensing; inflammation

EPITHELIAL CELLS LINING THE alveoli and airways from the nasal cavities to the bronchioles are involved in many functions essential to pulmonary physiology. Air conduction and gas exchange are the main activities of the respiratory system. However, the respiratory epithelium, frequently exposed to external insults, has also developed various defenses to protect itself against infections and inhaled particles. These defense mechanisms depend, among others, on mucociliary clearance via airway ciliated cells (10), on the capacity to regenerate an intact respiratory epithelium after injury (22, 69), and its ability to participate in inflammatory responses by secreting pro- and anti-inflammatory cytokines (83). Alveolar type II (ATII) cells synthesize and secrete surfactants, which are crucial in lowering surface tension in alveoli (1). Finally, one of the main functions of epithelial cells is to control the ionic composition and volume of fluids at the surface of the airways and alveoli. In fact, transepithelial transport of ions and liquid is probably the most extensively studied function of epithelial cells. In normal airways (Fig. 1A), the balance between Na<sup>+</sup> absorption and Cl<sup>-</sup> secretion is necessary to maintain an adequate periciliary liquid volume for proper ciliary function (7). This balance is disturbed in cystic fibrosis patients (CF; Fig. 1A), resulting in reduced periciliary volume and mucus accumula-

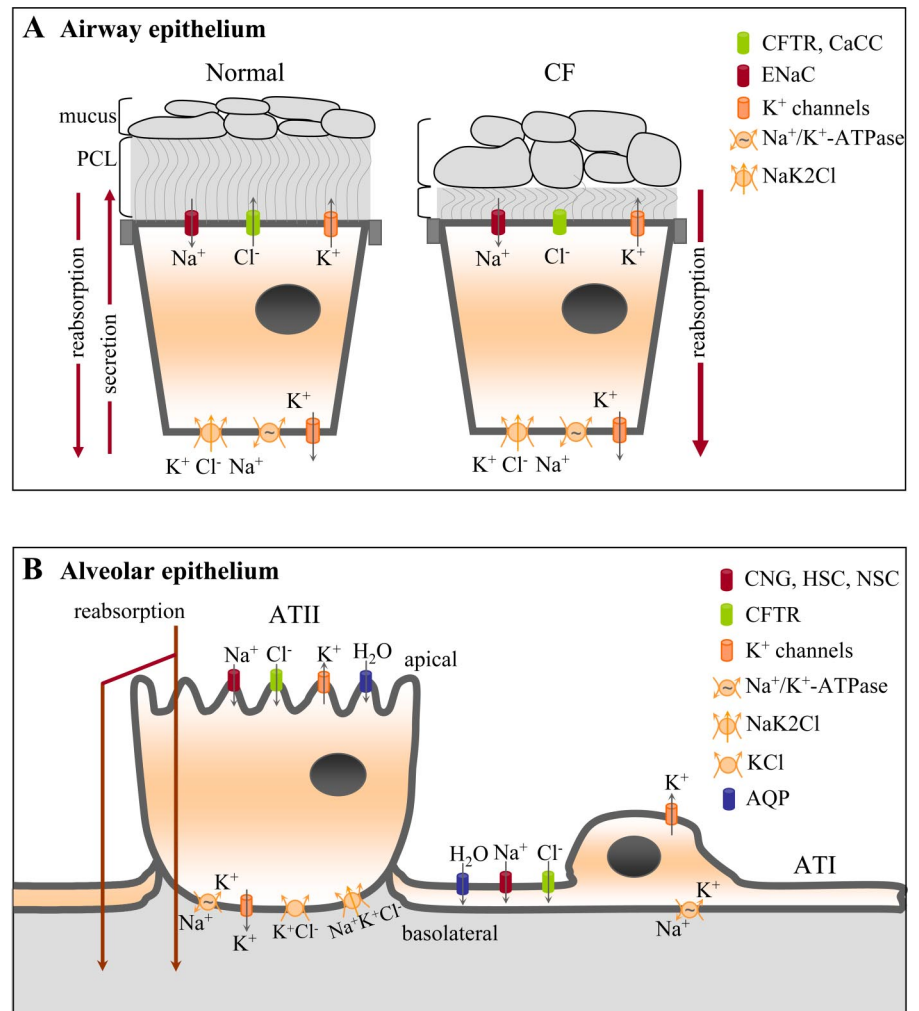
tion. In alveoli (Fig. 1B), Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption is essential for alveolar fluid clearance at birth as well as for the resolution of lung edema in adults (4).

Because of the crucial role of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport in lung physiology and pathophysiology, Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> channels, particularly cystic fibrosis transmembrane receptor (CFTR) and epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC), have been most investigated extensively. In contrast, fewer studies have focused on the role of K<sup>+</sup> channels in pulmonary epithelial physiology. To date, almost 40 different types of K<sup>+</sup> channels have been detected in the airways and alveolar epithelial cells, but the function of many of them is still unknown. These channels belong to the three main K<sup>+</sup> channel classes and are characterized by various electrophysiological and regulatory properties. Some of them have been shown to participate in crucial processes of respiratory physiology. One of the main K<sup>+</sup> channel functions in epithelia is to control membrane potential and, thus, to maintain an electrochemical gradient for ion and fluid transport. Such a role of K<sup>+</sup> channels, recognized for many years in the renal epithelium, is arousing increasing interest in the physiology of the pulmonary epithelium. K<sup>+</sup> channels could also participate in other crucial lung epithelial cell functions, including adaptability to oxygen levels or mucosal defense.

The primary purpose of this review is to summarize current knowledge of the molecular identity and electrophysiological as well as regulatory properties of K<sup>+</sup> channels expressed along airway and alveolar epithelia. Its secondary aim is to focus

Address for reprint requests and other correspondence: E. Brochiero, Centre de recherche du CHUM, Hôtel-Dieu, 3840, Saint-Urbain, Montréal, Québec H2W 1T8, Canada (e-mail: emmanuelle.brochiero@umontreal.ca).

Fig. 1. Schematic model of ion transport across alveolar and airway epithelia. **A:** equilibrium between Na<sup>+</sup> absorption and Cl<sup>-</sup> secretion across the airway epithelia is necessary to maintain adequate periciliary liquid volume and mucociliary clearance. Cl<sup>-</sup> secretion involves Cl<sup>-</sup> entry through a basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> or K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters, followed by its exit via apical Cl<sup>-</sup> channels, such as the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Cystic fibrosis (CF) mutations resulting in dysfunctional CFTR channel cause reduced Cl<sup>-</sup> and fluid secretion. PCL, periciliary liquid. **B:** Na<sup>+</sup> absorption across the alveolar epithelium (alveolar type I and II cells; ATI and AII, respectively) involves passive Na<sup>+</sup> entry via apical Na<sup>+</sup> channels [mainly epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC)] with subsequent extrusion through basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. K<sup>+</sup> are then recycled by basolateral K<sup>+</sup> channels. Most of the transport mechanisms in airway (A) and alveolar (B) epithelia are presented: sodium channels: CNG, cyclic nucleotide gated; HSC, highly selective channel (ENaC); NSC, nonselective channel; Cl<sup>-</sup> channels: CFTR and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel (CaCC), K<sup>+</sup> channels, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase pump, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters, aquaporin (AQP).



on the proposed functions of K<sup>+</sup> channels in lung physiology and their potential role in the resolution of certain lung pathologies.

#### Molecular Identity of K<sup>+</sup> Channels Expressed in Airway and Alveolar Epithelial Cells

Since the cloning of the first K<sup>+</sup> channel, Shaker from *Drosophila* (58) in 1987, more than 100 other K<sup>+</sup> channels have been identified at the molecular level. These channels have been classified in three main groups, according to their predictive number of transmembrane domains (TMD). The first class with six TMD is divided in two subgroups: the voltage-dependent K<sup>+</sup> channels (Kv) and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (KCa). K<sup>+</sup> channels from the second class are characterized by four TMD and two pores (K<sub>2</sub>P). The third class is composed of two TMD, inward-rectified K<sup>+</sup> channels (Kir).

Despite this structural heterogeneity, all K<sup>+</sup> channels possess a highly conserved signature within the pore region, the GYG (Gly-Tyr-Gly) sequence. In some types of K<sup>+</sup> channels, including human ether-a-go-go-related gene (hERG) or ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>), the GYG sequence is, however, replaced by GFG (Gly-Phe-Gly). This GY/FG sequence forms the selectivity filter of K<sup>+</sup> channels. Another common property of K<sup>+</sup> channels is their high selectivity for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> (>100 to 1), an essential feature for their function (19, 54).

More than 30 different K<sup>+</sup> channels from these three main classes have been detected in the respiratory epithelium (Tables 1 and 2). A phylogenetic tree of K<sup>+</sup> channels is presented in Fig. 2.

**Six-TMD, Kv channels.** The human KvLQT1 gene (KCNQ1, Kv7.1), responsible for human cardiac arrhythmia, was identified by positional cloning in 1996 (89). KvLQT1 expression was subsequently reported in nasal (50), tracheal (16, 23, 95), bronchial (Calu-3, 16HBE14o-, NuLi, CuFi, ciliated cells from terminal bronchioles) (2, 12, 16, 50, 82), and AII (44) epithelial cells (Table 1). It was then established that KvLQT1 coassemble with MinK to form the channel responsible for slow delayed rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>Ks</sub>) cardiac currents (95). In the lungs, KvLQT1 could be associated with MinK-related protein (MiRP), possibly with MiRP1 (KCNE2, Calu-3), MiRP2 (KCNE3, trachea, Calu-3), or MiRP3 (KCNE4, lung), which are expressed in the airways and lungs (12, 23, 79) (Table 1). This very-small-conductance K<sup>+</sup> channel (<3 pS) is activated by cAMP and inhibited by chromanol 293B (91). Among all Kv channels from the respiratory epithelium, KvLQT1 is probably the most studied, and evidence of their functional expression and physiological role has been documented. A great deal of evidence originated from Ussing chamber experiments showing chromanol 293B- or clofilium-sensitive short-

Table 1. Identification of six-TMD K<sup>+</sup> channels in airways and alveolar epithelium

Name	Gene	Locus	Cell Type	Evidence	Ref. No.
<i>Six-TMD, voltage-dependent K<sup>+</sup> channels</i>					
Kv1.1	KCNA1	12p13.32	ATII (ap)	R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup>	55
Kv1.3	KCNA3	1p13.3	ATII (ap)	R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup>	55
Kv1.4	KCNA4	11p14	ATII (ap)	R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup>	55
Kv1.5	KCNA5	12p13	Lung	R	11
Kv1.7	KCNA7	19q13.3	Lung	R	11
Kv2.2	KCNB2	8q	ATII	R <sup>a</sup>	55
Kv4.1	KCND1	Xp11.23	ATII	R <sup>a</sup>	55
Kv4.2	KCND2	7q31	ATII (ap)	R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup>	55
Kv4.3	KCND3	1p13.3	ATII (ap)	R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup>	55
Kv6.1	KCNG1	20q13	Lung	R	11
KvLQT1 (Kv7.1)	KCNQ1	11p15.5	Nasal (wt/CF)	R <sup>a</sup> , F <sup>h</sup>	49, 50
			Trachea	R <sup>a,b,c</sup> , P <sup>f</sup> , F <sup>h</sup>	16, 23, 95
			Calu3 (ap, bas)	R <sup>a</sup> , P <sup>f</sup> , F <sup>h</sup>	12, 53
			16HBE	R <sup>a</sup> , F <sup>h</sup>	2, 50, 53
			ciliated term bron <sup>ioles</sup>	R <sup>b</sup>	16
			NuLi, CuFi	R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup> , F <sup>h</sup>	82
			ATII	R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup> , F <sup>h</sup>	44, 81
Kv7.2	KCNQ2	20q13.3	16HBE14o-	R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup>	53
Kv7.3	KCNQ3	8q24	Calu-3 (ap, bas)	R <sup>a</sup> , P <sup>d,f</sup>	53
Kv7.4	KCNQ4	1p34	Calu-3, 16HBE14o-	R <sup>a</sup>	53
Kv7.5	KCNQ5	6q14	Calu-3 (ap, lat), 16HBE14o-	R <sup>a</sup> , P <sup>d,f</sup>	53
Kv9.3	KCNS3	2p24	ATII, A549	R <sup>a</sup>	55
<i>β-Subunits</i>					
MiRP1	KCNE2	21q22.12	Calu-3	R <sup>a</sup>	12
MiRP2	KCNE3	11q13-q14	Calu-3	R <sup>a</sup>	12
			Trachea	R <sup>a</sup>	23
MiRP3	KCNE4	2q36.3	Lung	R <sup>c</sup>	79
KChIP2	KCNIP2	10q24	ATII	R <sup>a</sup>	55
KChIP3	KCNIP3	2q21.1	ATII	R <sup>a</sup>	55
Kvβ1	KCNAB1	3q26.1	ATII	R <sup>a</sup>	55
Kvβ2	KCNAB2	1q36.3	ATII	R <sup>a</sup>	55
Kvβ3	KCNAB3	17p13.1	ATII	R <sup>a</sup>	55
<i>Six-TMD, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels</i>					
SK1	KCNN1	19q13.1	16HBE	R <sup>a</sup> , F <sup>h</sup>	2
KCa3.1	KCNN4	19q13.2	Nasal (wt/CF)	R <sup>a</sup> , F <sup>h</sup>	49, 74
			Trachea	P <sup>e</sup> , F <sup>h</sup>	23, 80
			Calu3	P <sup>e</sup> , F <sup>g,h</sup>	12, 26, 27, 76, 77
			16HBE (ap, bas)	R <sup>a</sup> , F <sup>h</sup>	2, 41
			Primary HBE	F <sup>h</sup>	17, 20, 74
			Bronchi, resp. bron <sup>ioles</sup>	P <sup>e</sup>	80
			NuLi (ap, bas), CuFi	R <sup>f</sup> , P <sup>d</sup> , F <sup>h</sup>	82
			A549	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup>	78
			ATII	R <sup>a</sup>	44
<i>Seven-TMD, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels</i>					
BK <sub>Ca</sub>	KCNMA1	10q22.3	A549	R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup> , F <sup>g,h</sup>	34, 68
			ATII	R <sup>a</sup>	44
			Nasal (wt/CF)	F <sup>g</sup>	40

Molecular identity of voltage-dependent and calcium-activated 6-transmembrane domain (TMD) K<sup>+</sup> channels expressed in respiratory epithelia. The names of the channels and genes as well as their chromosomal localization (locus) and cell types expressing the channels are indicated. The experimental approaches to mRNA (R), protein (P) and/or functional (F) evidence are also reported: PCR (a), in situ hybridization (b), Northern blotting (c), immunoblotting (d), immunohistochemistry (e), immunofluorescence (f), patch-clamp (g), Ussing (h). mb, Membrane; ap, apical membrane; bas, basolateral membrane; lat, lateral membranes; ciliated term bron<sup>ioles</sup>, ciliated cells from the terminal bronchioles; resp. bron<sup>ioles</sup>, respiratory bronchioles; wt and CF, normal and cystic fibrosis cells, respectively; ATII, alveolar type II cells; Kv, voltage-gated K<sup>+</sup> channels; BK<sub>Ca</sub>, large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>; MiRP, Mink-related protein; HBE, human bronchial epithelial.

circuit currents across the airway epithelia in normal and CF nasal cells (50), tracheal cells (23), Calu-3 cells (12, 53), normal NuLi, and CF CuFi bronchial cell lines (82) as well as in alveolar cell monolayers (81). It should be noted, however, that we observed lower KvLQT1 expression and currents in CF CuFi compared with normal NuLi bronchial epithelial cells. Our Ussing chamber experiments, per-

formed with apically permeabilized monolayers, demonstrated KvLQT1 currents through the basolateral membrane of NuLi and CuFi bronchial cells (82). Nevertheless, Moser et al. (53) detected KvLQT1 channels and chromanol 293B-sensitive currents also at the apical membrane of Calu-3 monolayers by immunocytochemistry and in electrophysiological experiments, respectively.

Table 2. Identification of 2- and 4-TMD K<sup>+</sup> channels in airways and alveolar epithelium

Name	Gene	Locus	Cell Type	Evidence	Ref. No.
<i>Two-TMD, inward-rectified K<sup>+</sup> channels</i>					
Kir2.1	KCNJ2	17q23-1q24.2	Fetal ATII RERF-LC-MA	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup> R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup>	52 70
Kir3.1 GIRK1	KCNJ3	2q24.1	WBA, H69, H146, A549, H727, H2170, H226, H520	R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup>	64
Kir3.2 GIRK2	KCNJ6	21q22.13-q22.2	WBA, H69, H209, H526, A549, H727, H520	R <sup>a</sup>	64
Kir3.3 GIRK3	KCNJ9	1q21-q23	SAEC, WBA, H69, H146, H187, H209, H526, A549, H727, H2170, H226, H520	R <sup>a</sup>	64
Kir3.4 GIRK4	KCNJ5	11q24	SAEC, WBA, H69, H146, H187, H209, H526, A549, H727, H2170, H226, H520	R <sup>a</sup>	64
Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	NuLi	R <sup>a</sup>	*
Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Lung NuLi, CuFi A549, H460	F R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup> , F <sup>h</sup> *	71 82
Kir7.1	KCNJ13	2q37	ATII Lung	R <sup>a</sup> , P <sup>d</sup> , F <sup>h</sup> R <sup>c</sup>	43, 81 18
<i>Four-TMD, 2 pore K<sup>+</sup> channels</i>					
Twik 1	KCNK1	1q42-q43	H441 Calu3	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup> R <sup>a</sup> , F <sup>h</sup>	25 14
Twik 2	KCNK6	19q13.1	H441 Calu3 (ap. mb)	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup> R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup> , F <sup>h</sup>	25 14
Trek 1	KCNK2	1q41	H441 Calu3 (ap. mb)	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup> R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup> , F <sup>h</sup>	25 14
Trek 2	KCNK10	14q31	H441	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup>	25
Task 2	KCNK5	6p21	H441 Calu3 (vesicles)	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup> R <sup>a</sup> , P <sup>d,e</sup> , F <sup>h</sup>	25 14
Task 3	KCNK9	8q24.3	H441	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup>	25
Task 4	KCNK17	6p21.2-p21.1	H441	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup>	25
Thik 1	KCNK13	14q31-q32	H441	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup>	25
KCNK7	KCNK7	11q13	H441	R <sup>a</sup> , F <sup>g</sup>	25

Molecular identity of 2-pore, 4-TMD and inward-rectified, 2-TMD channels. \*Unpublished results.

Kv channels constitute a large family, and several homologs have been reported in lung epithelial cells (Table 1). In addition to the KvLQT1-Kv7.1 channel, KNCQ3 (Kv7.3) and KCNQ5 (Kv7.5) proteins have been detected at the apical membrane of Calu-3 cells (53). Kv7.2 and Kv7.5 have been identified in human bronchial 16HBE14o- cells (53). Transcripts of other Kv channel subtypes, i.e., Kv1.1, -1.3, -1.4, -2.2, -4.1, -4.2, -4.3, and -9.3, have been found in ATII cells (42). Among them, Kv1.1, -1.3, -1.4, -4.2, and -4.3 have been detected at the protein level and localized at the apical membrane (42, 55, 56). Finally, other types (Kv1.5, -1.7, and -6.1) have been demonstrated in the lungs (11). In addition to these Kv pore-forming  $\alpha$ -subunits, some regulatory  $\beta$ -subunits have been identified in pulmonary epithelial cells. KChIP-2 and -3 as well as Kv $\beta$ -1, -2, and -3, for example, have been documented in ATII cells (55, 56).

It is difficult to determine if all of these Kv channels that were detected in the respiratory epithelia are really functional. In fact, two major types of Kv currents were reported in early description of K<sup>+</sup> currents in alveolar cells (15, 61). The most frequently observed was the low-threshold (*n*-type) channel resembling delayed-rectifier K<sup>+</sup> channels. This 12-pS K<sup>+</sup> channel, sensitive to 4-aminopyridine, is activated at -40 to -20 mV membrane potential. The second type, the *l*-type or high-threshold type, is activated at more positive potentials (-20 or -10 mV). It had to be noted that these currents represent a combination of the Kv channel activities associated to  $\alpha$ -subunits mentioned above.

**6-TMD, KCa channels.** KCa channels are composed of two subfamilies, Slo and SK channels. SK4, also known as the Gardos channel in red blood cells, IKCa or, more recently,

KCa3.1, was cloned in 1997 (33). In the lungs (Table 1), KCa3.1 has been detected by immunohistochemistry in the trachea (at the basolateral membrane), in bronchi, and bronchioles, but not in alveoli (80). Nevertheless, we found KCa3.1 mRNA and protein in primary cultures of ATII cells (44). We also demonstrated the presence of KCa3.1 in non-CF (NuLi) and CF (CuFi) bronchial cells, although in the latter one, KCa3.1 protein expression and current were reduced compared with NuLi (82). KCa3.1 was also detected in the bronchoalveolar cell line A549 (78), in non-CF and CF nasal polyps (49), 16HBE14o- (2) and Calu-3 cells (12). KCa3.1, encoding for intermediate-conductance (~16 pS), KCa channels, sensitive to clotrimazole, charybdotoxin, and TRAM34, is activated by 1-ethyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO) and its derivatives. Functional evidence of KCa3.1 channels comes from short-circuit current experiments in Ussing chamber with CF and non-CF nasal cells (49), 16HBE14o- (2), Calu-3 (12), NHBE (20), NuLi, and CuFi cells (82) and whole cell patch-clamp experiments (78). Commonly located at the basolateral membrane of pulmonary epithelia, KCa3.1 currents have also been measured at the apical membrane of bronchial 16HBE14o- (2) and NuLi cells (37). Transcripts of another SK family member, SK1, have been detected in 16HBE14o-, but there is no evidence of SK1 currents in these cells (2). Finally, large-conductance (~200 pS), KCa channels (BK<sub>Ca</sub>, maxi-KCa, or Slo1), sensitive to iberiotoxin and charybdotoxin, are also expressed in nasal (40), A549 (34, 68) and ATII cells (44).

**Four-TMD, two-pore K<sup>+</sup> channels.** Several members of the K<sub>2</sub>P family (Table 2) have been detected in the airway H441 cell line: Twik-1 and -2, Trek-1 and -2, Task-2, -3, and -4, Thik-1, and KCNK7 (25). Their cellular localization has been

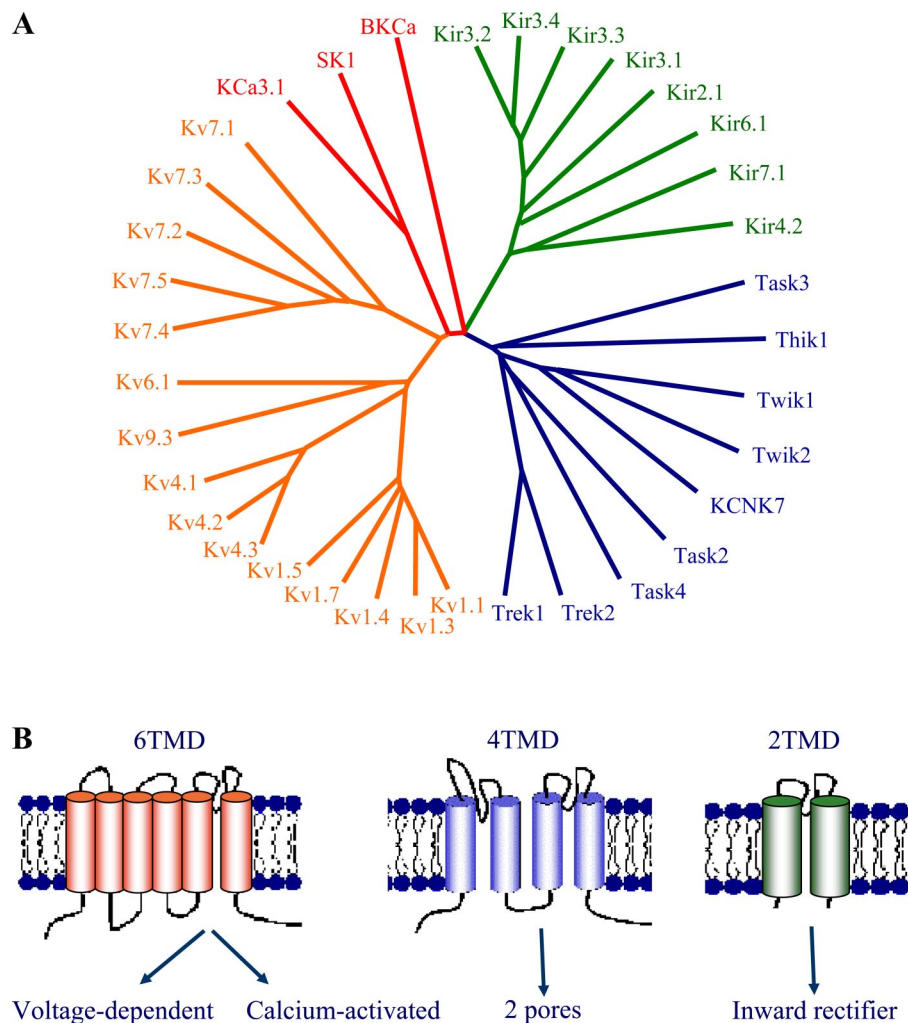


Fig. 2. K<sup>+</sup> channels of the respiratory epithelium. A phylogenetic tree (A) was generated (on <http://www.phylogeny.fr> website, "treeviewers," Draw-tree), after the alignment (with ClustalW software) of amino acid sequences of K<sup>+</sup> channels reported in epithelial cells from the airways and alveoli. The different classes of K<sup>+</sup> channels are distinguished by the following colors: green, inward-rectified, 2-transmembrane domain (TMD) channels; blue, 2-pores, 4-TMD channels; orange, voltage-dependent, 6-TMD channels; red, Ca<sup>2+</sup>-activated channels. Schematic models of TMD K<sup>+</sup> channel topologies are presented in B. It should be noted that the large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated (BK<sub>Ca</sub>) channel, commonly associated with the 6-TMD family, could be composed of 7 TMD.

investigated in Calu-3 cells: Twik-2 and Trek-1 have been detected at the plasma membrane level, mostly at the apical membrane, whereas Task-2 seems to be localized in intracellular vesicles beneath the apical membrane (14). Agents such as bupivacaine, lidocaine, and quinidine have highlighted the presence of functional K<sub>2</sub>P currents through the apical membrane of Calu-3 monolayers.

**Two-TMD, Kir.** Transcripts of many two-TMD Kir have been found in the lungs (Table 2): Kir2.1 [in fetal ATII cells (52) and in the small cell lung cancer cell line RERF-LC-MA (70)], Kir3.1, -3.2, -3.3, and -3.4 [also called GIRK1, -2, -3, and -4, expressed in cancer cell lines, including A549 cells (64)], Kir4.2 (in NuLi cells, unpublished data), Kir6.1 [in ATII (43, 81), NuLi, CuFi cells (82)], and Kir7.1 [in total lung extracts (18)]. Functional evidence of two of them, Kir6.1 and Kir2.1, has been documented. An IRK1 (Kir2.1), inward-rectified current, with 31-pS unitary conductance, has been observed in fetal alveolar cells (52). In adult alveolar cells, we identified a K<sub>ATP</sub> channel, formed from the inwardly rectifying, pore-forming subunit Kir6.1 and sulfonylurea receptor SUR2B subunits (43). This channel, sensitive to ATP, is activated by pinacidil and inhibited by glibenclamide. Proof of functional K<sub>ATP</sub> channels at the basolateral membrane of bronchial (NuLi, CuFi) (82) and alveolar cells (43) has been

generated in Ussing chamber short-circuit current experiments. However, we noted that K<sub>ATP</sub> currents and Kir6.1 protein expression are reduced in CuFi compared with NuLi cells (82).

Thus >30 different pore-forming  $\alpha$ -subunits, plus several regulatory  $\beta$ -subunits, have been detected in the respiratory epithelium. This huge molecular diversity is intriguing. Unfortunately, the large number of K<sup>+</sup> channels, expressed in the same cell, and often at the same membrane of polarized epithelium, complicates the task of precisely establishing the cellular function of each K<sup>+</sup> channel type. In following sections, we will analyze what is currently known about their function in lung physiology and pathophysiology.

#### K<sup>+</sup> Channel Function in Lung Epithelial Physiology

**Gas exchange and alveolar stability.** Lung ability to rapidly adapt to environmental changes in PO<sub>2</sub> is crucial for survival. Neuroepithelial bodies (NEB) localized in the airway epithelium, arterial carotid bodies, and pulmonary smooth muscle cells are the three main PO<sub>2</sub>-sensing systems (35, 36). These cells express several ion channels, particularly K<sup>+</sup> channels that are sensitive to O<sub>2</sub> levels. Indeed, the two-pore channel Task-3 and the voltage-dependent channel Kv3.3, expressed in native NEB and the immortalized model of NEB (the H146 cell

line), have been shown to be inhibited after acute hypoxia (35, 36, 87). Other types of Kv channels, e.g., Kv $\alpha$ 1.5 and Kv $\alpha$ 2.1, could be responsible for O<sub>2</sub>-sensitive currents in vascular smooth muscle cells (VSMC) (for review, see Ref. 46). Kv1.1, Kv4.3, and Kv9.3 channels, which are expressed in alveolar cells (55), are also regulated by O<sub>2</sub> (63). Moreover, it has been shown that Kv1.1, Kv4.3, and Kv9.3 mRNA expression is decreased after chronic hypoxia in VSMC (63). Inhibition of K<sup>+</sup> channels seems to be a key element of O<sub>2</sub> detection and a crucial determinant of the cellular response to hypoxia. Indeed, membrane depolarization, due to hypoxic K<sup>+</sup> channel inhibition, is thought to induce Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels with subsequent transmitter release by NEB cells (Fig. 3) (for review, see Refs. 35 and 46).

A third K<sup>+</sup> channel class, i.e., Ca<sup>2+</sup>-activated channels, could also act as an O<sub>2</sub> sensor. Indeed, the open time of the BK<sub>Ca</sub> channel is severely reduced after PO<sub>2</sub> decreases in alveolar A549 cells (34), whereas chronic hypoxia has no effect on channel expression. Another study reported two types of K<sup>+</sup> currents activated by reoxygenation after hypoxia in this cell line; the first is a delayed-rectifier type, and the second, a slow-inactivated type (39).

The nature of the O<sub>2</sub> sensor and the mechanisms whereby changes in O<sub>2</sub> regulate K<sup>+</sup> channel activity remain uncertain. Because BK<sub>Ca</sub> channels expressed in HEK293 are still inhibited by hypoxia after patch-excision, it could be postulated that a soluble intracellular component was not required (45). Although intrinsic O<sub>2</sub> sensitivity of the pore-forming subunit cannot be excluded, the mechanism of K<sup>+</sup> channel inhibition is most probably dependent on O<sub>2</sub>-sensitive accessory proteins. It has been consistently shown that the Kv $\beta$ 1.2 subunit confers oxygen sensitivity to the Kv4.2 channel expressed in HEK293 cells (62). Several studies have also proposed the existence of a redox model of O<sub>2</sub> sensing that involves reactive oxygen species produced by NADPH oxidase or mitochondria (Fig. 3) (for review, see Refs. 35 and 46).

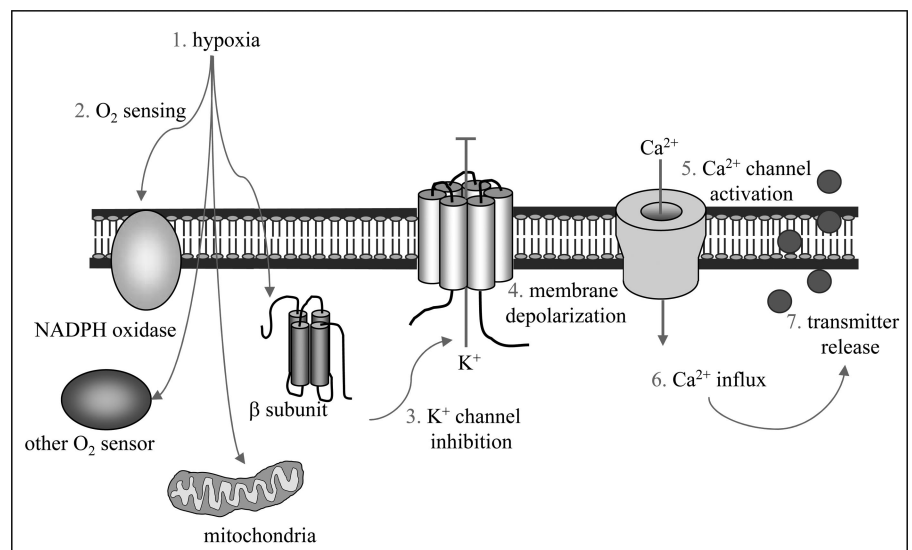
Thus the K<sup>+</sup> channels of O<sub>2</sub>-sensing systems, e.g., NEB and pulmonary smooth muscle cells, are key elements of the adaptive function of the lungs in response to environmental changes in O<sub>2</sub> levels. It has been also proposed that rapid

detection of O<sub>2</sub> variation by alveolar K<sup>+</sup> channels and subsequent modulation in K<sup>+</sup> channel activity could result in changes in ion transport and fluid clearance through alveolar epithelia (34, 55, 56). Finally, it has been postulated that alteration of O<sub>2</sub> sensing by K<sup>+</sup> channels could participate in pathological conditions, including pulmonary hypertension (46, 63).

Lung surfactant, synthesized and secreted by ATII cells, reduces surface tension in alveoli, which prevents alveolar collapse during expiration, and plays a protective role against infection. Several signaling pathways are involved in the control of surfactant secretion via exocytosis of lamellar bodies by ATII cells (for review, see Ref. 1). Many studies have highlighted the crucial role of Ca<sup>2+</sup> signals in that process (1, 24). Furthermore, it has been shown that Ca<sup>2+</sup> uptake in lamellar bodies is dependent on the following two mechanisms: pH gradient and K<sup>+</sup> transport. Indeed, Ca<sup>2+</sup> uptake in lamellar bodies is greater in the presence of K<sup>+</sup>, and this K<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> uptake is prevented by the K<sup>+</sup> channel inhibitors TEA and 4-aminopyridine (86). K<sup>+</sup> transport could thus participate in the control of surfactant secretion, through Ca<sup>2+</sup> signal modulation. Considering the lack of extensive studies on the topic, this hypothesis needs to be verified.

*Epithelial repair after injury.* The respiratory epithelium is continuously exposed to dust and pathogenic agents. The first line of defense against these aggressions is provided by the mucociliary clearance of particles and pathogens trapped in mucus, combined with the action of antimicrobial/immune molecules. In spite of these efficient defenses, bacterial infections and inflammatory responses can develop, leading to epithelial injury (Fig. 4A). Indeed, chronic inflammatory diseases, such as CF or asthma, for example, are characterized by tissue damage and remodeling. After injury, epithelial repair is crucial to restore respiratory functions and barrier integrity against bacterial infections. Several processes are sequentially engaged in pulmonary epithelial regeneration (Fig. 4A): 1) dedifferentiation, spreading, and migration of healthy cells, 2) cell proliferation, and 3) redifferentiation (3, 22, 69). As seen in Fig. 4B, similar processes are observed in our mechanical wound-healing model of alveolar cell monolay-

Fig. 3. Schematic model of O<sub>2</sub> sensing and cellular responses to hypoxia in lung neuroepithelial body (NEB) cells. Postulated cellular responses to hypoxia (1) in NEB of the lungs are presented. Various O<sub>2</sub> sensors (2) have been proposed, including NADPH-dependent and -independent mechanisms, coupled with K<sup>+</sup> channel activity (3). Hypoxic inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> (Kv), Task, or Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (KCa) channels (3) then leads to, sequentially, membrane depolarization (4), activation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (5), Ca<sup>2+</sup> influx (6), and neurotransmitter release (7).



ers (81). Several external mediators and intracellular signals control repair processes of the respiratory epithelium. Growth factors, such as epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor, transforming growth factor- $\beta$ , and keratinocyte growth factor, through their respective receptors, induce mitogenic, motogenic, and morphogenic responses that are crucial for epithelial repair. Because K<sup>+</sup> channel activity has been shown to modulate proliferation and migration of various cell types (9, 13, 29, 38, 48, 59, 60, 67, 88, 94), we recently hypothesized that K<sup>+</sup> channels could also be involved in respiratory epithelia repair. We then demonstrated that alveolar and bronchial repair processes are highly dependent on K<sup>+</sup> channel activity (81, 82) (Fig. 4C). More precisely, K<sub>ATP</sub> or KvLQT1 inhibition reduces alveolar EGF-stimulated wound healing, cell migration, and proliferation. Conversely, alveolar wound healing is stimulated by pinacidil, a K<sub>ATP</sub> channel activator, which also increases cell migration (81). In NuLi bronchial epithelia, K<sub>ATP</sub>, KvLQT1, and KCa3.1 inhibitors elicit a significant and additive inhibitory effect on wound

healing, cell migration, and proliferation, under EGF-stimulated conditions. Furthermore, our results suggest that the delay in wound healing observed in CF bronchial cell monolayers (CuFi) could be the result of defective EGF receptor signaling coupled with reduced K<sup>+</sup> channel function and expression (82).

The mechanisms that link K<sup>+</sup> channel activity to cell migration and proliferation processes are not clearly defined. However, the role of KCa3.1 channels in kidney cell migration has been studied extensively, and it has been established that a rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> and massive K<sup>+</sup> efflux through KCa3.1 channels, causing cell shrinkage, induces retraction of the rear part of migrating cells (72, 73). In addition, changes in K<sup>+</sup> channel activity have been postulated to control cell proliferation by altering membrane potential, intracellular Ca<sup>2+</sup>, and cell volume as well as growth factor-mediated mitogenic signals (90). Indeed, coupling between growth factor signaling and K<sup>+</sup> channel function has been reported in multiple cell types. The open probability of 4-aminopyridine-sensitive Kv channels, for example, is increased by EGF through protein

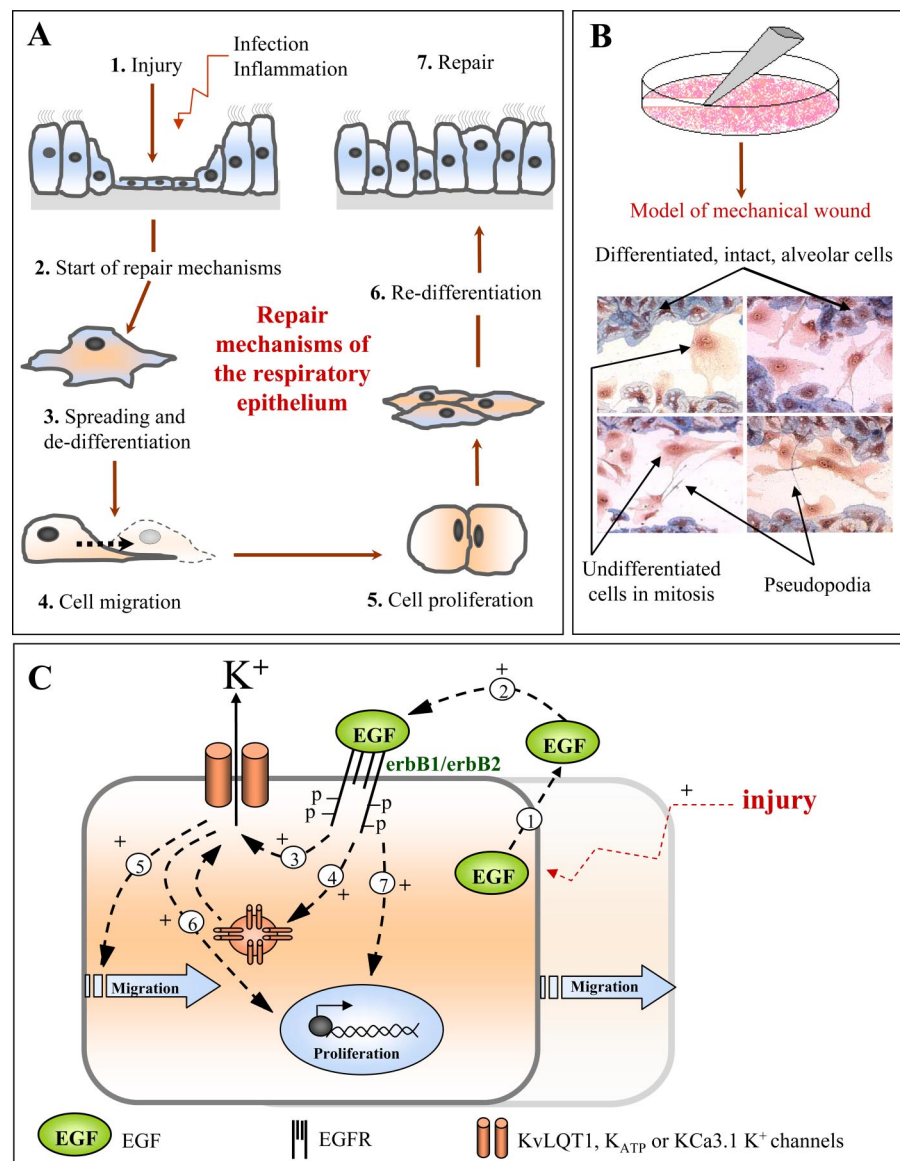


Fig. 4. Repair mechanisms of pulmonary epithelia.

**A:** after injury (step 1), several mechanisms are sequentially engaged in airway and alveolar epithelia repair; spreading, dedifferentiation (step 3); and migration (step 4) of healthy epithelial cells, followed by proliferation and redifferentiation of stem cells (steps 5 and 6). **B:** in vitro model of mechanical wound injury (81, 82). Images of alveolar monolayers during repair are presented. Cells in the wound are undifferentiated (absence of blue, phosphatase alkaline staining), spread, and lamellipodia stretch out to connect the wound edges. Some cells, with 2 nuclei, are in division. **C:** schematic model of epidermal growth factor (EGF)- and K<sup>+</sup> channel-dependent pulmonary epithelial repair based on our in vitro results (81, 82). In this model, EGF, released by injured/repairing alveolar or bronchial epithelial cells (step 1), activates EGF receptor (EGFR; step 2), leading to the stimulation of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 currents (step 3) through the basolateral membranes of bronchial and alveolar monolayers. Chronic treatments with EGF also increase K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 expression in alveolar cells (step 4). K<sup>+</sup> channel inhibition prevents, in large part, EGF-stimulated cell migration (step 5) and proliferation (step 6). K<sup>+</sup> channel activity, coupled with EGF/EGFR signaling, is then a crucial component of cell migration and proliferation processes favoring epithelial repair. Direct stimulation of cell migration and proliferation by other EGF signaling pathways could also be involved (step 7).

kinase A-dependent phosphorylation in myeloblastic cells (88). EGF also stimulates K<sub>Ca</sub> channels in mucous airway cells (28). We consistently observed a stimulation of alveolar and bronchial K<sup>+</sup> channels after exposure to EGF (81, 82).

Thus K<sup>+</sup> channel activity controls cell proliferation, migration, and, subsequently, repair mechanisms of the respiratory epithelia. K<sup>+</sup> channel activation could then represent a promising strategy to enhance epithelial repair after injury. On the other hand, K<sup>+</sup> efflux, after K<sup>+</sup> channel activation, has been identified as one of the first steps of cell apoptosis, especially in tumor cells (90). Activation of the caspases and endonucleases could be a consequence of cell shrinkage and intracellular K<sup>+</sup> depletion after K<sup>+</sup> efflux and/or to the secondary activation of proapoptotic molecules (90). Although the role of K<sup>+</sup> channels in lung epithelial cell apoptosis has not been studied extensively, it could be hypothesized that these channels play a very complex role in the balance between cell migration, proliferation, and apoptosis during lung epithelia regeneration after injury.

**Inflammatory responses.** The inflammatory responses occurring in several lung pathologies could be involved in both injury and repair processes of the pulmonary epithelium. In addition, inflammation could regulate K<sup>+</sup> channel function and expression. The impact of inflammation on K<sup>+</sup> channels has been studied in several other tissues. It has been reported, for example, that inflammation stimulates K<sub>ATP</sub> channels (30) and decreases BK<sub>Ca</sub> open probability (47) in smooth muscle cells. The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) also exerts a complex action on K<sup>+</sup> channels by upregulating some of them (21, 85, 93) and downregulating others (66, 85). In the airways, bronchial K<sub>Ca</sub>3.1 currents have been shown to be stimulated by interleukin (IL)-13 (20). Moreover, our experiments have disclosed that TNF treatment enhances KvLQT1 protein in bronchial cells (unpublished data). In inflammatory pathologies, such as CF, modulation of K<sup>+</sup> channel expression and function by inflammatory molecules could interfere with ion and fluid transport (see section below) as well as repair processes of the injured epithelia (see section above).

Some studies have also evaluated the impact of K<sup>+</sup> channel modulation on inflammatory responses. On the one hand, nicorandil, a K<sub>ATP</sub> opener used as a vasodilator, reduces TNF release by lymphocytes (92). On the other hand, K<sub>ATP</sub> channel inhibition decreases neutrophilic infiltration as well as TNF and IL-6 levels in the lungs and intestine in an ischemic-reperfusion model (65). It has also been shown that lipopolysaccharide (LPS) and TNF both enhance Kv1.3 currents and expression in macrophages (85). Moreover, LPS- and TNF-induced macrophage activation as well as macrophage proliferation are reduced after inhibition of Kv1.3 channels (85). In addition, inhibition of K<sup>+</sup> channels by quinine prevents LPS-induced TNF expression and release by alveolar macrophages (51). Thus K<sup>+</sup> channels could participate in complex inflammatory responses in lungs by regulating immune cell functions.

**Control of ionic and liquid transepithelial transport.** The ion and fluid transport functions of the pulmonary epithelium are essential to lung physiology in all stages of life. Indeed, Cl<sup>-</sup> and liquid secretion is crucial to fetal lung development (57), whereas Na<sup>+</sup> absorption favors alveolar liquid clearance at birth. This phenomenon is also essential for the resolution of pulmonary edema(4). In the airways, equilibrium between Cl<sup>-</sup>

secretion and Na<sup>+</sup> absorption is necessary to maintain adequate periciliary volume crucial for ciliary function (5, 6). In CF patients, reduced Cl<sup>-</sup> secretion and Na<sup>+</sup> hyperabsorption lead to inefficient mucociliary clearance and mucus accumulation (CF; Fig. 1A) that favor chronic infections and inflammation (8). Adequate control of Na<sup>+</sup> absorption, Cl<sup>-</sup> secretion, and liquid transport is thus necessary in normal lung function as well as for the resolution of pathologies characterized by ion transport abnormalities. As detailed below, K<sup>+</sup> channels, by controlling membrane potential and creating an electrochemical gradient for Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport, are thus key elements in the control of liquid surface volume and composition.

**K<sup>+</sup> channels and Cl<sup>-</sup> secretion in the airways.** In the airways, two main K<sup>+</sup> channel types, namely, KvLQT1 and K<sub>Ca</sub>3.1 channels, have been associated with the control of Cl<sup>-</sup> secretion (Fig. 1A). Indeed, pharmacological inhibition of KvLQT1 and K<sub>Ca</sub>3.1 channels strongly reduces Cl<sup>-</sup> transport in nasal, tracheal, and bronchial cells (2, 12, 17, 23, 49, 50). Conversely, it has been shown that K<sub>Ca</sub>3.1 activation, by compounds such as 1-EBIO (49), DC-EBIO (75), 4-chlorobenzof[isoquinoline (CBIQ) (77), and chlorzoxazone (74), for example, stimulates Cl<sup>-</sup> secretion through CFTR and/or Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels (CaCC) in non-CF airway cells. In nasal cells from CF patients with ΔF<sub>508</sub> mutation, no Cl<sup>-</sup> secretory response is detected in the presence of chlorzoxazone (74). Another study revealed that 1-EBIO increases UTP-activated Cl<sup>-</sup> secretion, whereas it has no effect on cAMP-induced Cl<sup>-</sup> secretion, indicating that K<sub>Ca</sub>3.1 activation could enhance Cl<sup>-</sup> transport through alternative CaCC in the absence of CFTR in nasal CF cells (49). In primary cultures of human bronchial cells from ΔF<sub>508</sub> patients, 1-EBIO failed to stimulate Cl<sup>-</sup> secretion at 37°C. However, this compound significantly enhanced Cl<sup>-</sup> currents in cells cultured at 26°C, which increased ΔF<sub>508</sub> CFTR processing at the membrane (17). Since then, K<sub>Ca</sub>3.1 channel activation has been proposed as a promising strategy to favor Cl<sup>-</sup> transport in CF tissues through residual or partially rescued CFTR as well as alternative Cl<sup>-</sup> channels (CF; Fig. 1A).

**K<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup> absorption.** As illustrated in our schematic model of alveolar absorption (Fig. 1B), Na<sup>+</sup> absorption depends on passive Na<sup>+</sup> entry through apical Na<sup>+</sup> channels (cyclic nucleotide gated, highly selective channel, and/or nonselective channel) and active exit by basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, whereas K<sup>+</sup> are recycled by basolateral K<sup>+</sup> channels, in agreement with the Ussing model (84). In ATI cells, K<sup>+</sup> currents have been detected, but the exact molecular identity of these K<sup>+</sup> channels is still unknown (ATI; Fig. 1B) (31, 32). In ATII cells, we have identified three types of K<sup>+</sup> channels, i.e., KvLQT1, K<sub>ATP</sub>, and K<sub>Ca</sub>3.1 channels, at the basolateral membrane primary culture. These channels play a prominent role in Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> alveolar transport (43). Interestingly, we also observed that long-term modulation of K<sup>+</sup> channels (24-h treatments with KvLQT1 or K<sub>ATP</sub> inhibitors or activators) regulates not only Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport but also controls ENaC and CFTR expression as well as liquid absorption through ATII monolayers (44). These results are in agreement with a study by Sakuma et al. (71) demonstrating that K<sub>ATP</sub> activation increases alveolar clearance in the resected human lung. In Na<sup>+</sup>-absorbing H441 human airway epithelial cells, for example, another class of K<sup>+</sup> channels located at the



basolateral membrane, i.e., K<sub>2</sub>P K<sup>+</sup> channels, has been proposed to maintain the driving force for Na<sup>+</sup> absorption (25).

**Emerging role of apical K<sup>+</sup> channels in transepithelial transport.** Although it has been assumed that K<sup>+</sup> channels, such as KvLQT1 and KCa3.1, controlling the electrochemical gradient for Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport are located at the basolateral membrane, apical localization of these channels in bronchial cells was reported recently (2, 53). Furthermore, XE-991, an inhibitor of KCNQ channels, inhibited the short-circuit currents through Calu-3 monolayers measured in basal conditions, indicating that these channels participate in the basal Cl<sup>-</sup> secretion (53). The same group also identified K<sub>2</sub>P K<sup>+</sup> channels at the apical membrane of Calu-3 cells. These channels may participate in K<sup>+</sup> exit/recycling across the apical membrane and could help transepithelial anion secretion (14). Finally, many Kv channels have also been detected at the apical membrane in A119 cells (42, 55). It has been proposed that they could be involved in K<sup>+</sup> secretion.

**Conclusion.** In summary, it has been clearly established that K<sup>+</sup> channels play a central role in the respiratory epithelium by participating in the control of alveolar and airway surface liquid composition and volume. Other functions, including O<sub>2</sub> sensing and epithelial repair, have been highlighted. However, among >30 different types of K<sup>+</sup> channels detected in alveolar and airway epithelial cells, the physiological roles of many of them remain unknown and deserve future study.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the editorial assistance of Ovid Da Silva, Research Support Office, Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM).

#### GRANTS

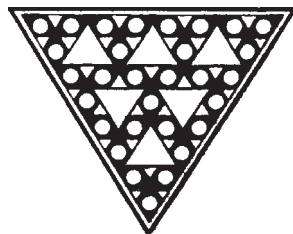
This work was supported by the Cystic fibrosis Foundation, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the CRCHUM foundation.

#### REFERENCES

- Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L259–L271, 2007.
- Bernard K, Bogliolo S, Soriani O, Ehrenfeld J. Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *J Membr Biol* 196: 15–31, 2003.
- Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* 54: 150–160, 1999.
- Berthiaume Y, Matthay MA. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 350–359, 2007.
- Boucher RC. Human airway ion transport. *Part one Am J Respir Crit Care Med* 150: 271–281, 1994.
- Boucher RC. Human airway ion transport. *Part two Am J Respir Crit Care Med* 150: 581–593, 1994.
- Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 445: 495–498, 2003.
- Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23: 146–158, 2004.
- Braun GS, Veh RW, Segerer S, Horster MF, Huber SM. Developmental expression and functional significance of Kir channel subunits in ureteric bud and nephron epithelia. *Pflugers Arch* 445: 321–330, 2002.
- Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 1: 27–34, 2000.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz dM, Rudy B. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann NY Acad Sci* 868: 233–285, 1999.
- 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.
- Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K<sup>+</sup> channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* 61: 880–885, 2006.
- Davis KA, Cowley EA. Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflugers Arch* 451: 631–641, 2006.
- DeCoursey TE, Jacobs ER, Silver MR. Potassium currents in rat type II alveolar epithelial cells. *J Physiol* 395: 487–505, 1988.
- Demolombe S, Franco D, de Boer P, Kupersmidt S, Roden D, Perea Y, Jarry A, Moorman AF, Escande D. Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C359–C372, 2001.
- 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.
- Doring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci* 18: 8625–8636, 1998.
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetschner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69–77, 1998.
- Dulong S, Bernard K, Ehrenfeld J. Enhancement of P2Y6-induced Cl<sup>-</sup> secretion by IL-13 and modulation of SK4 channels activity in human bronchial cells. *Cell Physiol Biochem* 20: 483–494, 2007.
- 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.
- Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury: a translational approach. *Swiss Med Wkly* 133: 586–590, 2003.
- Grahammer 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.
- Haller T, Auktor K, Frick M, Mair N, Dietl P. Threshold calcium levels for lamellar body exocytosis in type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L893–L900, 1999.
- Inglis SK, Brown SG, Constable MJ, McTavish N, Olver 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.
- Ito Y, Son M, Kume H, Yamaki K. Novel effects of minocycline on Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> secretion in human airway epithelial Calu-3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 176: 101–109, 2001.
- Ito Y, Son M, Sato S, Ishikawa T, Kondo M, Nakayama S, Shimokata K, Kume H. ATP release triggered by activation of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human airway Calu-3 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 388–395, 2004.
- Iwase N, Sasaki T, Oshiro T, Tamada T, Nara M, Sasamori K, Hattori T, Shirato K, Maruyama Y. Differential effect of epidermal growth factor on serous and mucous cells in porcine airway submucosal gland. *Respir Physiol Neurobiol* 132: 307–319, 2002.
- Jin M, Defoe DM, Wondergem R. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates Ca<sup>2+</sup>-activated membrane K<sup>+</sup> current and migration of MDCK II cells. *J Membr Biol* 191: 77–86, 2003.
- Jin X, Malykhina AP, Lupu F, Akbarali HI. Altered gene expression and increased bursting activity of colonic smooth muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G274–G285, 2004.
- Johnson MD. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst* 3: 178–186, 2007.
- Johnson MD, Bao HF, Helms MN, Chen XJ, Tighe Z, Jain L, Dobbs LG, Eaton DC. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4964–4969, 2006.
- Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11013–11018, 1997.
- Jovanovic S, Crawford RM, Ranki HJ, Jovanovic A. Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels sense acute changes in oxygen tension in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 363–372, 2003.

35. Kemp PJ, Lewis A, Hartness ME, Searle GJ, Miller P, O'Kelly I, Peers C. Airway chemotransduction: from oxygen sensor to cellular effector. *Am J Respir Crit Care Med* 166: S17–S24, 2002.
36. Kemp PJ, Searle GJ, Hartness ME, Lewis A, Miller P, Williams S, Wootton P, Adriaensen D, Peers C. Acute oxygen sensing in cellular models: relevance to the physiology of pulmonary neuroepithelial and carotid bodies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270: 41–50, 2003.
37. Klein H, Garneau L, Thu Ngan Trinh N, Prive A, Dionne F, Goupil E, Thuringer D, Parent L, Brochiero E, Sauve R. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. In press.
38. Kohler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kampfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG, Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108: 1119–1125, 2003.
39. Koong AC, Giaccia AJ, Hahn GM, Saad AH. Activation of potassium channels by hypoxia and reoxygenation in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *J Cell Physiol* 156: 341–347, 1993.
40. Kunzelmann K, Pavenstadt H, Beck C, Unal O, Emmrich P, Arndt HJ, Greger R. Characterization of potassium channels in respiratory cells. I. General properties. *Pflugers Arch* 414: 291–296, 1989.
41. Kunzelmann K, Sun J, Markovich D, Konig J, Murle B, Mall M, Schreiber R. Control of ion transport in mammalian airways by protease activated receptors type 2 (PAR-2). *FASEB J* 19: 969–970, 2005.
42. Lee SY, Maniak PJ, Ingbar DH, O'Grady SM. Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K<sup>+</sup> channels that are located in apical membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1614–C1624, 2003.
43. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function in transepithelial transport of K<sub>ATP</sub> channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1027–L1037, 2004.
44. Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L1207–L1219, 2006.
45. Lewis A, Peers C, Ashford ML, Kemp PJ. Hypoxia inhibits human recombinant large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>(+)</sup> (maxi-K) channels by a mechanism which is membrane delimited and Ca<sup>2+</sup> sensitive. *J Physiol* 540: 771–780, 2002.
46. Lopez-Barneo J, del Toro R, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Saenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol* 96: 1187–1195, 2004.
47. Lu G, Mazet B, Sun C, Qian X, Johnson CP, Adams MB, Roman RJ, Sarna SK. Inflammatory modulation of calcium-activated potassium channels in canine colonic circular smooth muscle cells. *Gastroenterology* 116: 884–892, 1999.
48. Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadicani SO, Spray DC, McDonald TV, Gupta S. K<sub>ATP</sub> channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* 275: 26050–26057, 2000.
49. 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.
50. Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl<sup>(-)</sup> secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 283–289, 2000.
51. Maruyama N, Kakuta Y, Yamauchi K, Ohkawara Y, Aizawa T, Ohru T, Nara M, Oshiro T, Ohno I, Tamura G. Quinine inhibits production of tumor necrosis factor- $\alpha$  from human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 514–520, 1994.
52. Monaghan AS, Baines DL, Kemp PJ, Olver RE. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents of alveolar type II cells isolated from fetal guinea-pig lung: regulation by G protein- and Mg<sup>2+</sup>-dependent pathways. *Pflugers Arch* 433: 294–303, 1997.
53. Moser SL, Harron SA, Crack J, Fawcett JP, Cowley EA. Multiple KCNQ potassium channel subtypes mediate basal anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3. *J Membr Biol* 221: 153–163, 2008.
54. Noskov SY, Roux B. Ion selectivity in potassium channels. *Biophys Chem* 124: 279–291, 2006.
55. O'Grady SM, Lee SY. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689–L700, 2003.
56. O'Grady SM, Lee SY. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1578–1594, 2005.
57. Olver RE, Walters DV, Wilson M. Developmental regulation of lung liquid transport. *Annu Rev Physiol* 66: 77–101, 2004.
58. Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237: 749–753, 1987.
59. Pardo LA. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 19: 285–292, 2004.
60. Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC. Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 471: 157–164, 2003.
61. Peers C, Kemp PJ, Boyd CA, Nye PC. Whole-cell K<sup>+</sup> currents in type II pneumocytes freshly isolated from rat lung: pharmacological evidence for two subpopulations of cells. *Biochim Biophys Acta* 1052: 113–118, 1990.
62. Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR, Gonzalez C. Kv $\beta$ 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to kv4.2 but not to Shaker channels. *J Gen Physiol* 113: 897–907, 1999.
63. Platoshyn O, Yu Y, Golovina VA, McDaniel SS, Krick S, Li L, Wang JY, Rubin LJ, Yuan JX. Chronic hypoxia decreases K(V) channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L801–L812, 2001.
64. Plummer HK, III, Dhar MS, Cekanova M, Schuller HM. Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines (Abstract). *BMC Cancer* 5: 104, 2005.
65. Pompermayr K, Amaral FA, Fagundes CT, Vieira AT, Cunha FQ, Teixeira MM, Souza DG. Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 556: 215–222, 2007.
66. Ramstrom C, Chapman H, Ekokoski E, Tuominen RK, Pasternack M, Tornquist K. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and ceramide depolarize the resting membrane potential of thyroid FRTL-5 cells via a protein kinase C $\zeta$ -dependent regulation of K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal* 16: 1417–1424, 2004.
67. Rao JN, Platoshyn O, Li L, Guo X, Golovina VA, Yuan JX, Wang JY. Activation of K<sup>+</sup> channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C885–C898, 2002.
68. Ridge FP, Duszyk M, French AS. A large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in a human lung epithelial cell line (A549). *Biochim Biophys Acta* 1327: 249–258, 1997.
69. 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.
70. Sakai H, Shimizu T, Hori K, Ikari A, Asano S, Takeguchi N. Molecular and pharmacological properties of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels of human lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* 435: 125–133, 2002.
71. Sakuma T, Takahashi K, Ohya N, Nakada T, Matthay MA. Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol Toxicol* 83: 16–22, 1998.
72. Schwab A. Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci* 16: 29–33, 2001.
73. Schwab A, Hanley P, Fabian A, Stock C. Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology (Bethesda)* 23: 212–220, 2008.
74. Singh AK, Devor DC, Gerlach AC, Gondor M, Pilewski JM, Bridges RJ. Stimulation of Cl<sup>(-)</sup> secretion by chlorzoxazone. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 778–787, 2000.
75. Singh S, Syme CA, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 600–611, 2001.
76. Son M, Ito Y, Sato S, Ishikawa T, Kondo M, Nakayama S, Shimokata K, Kume H. Apical and basolateral ATP-induced anion secretion in polarized human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 411–419, 2004.
77. Szkotak AJ, Murthy M, MacVinish LJ, Duszyk M, Cuthbert AW. 4-Chloro-benzo[F]isouquinoline (CBIQ) activates CFTR chloride channels

- and KCNN4 potassium channels in Calu-3 human airway epithelial cells. *Br J Pharmacol* 142: 531–542, 2004.
78. **Szkotak AJ, Ng AM, Sawicka J, Baldwin SA, Man SF, Cass CE, Young JD, Duszyk M.** Regulation of K<sup>(+)</sup> current in human airway epithelial cells by exogenous and autocrine adenosine. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1991–C2002, 2001.
79. **Teng S, Ma L, Zhen Y, Lin C, Bahring R, Vardanyan V, Pongs O, Hui R.** Novel gene hKCNE4 slows the activation of the KCNQ1 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 808–813, 2003.
80. **Thompson-Vest N, Shimizu Y, Hunne B, Furness JB.** The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J Anat* 208: 219–229, 2006.
81. **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.
82. **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.
83. **Tulic MK, Fiset PO, Muller O, Hamid Q.** Cytokines and chemokines in asthma: an overview. In: *Physiologic Basis of Respiratory Disease*, edited by Hamid Q, Shannon J, and Martin J. Hamilton, Canada: BC Becker, 2005, p. 453–467.
84. **USSINGHH.** Transport through biological membranes. *Annu Rev Physiol* 15: 1–20, 1953.
85. **Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sanchez-Tillo E, Lopez-Iglesias C, Soler C, Solsona C, Celada A, Felipe A.** Differential voltage-dependent K<sup>+</sup> channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J Biol Chem* 278: 46307–46320, 2003.
86. **Wadsworth SJ, Chander A.** H<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-dependence of Ca<sup>2+</sup> uptake in lung lamellar bodies. *J Membr Biol* 174: 41–51, 2000.
87. **Wang D, Youngson C, Wong V, Yeager H, Dinauer MC, Vega-Saenz ME, Rudy B, Cutz E.** NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K<sup>+</sup> channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13182–13187, 1996.
88. **Wang L, Xu B, White RE, Lu L.** Growth factor-mediated K<sup>+</sup> channel activity associated with human myeloblastic ML-1 cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C1657–C1665, 1997.
89. **Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT.** Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12: 17–23, 1996.
90. **Wang Z.** Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch* 448: 274–286, 2004.
91. **Warth R, Riedemann N, Bleich M, Van Driessche W, Busch AE, Greger R.** The cAMP-regulated and 293B-inhibited K<sup>+</sup> conductance of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch* 432: 81–88, 1996.
92. **Wei XM, Heywood GJ, Di Girolamo N, Thomas PS.** Nicorandil inhibits the release of TNFalpha from a lymphocyte cell line and peripheral blood lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 3: 1581–1588, 2003.
93. **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.
94. **Wondergem R, Cregan M, Strickler L, Miller R, Suttles J.** Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties. *J Membr Biol* 161: 257–262, 1998.
95. **Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY, Blannar MA.** KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4017–4021, 1997.



## **Chapitre 4 - Discussion - perspectives**

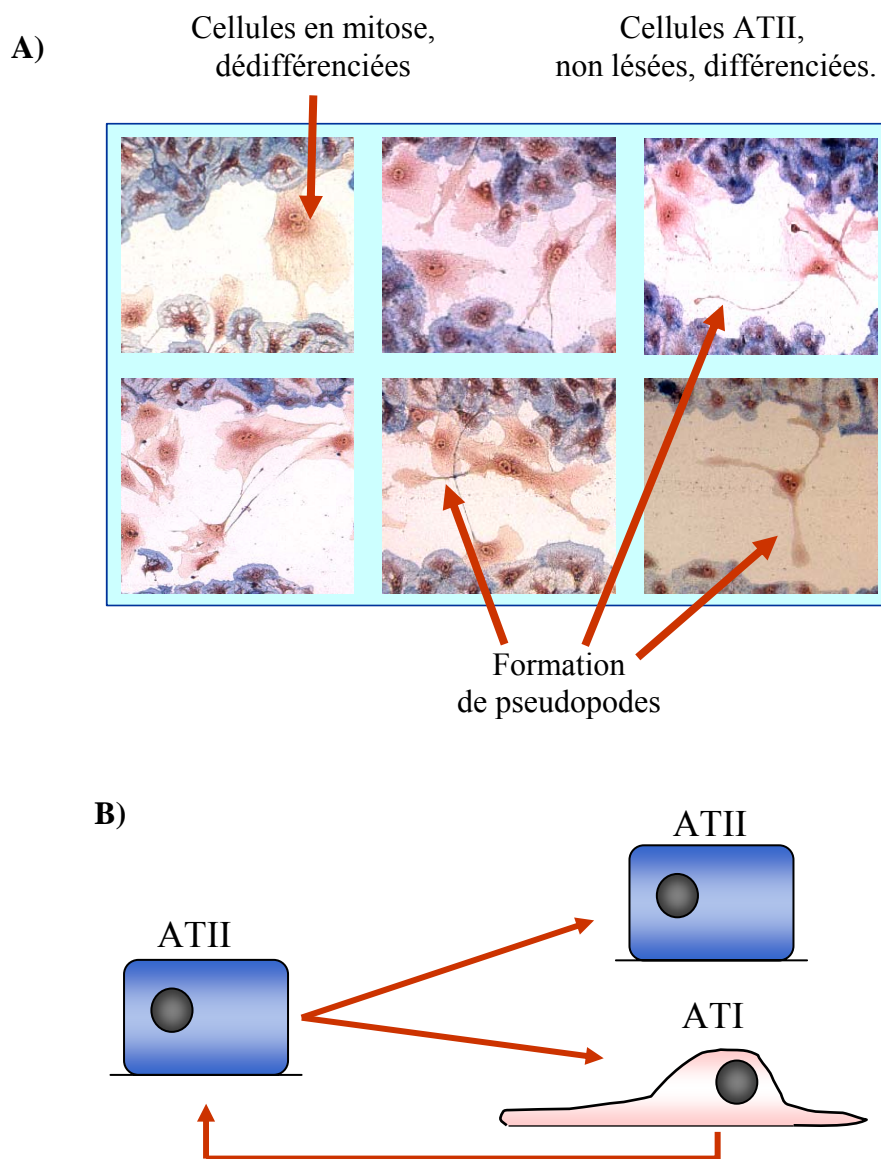
Notre étude a permis pour la première fois d'attribuer un rôle aux canaux  $K^+$  couplés à l'activité du facteur de croissance épidermique (EGF) dans les processus de réparation de l'épithélium alvéolaire sain et l'épithélium bronchique sain et fibrose kystique (FK). En effet, nous avons observé que la réparation des lésions en présence d'EGF dépendait de l'activité des canaux  $K^+$ . De plus, nous avons pu noter que notre modèle de cellules FK homozygote  $\Delta F508$  (CuFi-1) présentait un retard de réparation, qui serait dû à une migration des cellules FK plus lente. Selon nos résultats, ce délai de réparation des cellules FK pourrait être possiblement expliqué par une plus faible sécrétion d'EGF, un défaut de l'activation de la voie du récepteur de l'EGF (EGFR) combinée à une activité et expression réduites des canaux  $K^+$ .

### **1) Modèle de plaies mécaniques**

Notre modèle de plaies mécaniques était idéal par sa simplicité et par sa reproductibilité pour tester nos premières hypothèses. En effet, ce modèle était adéquat pour le but de l'étude, qui était de démontrer l'implication des canaux  $K^+$  dans les processus de migration et de prolifération, des phénomènes cruciaux pour la réparation de l'épithélium respiratoire. Nous avons réalisé une expérience à intervalle de temps (**voir vidéo 1** dans la section *Supplemental Videos* sur le site de *American Journal of Physiology : Lung, Cellular and Molecular Physiology*) pour suivre la réparation d'une plaie mécanique sur une monocouche cellulaire, où nous avons clairement pu voir la formation de pseudopodes et le mouvement des cellules aux bords de la plaie. De plus, nous avons pu également observer de la division et de la prolifération cellulaire. En effet, nous avons pu discerner la présence de plusieurs cellules binucléées qui engendraient par la suite des cellules filles. Nous avons également confirmé la capacité des cellules alvéolaires et bronchiques à migrer et à proliférer via des essais en chambre de type Boyden, d'incorporation de thymidine tritiée ( $^3H$ -thymidine) et par comptage cellulaire.

Nos résultats ont pu confirmer que les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques avaient la capacité de réparer une lésion en faisant intervenir non seulement la migration et la prolifération, mais aussi des changements de différenciation. En effet, nous avons observé chez les cellules alvéolaires de type II (ATII) en culture primaire,

qu'elles étaient capables de se dédifférencier, puisqu'elles perdaient leur marquage bleu de la phosphatase alcaline caractéristique des cellules ATII. En effet, comme nous pouvons le voir dans la **figure 31A**, les cellules au centre de la plaie sont roses, ce qui indique une première transition ATII  $\rightarrow$  ATI (**voir figure 31B**). Nous pouvons voir tout comme dans notre expérience à intervalle de temps que ces cellules en migration forment des pseudopodes et celles en division possèdent deux noyaux. Cependant, de façon intéressante, nous avons noté qu'à mesure que les lèvres de la plaie se referment, les



**Figure 31. Cellules ATII en culture primaire.** A) Photos des cellules ATII marquées à la phosphatase alcaline montrant la dédifférenciation de cellules ATII pendant les processus de réparation. B) Schéma représentant les différents rôles des cellules ATII.

cellules se redifférencient et retrouvent graduellement leur marquage bleu, ce qui indique une nouvelle transition ATI  $\rightarrow$  ATII (**voir figure 31B**). Vers la fin, les cellules sont éventuellement capables de rétablir une monocouche uniforme de cellules ATII (**voir figure 31A**). Ces observations sont consistantes avec celles retrouvées dans la littérature. En effet, il a d'abord été démontré que le phénotype des cellules ATII en culture primaire était préservé pendant plusieurs jours. De plus, suite à une lésion, les cellules semblent former un intermédiaire cellulaire dérivé des cellules ATII et en processus de transformation en cellules ATI (26). Enfin, l'étude des cellules ATII est importante puisqu'elles sont considérées comme des cellules souches pour l'épithélium alvéolaire adulte (4).

### **1.1) Limitations de notre modèle de plaie mécanique**

#### **1.1.1) Processus de réparation**

Notre modèle se limite à l'étude de la réparation épithéliale de monocouches cellulaires, qui fait intervenir la migration et la prolifération cellulaire et dans une certaine mesure des changements de phénotype. Cependant, nous sommes conscients que ces phénomènes ne sont pas les seuls à intervenir dans la réépithélisation. En effet, le processus de différenciation cellulaire est essentiel à la régénération *in vivo* d'un épithélium pseudostratifié et fonctionnel au niveau des voies aériennes. Par conséquent, il est évident que notre modèle de réparation épithéliale sur monocouche cellulaire cultivée sur plastique ne nous a pas permis d'explorer en profondeur le phénomène de différenciation cellulaire en dehors de celle des cellules ATII détaillée précédemment.

#### **1.1.2) Environnement cellulaire**

Notre modèle est également limité puisqu'il se réduit à l'étude *in vitro* des mécanismes de réparation d'un type cellulaire à la fois. Toutefois, nous sommes tout à fait conscients que les processus de réparation *in vivo* sont beaucoup plus complexes, que ceux représentés dans notre modèle *in vitro*. En effet, la régénération épithéliale *in vivo* met en branle toute une panoplie de types cellulaires, qui ne sont pas représentés dans notre modèle, tels que les cellules de Clara, les cellules inflammatoires, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Celles-ci sont essentielles dans différents phénomènes,

tels que la dégradation des tissus partiellement dénaturés pour faire place à la production de matrice provisoire, qui permet ensuite la migration et la prolifération des cellules basales, épithéliales, endothéliales et des fibroblastes pour venir recouvrir la région de la lésion (83, 133, 142). Les cellules de Clara, qui sont des cellules progénitrices, sont également importantes dans la régénération de l'épithélium bronchiolaire (1).

#### **1.1.2.1) Interaction épithélio-mésenchymateuse dans les processus de réparation**

La réparation épithéliale dépend également de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), qui consiste à la transformation des cellules épithéliales différenciées en cellules mésenchymateuses (158). L'épithélium lésé peut communiquer avec le mésenchyme en relarguant du TGF- $\beta$ , augmentant la population de fibroblastes et de myofibroblastes (134, 158). Cependant, il a été démontré que les cycles répétés de lésion et réparation pouvaient induire une augmentation de l'activité des fibroblastes et des myofibroblastes, occasionnant la cicatrisation et le développement progressif de la fibrose, puis un remodelage des voies aériennes (132, 134, 158). De plus, il a été démontré que les myofibroblastes pouvaient synthétiser et sécréter un éventail de cytokines et de facteurs de croissance, perpétuant ainsi la réponse inflammatoire (134). L'EGF semble pouvoir bloquer l'activité de TEM induit par le TGF- $\beta$ . En effet, il faut considérer l'épithélium respiratoire comme une composante active qui, dépendant de la nature et la sévérité de la lésion, peut tendre vers une réépithélisation normale, une fibrogénèse ou même à l'apoptose (158).

#### **1.1.3) Environnement inflammatoire et facteurs de croissance**

Ces processus de réparation épithéliale sont également régulés par une multitude de facteurs de croissance et de molécules inflammatoires, sécrétés par un large éventail de cellules trouvées dans les voies aériennes. L'environnement inflammatoire peut s'avérer très important dans les processus de réparation épithéliale. En effet, Shute *et al.* (2003) soulignait que les patients atteints de la FK présentaient des niveaux élevés de facteurs de croissance et de cytokines. Dans notre étude, nous avons mis l'accent sur un seul facteur de croissance, l'EGF, que nous verrons en détail à la **section 2**.

Bref, il est évident que les conclusions basées sur notre modèle de plaies mécaniques en présence d'un seul facteur de croissance ne représentent pas parfaitement la réalité, mais elles révèlent cependant un rôle insoupçonné à ce jour d'un couplage des canaux  $K^+$  et de l'EGF dans les processus de réparation épithéliale respiratoire (**voir section 3.2**).

### **1.2) Modèles alternatifs**

Aucun modèle *in vivo* pour les lésions au niveau de l'épithélium respiratoire n'existe à ce jour pour la pathologie de la FK. En effet, plusieurs équipes ont développé des modèles de souris KO-CFTR ou homozygote  $\Delta F508$ . Cependant, ces modèles animaux souffrent d'obstruction intestinale, comme certains patients FK, mais ne développent pas de lésions épithéliales ni de complications respiratoires (151, 152).

Le modèle murin développé par Mall *et al.*, qui présente une hyperabsorption de  $Na^+$ , est le seul qui développe un phénotype pulmonaire avec plusieurs caractéristiques de la FK, telles que l'inflammation neutrophilique, la métaplasie des cellules caliciformes, l'hypersécrétion de mucus ainsi que l'obstruction des voies aériennes (10, 151). La surexpression du canal ENaC entraîne des altérations du volume de surface des voies aériennes occasionnant une clairance des bactéries altérée (10). Toutefois, chez ce modèle murin, l'environnement (accumulation de mucus déshydraté, présence de molécules inflammatoires et clairance mucociliaire réduite) ne semble pas conduire au développement de lésions épithéliales. Sans cette caractéristique, ce modèle ne nous est pas utile et n'est donc pas une alternative possible pour notre étude sur la réparation de l'épithélium respiratoire.

Il existe également un modèle de lésions épithéliales induites par l'instillation intra-trachéale de la bléomycine, une molécule qui possède des propriétés antibiotiques et cytotoxiques. Cependant, ce modèle occasionne la formation d'œdèmes pulmonaires et le développement de la fibrose pulmonaire, manifestations associées à la pathologie du syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) et non de la FK.

Une étude *in vivo* sur les processus de réparation épithéliale s'avère alors impossible avec les modèles présentement disponibles. Toutefois, il semblerait que le porc, par sa grande homologie avec l'humain au niveau de l'anatomie, de l'histologie, des



propriétés biochimiques et physiologiques, serait potentiellement un modèle pertinent pour les études des tissus pulmonaires FK (152). Malgré les qualités de ce modèle, cet animal par sa taille et ses caractéristiques ne sera pas approprié pour nos études futures.

La meilleure alternative à ce jour est le modèle développé par le laboratoire du D<sup>re</sup> Christelle Coraux en France. Ce modèle de xéno greffe des voies aériennes humaines permettrait l'étude du processus de réépithélisation. En effet, ce modèle consiste en l'ensemencement des cellules épithéliales des voies aériennes humaines, issues d'ablation de polypes nasaux, sur une trachée de rat dénudé de son propre épithélium, greffé sur une souris athymique. Cela permet de suivre les différentes étapes de différenciation, menant à une réépithélialisation complète en épithélium pseudostratifié. Il est évident que cette alternative demeure un modèle *in vitro*, mais celui-ci se rapproche beaucoup plus de la réalité. En effet, ce modèle permet de mimer l'environnement inflammatoire et cellulaire (cellules basales, fibroblastes, matrice) lors du processus de réépithélisation (83). De plus, ce modèle peut s'avérer très utile et intéressant pour étudier les mécanismes de réparation, mais surtout le phénomène de différenciation cellulaire. Nous espérons effectivement entreprendre une collaboration avec le D<sup>re</sup> Christelle Coraux pour la prochaine étape de notre étude. En effet, il sera intéressant de pouvoir explorer le rôle des canaux  $K^+$  et de l'EGF dans les mécanismes de réparation sur un épithélium pseudostatifié. L'utilisation de ce modèle nous permettra de mieux comprendre les processus de régénération épithéliale, puisque celui-ci ressemble et se rapproche plus des phénomènes observés *in vivo*.

## **2) Rôle des facteurs de croissance dans les processus de réparation**

### **2.1) Rôle du EGF dans les processus de réparation**

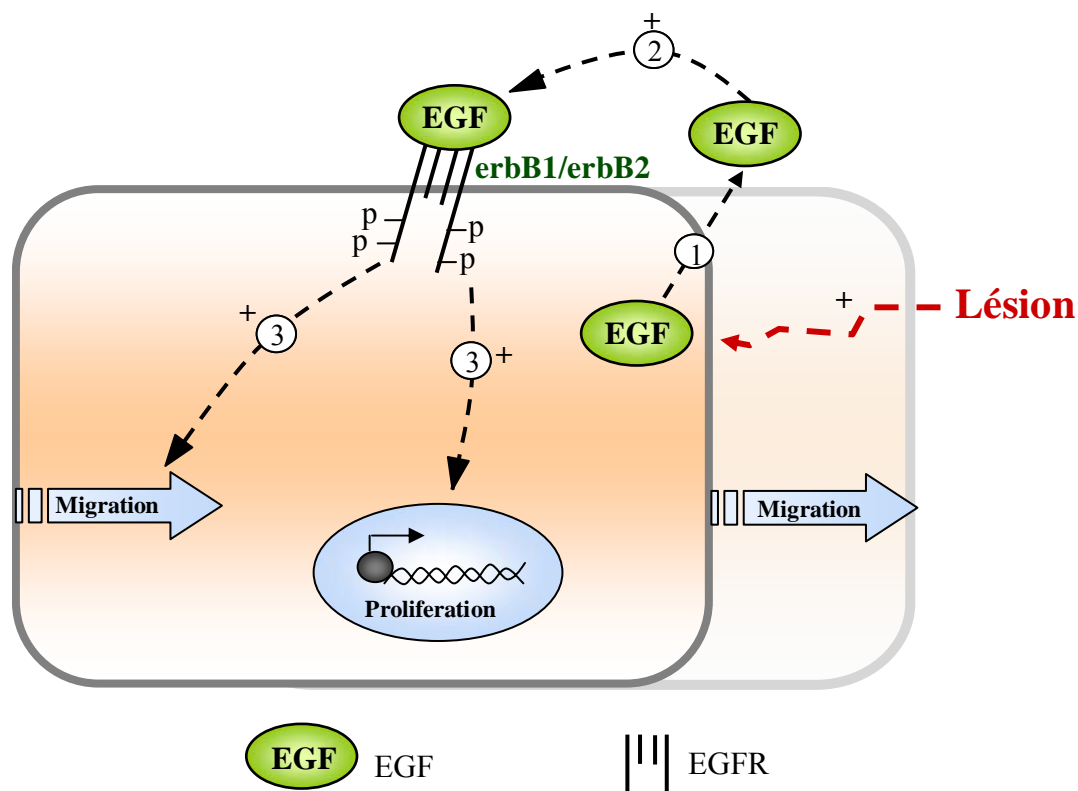
Il est reconnu que les facteurs de croissance modulent les processus de réparation dans plusieurs types cellulaires (32, 139, 155, 157). Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'EGF, facteur reconnu pour stimuler la réparation épithéliale pulmonaire *in vitro* et *in vivo* (84, 140, 155, 157). En effet, nos résultats montrent que la réparation des monocouches de cellules épithéliales pulmonaires cultivées sur support plastique ainsi que les phénomènes de migration cellulaire mesurée en chambre de type Boyden dépendent fortement de l'EGF. Par contre, la prolifération cellulaire, estimée par

incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine, semble peu ou pas modulée par celui-ci. Tout comme rapporté dans la littérature, nos résultats démontrent également que les récepteurs EGFR (erbB1) et erbB2 sont exprimés dans les cellules alvéolaires et bronchiques (137). Nous n'avons toutefois pas exploré le rôle des autres récepteurs de la famille erbB.

### **2.1.1) Boucle autocrine de l'EGF**

Nos résultats suggèrent l'existence d'une boucle autocrine pour l'EGF lors des processus de réparation. D'abord, nos résultats démontrent que la réparation épithéliale, qui est dépendante de l'EGF, est fortement réduite en présence d'anticorps anti-EGF. Ensuite, nous avons observé que les récepteurs erbB1 et erbB2, possédaient une activité de base, estimée par le niveau de phosphorylation, mais pouvaient également être activés pendant la réparation des lésions des monocouches alvéolaires et bronchiques. Ensuite, nous avons montré qu'en bloquant l'activité tyrosine kinase des récepteurs erbB1 et erbB2 avec les inhibiteurs AG1478 et AG825, la réparation des cellules ATII était réduite à un niveau similaire à celui observé en présence de l'anticorps anti-EGF. De plus, nos résultats démontrent que l'application de milieux conditionnés récupérés de monocouches lésées pouvait stimuler la migration cellulaire. Ceci suggère qu'un médiateur est sécrété dans le milieu conditionné durant la réparation cellulaire. Enfin, nous avons confirmé que l'effet stimulateur de nos milieux conditionnés était occasionné par l'EGF, sécrété par les cellules en réparation. En effet, cette stimulation était renversée lorsque nous ajoutions au milieu conditionné de l'anticorps anti-EGF, qui titre l'EGF sécrété. Comme dans la **figure 32**, nos résultats révèlent donc que suite à une lésion, les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques sont capables de sécréter de l'EGF capable d'activer son récepteur de façon autocrine, qui stimule par la suite les processus de réparation.

Nos résultats sont consistants avec ceux de la littérature, puisqu'il a effectivement été rapporté par plusieurs équipes que l'expression du récepteur EGFR était augmentée dans la région entourant la lésion (134, 137, 155). En effet, la littérature confirme que le récepteur EGFR dans les cellules bronchiques peut être activé suite à des lésions mécaniques. Ceci suggère que les cellules en réparation sécrètent des médiateurs, tel que l'EGF et le HB-EGF, capables d'activer le récepteur EGFR, qui ensuite stimule les



**Figure 32. Modèle de la boucle autocrine de l'EGF.** Suite à une lésion, les cellules en réparation sécrètent de l'EGF, qui vient activer son récepteur et ainsi stimule les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire impliqués dans les processus de réparation épithéliale.

phénomènes de réparation (154). Ensuite, Dong *et al.* (1999) ont démontré que de bloquer la sécrétion des ligands du récepteur EGFR inhibait la migration et la prolifération de différents types cellulaires. Dans le même ordre d'idées, Tokumaru *et al.* (2000) ont observé un retard de réépithélisation causé par la réduction de la migration des kératinocytes lorsqu'ils empêchent l'activation du récepteur EGFR par ses ligands (156). Il a également été démontré que suite à des lésions dans cellules épithéliales de la cornée, il y avait sécrétion de HB-EGF, agissant de façon autocrine sur le récepteur EGFR pour stimuler les processus de réparation (169). Ces études supportent et appuient donc notre hypothèse de l'activation d'une boucle autocrine EGF/EGFR lors de la réparation épithéliale.

## **2.2) Rôle des autres ligands du EGFR dans les processus de réparation**

Cette étude s'est focalisée sur l'EGF, il ne faut toutefois pas oublier que le récepteur EGFR possède plus d'un ligand, tels que le TGF $\alpha$ , le HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*), l'amphiréguline, la bêtacelluline, l'épiréguline, l'épigène ainsi que l'héréguline. Ceux-ci sont synthétisés par divers types cellulaires, tels que les cellules épithéliales, les fibroblastes, les éosinophiles, les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes (84, 134, 137, 124, 156). Il a été rapporté que le TGF $\alpha$  stimule la réparation épithéliale (140, 157) possiblement en activant la prolifération cellulaire (153). Le HB-EGF également semble impliqué dans la régénération épithéliale (154, 155).

L'activation du récepteur EGFR déclenche diverses voies de signalisation, telles que PLC $\gamma$ -PKC, Ras-MAP kinases, GTPases, STAT, PI3 kinase et PLD. Ainsi, différentes voies de signalisation semblent s'enclencher suite à l'activation du récepteur EGFR pour stimuler les processus de réparation (124). La complexité de ce réseau des voies de signalisation empêche d'établir clairement l'association des événements biochimiques à des effets biologiques précis. Toutefois, des études ont déterminé que certaines de ces cascades de signalisation sont impliquées dans les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire (124). Pour pousser plus loin notre étude, nous aurions pu étudier plus finement les voies de signalisation et élargir nos expériences à d'autres facteurs de croissance.

## **2.3) Rôle d'autres facteurs dans les processus de réparation**

### **2.3.1) Rôle d'autres facteurs de croissance dans les processus de réparation**

D'autres facteurs de croissance sont connus pour moduler les processus de réparation. Ensuite, on a rapporté que le TGF- $\beta$ 1 était sécrété suite à des lésions et était impliqué dans la stimulation de la réparation épithéliale (155). Son effet se ferait via la stimulation de la migration des cellules aux bords de la plaie (84, 139). En fait, il semblerait que le TGF- $\beta$  pourrait également stimuler les MMP et donc la production de matrice extracellulaire nécessaire à la migration des cellules (83, 158). D'autre part, le KGF stimulerait différentes réponses cellulaires, telles que la migration et prolifération des cellules épithéliales (84, 140). De plus, il semblerait que l'effet stimulateur du KGF

se ferait via le récepteur EGFR (140). Le HGF, considéré comme le plus important mitogène, est aussi activé durant les processus de réparation et stimule la prolifération cellulaire (84, 140). Selon nos résultats (non-publiés), il semblerait que le HGF agirait par une voie paracrine et non autocrine, puisqu'il est sécrété par les cellules mésenchymateuses (fibroblastes), mais que son récepteur c-met est exprimé à la surface des cellules épithéliales. On retrouve aussi le FGF-2, qui est impliqué dans la progression du cycle cellulaire, la croissance et la différenciation cellulaire. Enfin, le VEGF est important dans le phénomène d'angiogenèse lors de la régénération épithéliale (84).

Il semble donc que les processus de réparation épithéliale dépendent d'une multitude de facteurs de croissance sécrétés par plusieurs types cellulaires. Alors, pour pouvoir dresser un meilleur portrait des facteurs régulant la réparation de l'épithélium respiratoire, il faudra élargir l'étude des facteurs de croissance. En effet, nous prévoyons éventuellement développer des co-cultures afin de pouvoir explorer l'impact d'un plus large éventail de facteurs de croissance sur les processus de réparation épithéliale en présence de plusieurs types cellulaires.

### **2.3.2) Rôle de l'inflammation dans les processus de réparation**

À priori, la réponse inflammatoire semble avoir une connotation négative, puisque dans plusieurs pathologies, comme celle de la fibrose kystique (FK), l'inflammation chronique semble occasionner et favoriser les processus lésionnels (**voir section 4.1.3**). Cependant, il semblerait que les composantes de l'inflammation ne soient pas toutes néfastes pour la réparation épithéliale. En effet, il a été démontré que le TNF, une cytokine pro-inflammatoire, pouvait stimuler la migration cellulaire et les processus de réparation épithéliale (143, 169). De façon plus intéressante, le TNF semblerait être capable d'activer indirectement le récepteur EGFR. En effet, il a été suggéré que le TNF pourrait, en se liant à son récepteur, activer des MMP capables de cliver le pro-EGF. Celui-ci pourrait ensuite se lier au récepteur EGFR et ainsi stimuler les processus de réparation (169). Ensuite, l'IL-1 $\beta$ , une autre cytokine pro-inflammatoire, favoriserait la réparation épithéliale via l'activation de la voie de signalisation MAPK par l'EGF et le TGF $\alpha$  (140). Il semblerait que l'IL-1 $\beta$  serait également importante dans le rétablissement de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire en inhibant le développement de la fibrose via la

prolifération des fibroblastes (138). Ensuite, il semblerait que l'IL-13, une cytokine anti-inflammatoire, pouvait également activer le récepteur EGFR et donc stimuler les processus de réparation. En fait, l'IL-13 semblerait capable d'induire la sécrétion du TGF $\alpha$  qui se lierait au récepteur EGFR et stimulerait la prolifération cellulaire (153). De plus, l'IL-13 occasionnerait également la sécrétion de HB-EGF, ce qui permettrait la stimulation de la réparation épithéliale (154).

Selon la littérature, il semble donc que certaines composantes de l'inflammation pourraient avoir un effet bénéfique sur les phénomènes de réparation épithéliale. C'est pourquoi nous avons entamé, il y a quelques mois déjà, une étude sur le rôle de l'inflammation sur les processus de réparation épithéliale. En effet, jusqu'à maintenant, nous avons évalué l'impact de plusieurs cytokines sur la refermeture des plaies mécaniques et sur la migration cellulaire. Nous avons également testé le rôle de ces cytokines sur l'expression de canaux K<sup>+</sup>. Nous tenterons aussi de comprendre l'effet de ces cytokines sur la voie EGF/EGFR et de quantifier par ELISA les niveaux de cytokines sécrétés lors d'une lésion épithéliale. Cette étude nous permettra de mieux comprendre l'impact d'un environnement inflammatoire lors des processus de réparation de l'épithélium respiratoire.

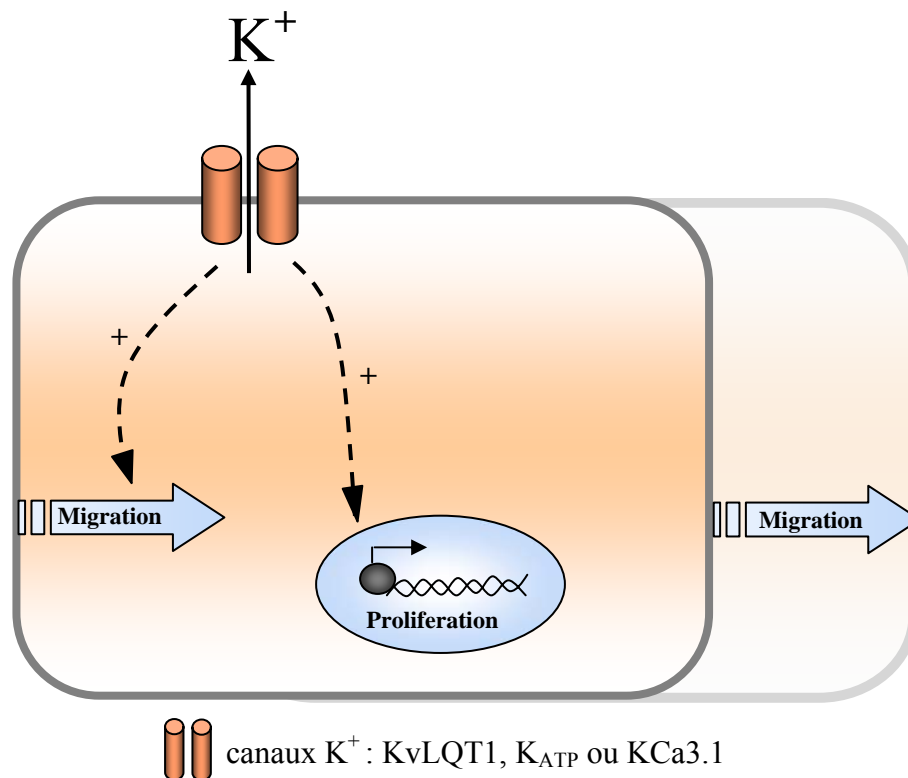
### **3) Rôle des canaux K<sup>+</sup> dans les processus de réparation**

L'épithélium du système respiratoire présente une énorme diversité moléculaire de canaux K<sup>+</sup>. En effet, on discerne au niveau de l'épithélium respiratoire les transcrits de plus de 30 canaux K<sup>+</sup> différents. Ces canaux K<sup>+</sup> sont regroupés en trois grandes classes : 1) les canaux K<sup>+</sup> à 6 STM (segments transmembranaires), 2) les canaux K<sup>+</sup> à 4 STM et comportant 2 pores et 3) les canaux K<sup>+</sup> à 2 STM et à rectification entrante (**voir figure 24**).

Malgré l'énorme diversité moléculaire des canaux K<sup>+</sup> dans l'épithélium respiratoire, nous nous sommes concentrés dans notre étude sur les canaux KvLQT1, K<sub>ATP</sub> et KCa3.1, que nous avons détectés au niveau génique et protéique. En effet, nos résultats démontrent que le courant K<sup>+</sup> total de base mesuré en chambre de Ussing à la membrane basolatérale des cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques était médié par les canaux KvLQT1 et K<sub>ATP</sub>. Il semblerait que le canal KCa3.1 peut être activé par le

composé pharmacologique 1-EBIO ou suite à un stress comme lors d'une lésion mécanique. Plusieurs autres canaux  $K^+$  parmi les 30 différents identifiés pourraient participer activement au flux de  $K^+$  dans les conditions normales.

Nos résultats montrent que les inhibiteurs des canaux  $K^+$  KvLQT1,  $K_{ATP}$  et  $KCa3.1$  pouvaient empêcher la refermeture des plaies (**voir vidéo 2** dans la section *Supplemental Videos* sur le site de *American Journal of Physiology : Lung, Cellular and Molecular Physiology*). De plus, nous avons observé que la combinaison des inhibiteurs avait un effet additif sur l'inhibition de la réparation épithéliale, ce qui suggère une contribution partielle de chacun des canaux. Nous avons également noté que les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire étaient aussi inhibés par les modulateurs des canaux  $K^+$ . Alors à la lumière de nos résultats, il semble donc que les canaux  $K^+$  jouent un rôle dans les mécanismes de régulation de la réparation épithéliale (**voir figure 33**).



**Figure 33. Modèle de l'implication des canaux  $K^+$  dans les processus de réparation.** L'activité des canaux  $K^+$  semble pouvoir moduler les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire impliqués dans les processus de réparation épithéliale.

Plusieurs études ont effectivement suggéré que les canaux  $K^+$  pouvaient être impliqués dans les processus de migration et de prolifération. En effet, Schwab *et al.* (2007) ont proposé un modèle dans lequel les canaux ioniques, dont les canaux  $K^+$ , sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette d'actine combinée à la variation du volume cellulaire (135). Selon ces études, l'efflux de  $K^+$  au pôle postérieur de la cellule en migration provoquerait une sortie d'eau, cruciale pour la rétractation de l'arrière de la cellule et la migration cellulaire (**voir figure 12**). Certaines études ont aussi suggéré que l'efflux de  $K^+$  via les canaux  $K^+$  pouvait entraîner des variations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, des signaux mitogéniques, et ainsi influencer la prolifération cellulaire (123, 164, 165). D'autres études suggèreraient plutôt un rôle des canaux  $K^+$  dans la progression du cycle cellulaire (145-150, 164, 165). En effet, il a été proposé qu'ils puissent être impliqués dans l'hyperpolarisation transitoire de la membrane cellulaire, étape essentielle à la progression du cycle cellulaire (146). On aurait également assigné un rôle à certains canaux  $K_v$  (dépendants du voltage) et  $K_{ATP}$  (sensibles à l'ATP) dans la phase G1 et/ou au point de contrôle entre la phase G1/S (148-150). Enfin, il semblerait que les canaux  $K^+$  peuvent également réguler les cyclines ainsi que l'activité des kinases cycline-dépendantes (145-150).

Le rôle exact des canaux  $K^+$  dans les phénomènes de migration et de prolifération cellulaires est controversé et encore à ce jour mal connu. Pour remédier à la situation, nous avons commencé une collaboration avec le D<sup>r</sup> Richard Bertrand pour étudier le rôle des canaux  $K^+$  et de la voie EGF/EGFR dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire de l'épithélium respiratoire. Ce nouveau projet nous permettra de mieux comprendre et de déterminer le rôle exact des canaux  $K^+$  stimulés par l'EGF dans le phénomène de la prolifération et la progression du cycle cellulaire.

### **3.1) Mécanisme de couplage entre l'EGFR et les canaux $K^+$**

Notre étude nous a mené à explorer la relation entre la signalisation EGF/EGFR et les canaux  $K^+$  lors des processus de réparation épithéliale. En effet, nous avons noté dans les cellules ATII que l'expression des canaux  $K^+$  était augmentée suite à un traitement à l'EGF de 24h. La surexpression des canaux  $K^+$  suite à une stimulation à l'EGF que nous avons observé ne semble pas être due à une augmentation de la transcription, puisque les



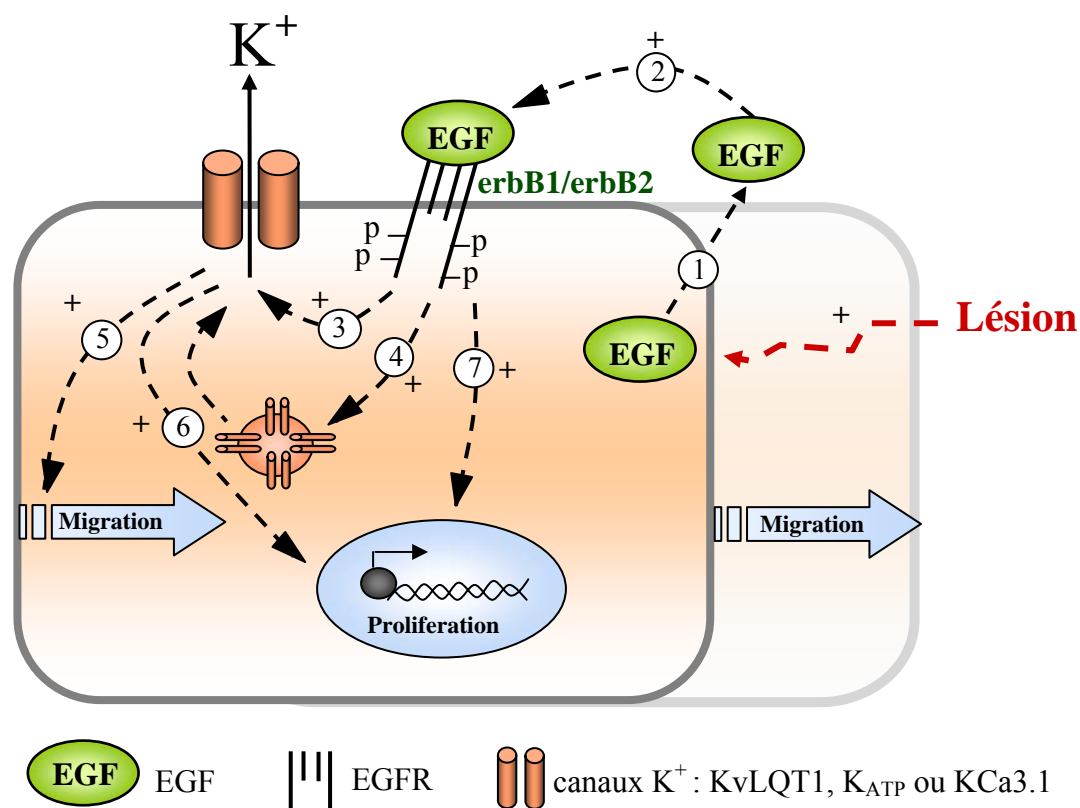
niveaux d'ARNm ne varient pas. Nous croyons plutôt que l'EGF entraînerait une augmentation de l'expression protéique et de l'adressage d'un plus grand nombre de canaux  $K^+$  à la membrane basolatérale. Ensuite, nous avons également remarqué une augmentation de l'activité des canaux  $K^+$  après une stimulation aiguë à l'EGF (10 minutes) dans les cellules alvéolaires et bronchiques. De plus, l'effet inhibiteur des modulateurs des canaux  $K^+$  était seulement observé suite à une stimulation préalable à l'EGF des processus de réparation. À la lumière de nos résultats, il semble effectivement y avoir un couplage moléculaire entre l'activation du récepteur EGFR et l'activité des canaux  $K^+$  dans les processus de réparation de l'épithélium alvéolaire et bronchique.

Dans plusieurs études, il a été rapporté l'existence d'un mécanisme de couplage entre les canaux  $K^+$  et les voies de signalisation des facteurs de croissance dans différents types cellulaires. En fait, il a été démontré que plusieurs ligands du récepteur EGFR, tels que l'EGF, le  $TGF\alpha$  et le HB-EGF, pouvaient stimuler l'activité des canaux maxi-KCa (162). Ensuite, il a été démontré que les canaux  $K^+$  sensibles à la 4-aminopyridine soumis à une stimulation à l'EGF pouvaient induire la prolifération cellulaire (163). Il a été rapporté que l'inhibition des canaux  $K^+$  dépendants du  $Ca^{2+}$  bloquerait l'hyperpolarisation membranaire induite par l'EGF nécessaire la progression du cycle cellulaire (160). En fait, il a été suggéré que l'EGF activerait les canaux  $Ca^{2+}$  indépendants du voltage stimulant à leur tour les canaux  $K^+$  dépendants du  $Ca^{2+}$ , qui sont impliqués dans l'hyperpolarisation membranaire (161). Enfin, on a montré que l'inhibition des canaux  $K^+$  dépendants du voltage, impliqués dans la progression du cycle cellulaire, entraîne une diminution de la prolifération des cellules de leucémie myéloblastique humaine médiée par l'EGF via la voie MAPK (159).

Plusieurs hypothèses ont été émises, mais le mécanisme exact de couplage au niveau moléculaire entre l'EGF et les canaux  $K^+$  dans les processus de réparation demeure encore obscur. Selon nos résultats, l'effet stimulateur de l'EGF sur les processus de réparation passerait par l'activation des canaux  $K^+$ . En fait, nous pensons que l'activation des canaux  $K^+$  serait en aval de celle du récepteur EGFR. En effet, nous suggérons qu'en plus des voies de signalisation classiques activées suite à l'activation du récepteur EGFR, l'EGF pourrait stimuler les canaux  $K^+$ , qui moduleraient les processus de réparation (**voir figure 34**). Ceux-ci contribueraient et participeraient aux phénomènes

de migration et de prolifération cellulaire (**voir section 3**), qui interviennent à leur tour dans les processus de réparation épithéliale.

L'élucidation des voies de signalisation impliquées dans le mécanisme de couplage entre l'EGF/EGFR et les canaux  $K^+$  fera l'objet d'un nouveau projet en collaboration avec le D<sup>re</sup> Isabelle Royal. Nous tenterons de découvrir par quelles voies l'activation du récepteur EGFR pourrait venir stimuler l'activité des canaux  $K^+$  afin de pouvoir mieux comprendre ce couplage moléculaire, qui selon nos résultats, serait crucial dans la modulation des processus de réparation de l'épithélium respiratoire.



**Figure 34. Modèle de couplage entre la voie EGF/EGFR et les canaux  $K^+$ .** Suite à une lésion, les cellules en réparation sécrètent de l'EGF (1), qui vient activer son récepteur (2). L'activation du récepteur enclenche les voies classiques de signalisation du EGFR (7), mais entraîne également une stimulation de l'activité (3) et de l'expression (4) de des canaux  $K^+$ . Ceux-ci interviennent ensuite dans les phénomènes de migration (5) et de prolifération cellulaire (6) impliqués dans les processus de réparation épithéliale.

### **3.2) Rôles multiples des canaux K<sup>+</sup>**

Nos résultats démontrent que les canaux K<sup>+</sup> jouent un rôle crucial dans les processus de réparation. En effet, selon nos résultats et ceux de la littérature, il a été démontré que les canaux K<sup>+</sup> sont impliqués dans les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire (**voir section 3**). Toutefois, il a été démontré que les canaux K<sup>+</sup> pouvaient également intervenir dans le phénomène d'apoptose (123, 164-166).

La prolifération dépend de l'augmentation du volume cellulaire, alors qu'on observe plutôt une diminution de celui-ci lors du phénomène d'apoptose, ce qui permet une meilleure élimination par les macrophages (164). En effet, il a été démontré que la diminution du volume cellulaire entraîne l'activation des caspases et des endonucléases ainsi que la fragmentation de l'ADN, menant directement à la mort cellulaire (165, 166). Ensuite, il semblerait que l'activation des canaux K<sup>+</sup>, tel que le Kv1.3, entraîne une réduction du volume cellulaire impliquée dans le déclenchement de l'apoptose. Cependant, il a été démontré que cette activation des canaux K<sup>+</sup> devait être combinée à un efflux de Cl<sup>-</sup> pour entraîner la mort cellulaire, puisqu'en son absence, les canaux K<sup>+</sup> activés n'occasionnaient que l'hyperpolarisation de la membrane. Il semble donc que la tendance des canaux K<sup>+</sup> à promouvoir la prolifération vs l'apoptose dépend de l'activité des autres canaux ioniques et de certaines contraintes temporelles, telles qu'un environnement favorable ou non à la survie et à la multiplication cellulaire (164).

Il semble donc exister un équilibre fragile entre des phénomènes totalement opposés, tels que la progression du cycle cellulaire et la mort cellulaire, qui sont tous modulés par l'activité des canaux K<sup>+</sup>. Toutefois, il a également été démontré que les canaux K<sup>+</sup> pouvaient stimuler ou inhiber l'apoptose tout dépendant du type cellulaire, ce qui complique un peu la compréhension du phénomène global (164). L'utilisation des modulateurs pourrait effectivement affecter les phénomènes moléculaires de façon inattendue à cause de leurs rôles à double tranchant. En effet, nous pourrions favoriser le phénomène d'apoptose au lieu de promouvoir la régénération épithéliale comme souhaité.

Il ne faut toutefois pas oublier que les canaux K<sup>+</sup> retrouvés au niveau du système respiratoire pourraient jouer d'autres rôles importants dans la physiologie pulmonaire. La littérature tout comme les autres projets menés dans le laboratoire du D<sup>re</sup> Emmanuelle

Brochiero révèlent que les canaux  $K^+$  pourraient être impliqués dans les phénomènes d'échange gazeux, de sécrétion de surfactant, de contrôle du transport transépithélial ionique et liquidien ainsi que la réponse inflammatoire.

La modulation des canaux  $K^+$  dans le but de promouvoir la régénération épithéliale pourrait possiblement entraîner des effets secondaires favorables pour la condition des patients fibrose kystique (FK), qui souffrent de défaillance respiratoire souvent causée par une destruction progressive de l'épithélium alvéolaire et bronchique. En effet, l'activation des canaux  $K^+$ , qui possèdent le rôle de senseur d' $O_2$  (117-120), pourrait possiblement aider à améliorer la fonction respiratoire des patients FK. Ensuite, une augmentation de l'activité des canaux  $K^+$ , impliqués dans la sécrétion du surfactant (122), pourrait contribuer à rétablir partiellement la fonction alvéolaire et ainsi bonifier la situation de ces patients. La pathologie de la FK est causée par l'absence du canal CFTR, c'est pourquoi la stimulation des canaux  $K^+$  pourrait créer un gradient électrochimique favorable au transport de  $Cl^-$  via des canaux  $Cl^-$  alternatifs (105, 107) dans le but de restituer partiellement l'hydratation et la fonction de l'épithélium respiratoire. Les canaux  $K^+$  peuvent également moduler la réponse inflammatoire. En effet, il a été démontré que les canaux  $K^+$  pouvaient réguler la sécrétion de TNF via les macrophages alvéolaires (128). De façon encore plus intéressante, il semblerait que l'inhibition du canal  $K_{ATP}$  pourrait prévenir l'infiltration neutrophilique (129), que l'on a décrite comme une cause importante dans les processus lésionnels de l'épithélium respiratoire (59, 62-64). Ces données suggèrent donc que l'activation des canaux  $K^+$  pourrait réguler à la baisse la réponse inflammatoire afin de limiter les lésions épithéliales et d'améliorer la condition des patients atteints de la FK.

Les canaux  $K^+$  semblent ainsi participer à plusieurs phénomènes physiologiques, mais leur rôle exact est encore mal connu. Il faudra donc mieux comprendre et avoir une meilleure image d'ensemble de leur implication dans les différents phénomènes physiologiques avant de pouvoir utiliser les modulateurs de canaux  $K^+$  pour promouvoir la réparation épithéliale chez les patients FK.

#### **4) Retard de réparation de l'épithélium FK**

En condition normale, la réparation épithéliale implique l'enclenchement de diverses voies de signalisation entraînant différents phénomènes impliqués dans les processus de réparation. Il a été proposé que la persistance des dommages de l'épithélium durant les pathologies pulmonaires soit occasionnée par une défaillance au niveau d'une ou plusieurs étapes impliquées dans les processus de réparation conduisant à une régénération épithéliale inadéquate (154).

Nos résultats suggèrent que les cellules CuFi-1 (FK) de génotype homozygote  $\Delta F508$  présente un retard de réparation possiblement causé par un défaut de la voie EGF/EGFR combinée à une activité et expression réduite des canaux  $K^+$ . En effet, nous avons d'abord noté que les cellules FK montraient un délai de réparation dans toutes les conditions comparativement aux cellules saines (NuLi-1). Ensuite, nous avons observé que les cellules FK exprimaient, à la base moins, de récepteurs erbB1 et erbB2 que les cellules saines, mais qu'ils étaient surtout moins actifs et activables. Nous avons également noté que l'activation d'erbB1 dans des cellules FK lésées était plus faible. Ensuite, sachant que les milieux conditionnés contenaient de l'EGF sécrété par les cellules en réparation (**voir section 2.1.1**), nous avons voulu comparer les niveaux d'EGF contenu dans le milieu conditionné récupéré de cellules NuLi-1 (sain) et CuFi-1 (FK) ainsi qu'évaluer leur impact sur la migration cellulaire. Nos résultats suggèrent que les cellules FK sécrètent moins d'EGF, ce qui est en accord avec la plus faible activation du récepteur EGFR observé dans les monocouches FK lésées. Ensuite, nous avons observé des courants  $K^+$  et une expression des canaux  $K^+$  plus faibles chez les cellules FK.

Notre étude suggère que l'épithélium FK ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) se répare plus lentement qu'un épithélium sain parce que les processus de réparation de l'épithélium FK seraient moins efficaces. À la lumière de nos résultats, il semblerait que ce délai de réparation est occasionné par un défaut de réponse à l'EGF, probablement en partie causé par une plus faible sécrétion d'EGF de la part des cellules en réparation et d'une activité plus faible du récepteur EGFR. Ce retard serait également occasionné par une activité et expression réduite des canaux  $K^+$ . Alors selon notre modèle (**voir figure 34**), les cellules FK ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) suite à des lésions sécréteraient moins d'EGF, qui combiné à une défaillance de l'activation du récepteur EGFR pourraient ne pas stimuler adéquatement

les canaux  $K^+$ , qui sont importants pour les phénomènes de migration et de prolifération cellulaire. Notre étude de la réparation épithéliale se limite seulement aux cellules possédant la délétion du résidu F508, les conséquences des autres types de mutations nous sont encore inconnues.

#### **4.1) Causes du retard de réparation FK**

##### **4.1.1) Différence entre les lignées cellulaires : profils génétiques**

Nous sommes conscients que le retard de réparation observé dans les cellules FK (CuFi-1) pourrait être causé par la différence des profils génétiques des patients qui sont à l'origine des lignées cellulaires NuLi-1 et CuFi-1. En effet, il se pourrait que le patient homozygote  $\Delta F508$  ait subi différents traitements thérapeutiques qui auraient pu modifier l'expression et l'activité de ses récepteurs EGFR ainsi que de ses canaux  $K^+$ . Il se pourrait également que le patient, duquel sont issues les cellules normales, ait subi ou souffert d'une autre pathologie que celle de la FK, qui aurait pu stimuler ses récepteurs EGFR ainsi que de ses canaux  $K^+$ . Il est vrai qu'il est plus ou moins incorrect de comparer deux patients ayant évidemment des profils génétiques différents, mais également un passé médical différent pour conclure que les cellules épithéliales FK montrent un délai de réparation. Cependant, l'équipe du D<sup>re</sup> Christelle Coraux a observé dans un modèle de xéno greffe humaine que les épithélia nasaux FK présentaient aussi un retard de la régénération épithéliale (82). En effet, le travail de l'équipe du D<sup>re</sup> Coraux confirme et appuie nos résultats dans lesquels nous démontrons aussi un retard de réparation dans l'épithélium FK. Leur étude suggère donc que le profil génétique derrière les lignées cellulaires que nous avons utilisées ne semble pas intervenir et influencer les résultats obtenus. Toutefois, dans leur modèle, ils suggèrent que le délai de réparation est causé par la dérégulation de la fonction des MMP, de leur inhibiteur TIMP-1 ainsi que l'IL-8 (82), alors que nous suggérons plutôt un défaut de réponse de la voie EGF/EGFR ainsi qu'une activité et expression plus faible des canaux  $K^+$ . On s'explique encore mal les causes exactes du délai de réparation observé chez les cellules FK.

#### **4.1.2) Absence du canal CFTR**

Il est évident que la différence de base entre les cellules normales et FK est l'absence du canal CFTR. En effet, un questionnement doit s'effectuer sur l'implication du canal CFTR dans le retard de réparation observé chez les cellules FK. Nous avons étudié la question et selon nos résultats, il ne semble pas que l'absence de courant  $\text{Cl}^-$ , du moins pour une période de 24h ou 48h, soit déterminante dans le défaut des processus de réparation. En fait, nous avons induit une inhibition aiguë de 24h et/ou 48h de l'activité du canal CFTR avec l'inhibiteur  $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$  dans la lignée de cellules bronchiques saines (NuLi-1). Ce traitement n'a pas affecté la refermeture des plaies mécaniques. En effet, le pourcentage de réparation des monocouches NuLi-1 en présence de l'inhibiteur  $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$  est sensiblement le même que celui des cellules NuLi-1 non traitées. Nous n'avons pas observé non plus d'impact de cet inhibiteur du CFTR sur la migration cellulaire, la sécrétion d'EGF dans les milieux conditionnés ou sur l'expression des canaux  $\text{K}^+$ . Ceci suggère que le courant  $\text{Cl}^-$  du canal CFTR n'est pas un point central dans les mécanismes de régulation des processus de réparation. Il est clair que ce traitement de courte durée avec cet inhibiteur du canal CFTR ne représente pas la réalité des patients atteints de la FK, où le canal et le courant  $\text{Cl}^-$  sont défectueux ou absents depuis la naissance. Cependant, nos résultats semblent suggérer que l'activité du canal CFTR ne semble pas être sollicitée ou nécessaire durant les processus de réparation épithéliale.

Prochainement, nous prévoyons utiliser les lignées cellulaires IB3 (cellules FK) et S9 (cellules IB3 génétiquement corrigées avec le CFTR sauvage). Des expériences de réparation épithéliale, de migration en chambre de type Boyden et des tests de prolifération cellulaire sur les cellules IB3 et S9 nous permettront de réfuter l'hypothèse que le retard de réparation serait occasionné par une différence de profil génétique, puisque les deux dérivent de la même lignée IB3. L'utilisation de ces cellules nous permettra également de vérifier si la correction de la protéine CFTR permet aux cellules FK de récupérer une capacité de réparation normale.

#### **4.1.3) Infections et inflammation chroniques**

Une conséquence directe de l'absence du canal CFTR est la persistance de la colonisation bactérienne et la réponse inflammatoire. En effet, les patients FK souffrent

fréquemment d'infections et d'inflammation chroniques. Ces phénomènes sont impliqués dans la persistance des processus lésionnels qui affectent l'épithélium respiratoire. Si les tissus FK, comme le suggèrent nos résultats, ne se réparent pas adéquatement, l'intégrité de l'épithélium respiratoire, qui constituait une barrière de défense physique, peut être perturbée. Ceci faciliterait l'accès des pathogènes aux tissus et amplifierait les processus lésionnels. On a également observé un déséquilibre des cytokines anti- et pro-inflammatoires chez les patients atteints de la FK (59, 62). En effet, il semblerait que chez les patients FK, l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire soit régulée à la baisse, alors que l'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire soit surexprimée (59, 60-63, 144). De façon intéressante, l'IL-8 est l'un des plus importants chemoattractants pour les neutrophiles (60, 62, 63, 82, 137, 144). Les neutrophiles FK possèderaient des propriétés différentes des neutrophiles normaux, c'est-à-dire qu'ils présenteraient une durée de vie prolongée (50). Ce phénomène occasionnerait une persistance des neutrophiles au niveau de l'épithélium. De plus, il semblerait que les neutrophiles FK relâchent plus d'oxydants et d'élastase lors de leur nécrose (64). Ceux-ci sont impliqués dans la dégradation des protéines structurales et causent ainsi une destruction progressive des tissus des voies aériennes et alvéolaires (59, 62-64).

Malgré la persistance de la réponse inflammatoire dans la pathologie de la FK, on aurait aussi mesuré des niveaux élevés de facteurs de croissance, tels que du TGF $\beta$ , HGF, FGF-2, FGF-7, KGF et VEGF, dans les lavages broncho-alvéolaires des patients FK (84). En dépit de ces niveaux élevés de facteurs de croissance les dommages au niveau de leur épithélium semblent persistants, ce qui cause inévitablement une destruction des tissus respiratoires. Ceci suggère donc qu'en plus d'un défaut au niveau des processus de réparation épithéliale chez les patients FK, d'autres composantes pourraient contribuer à l'exacerbation pulmonaire. En effet, il se pourrait que la défaillance de la réparation épithéliale FK, qu'une diminution de l'expression et de l'activité des récepteurs EGFR et des canaux K<sup>+</sup> soient induites par ce cycle chronique d'infection et d'inflammation. En effet, l'inflammation avait été rapportée pour moduler l'activité des canaux K<sup>+</sup> dans plusieurs différents types cellulaires (108, 125-127). Il semblerait également que l'inflammation puisse réguler l'expression du récepteur EGFR. En effet, la protéine d'interaction avec le récepteur RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*), un médiateur



important de l'inflammation et de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B dans la réponse immune, serait capable de moduler l'expression génique et protéique du récepteur EGFR (168).

Il serait important de comprendre éventuellement les conséquences secondaires au niveau moléculaire, causées par l'absence du canal CFTR, sur les tissus épithéliaux. Il semblerait que la mutation du canal CFTR pouvait perturber l'activité des canaux K<sup>+</sup> (50). Il se pourrait donc que la perte du courant Cl<sup>-</sup> et/ou de la protéine CFTR dans les cellules entraîne une régulation à la baisse de l'expression et de l'activité des canaux K<sup>+</sup> que nous avons observé dans la lignée cellulaire FK utilisée (CuFi-1). Nos résultats démontrent également que les cellules CuFi-1 sécrétaient moins d'EGF et répondaient moins bien à la stimulation de celui-ci. En effet, nous avons observé une activation plus faible des récepteurs EGFR, qui sont également moins exprimés dans les cellules CuFi-1 (FK). Ce phénomène pourrait être causé par l'absence du canal CFTR. En effet, une étude par Kelley *et al.* (2001) démontre que le récepteur Smad3 du TGF- $\beta$ 1, impliqué dans la réponse inflammatoire, est également moins exprimé dans leur modèle FK murin *in vitro* et *in vivo* (167). Il semblerait donc que le phénotype FK pourrait entraîner une régulation à la baisse de plusieurs autres récepteurs de facteurs de croissance que l'EGFR.

Afin de savoir si le retard de réparation observé chez les cellules FK serait causé par l'environnement inflammatoire et le passé médical des cellules que nous avons utilisées jusqu'à maintenant, nous avons pensé à utiliser les cellules provenant des polypes nasaux des patients atteints de la FK. En effet, grâce à cette collaboration avec le D<sup>r</sup> Yves Berthiaume nous saurons si ces paramètres peuvent influencer l'expression et l'activité du récepteur EGFR et des canaux K<sup>+</sup>. Nous tenterons également de tester l'impact de nouveaux activateurs des canaux K<sup>+</sup> sur la réparation de ces polypes nasaux en culture. Toutefois, il se pourrait qu'il existe une variation entre les patients, comme observé lors de l'établissement de la relation génotype-phénotype dans le poumon. C'est pourquoi, nous avons aussi débuté une collaboration avec le D<sup>re</sup> Christina Haston, qui nous permet de comparer les niveaux d'expression des canaux K<sup>+</sup> dans les tissus pulmonaires de souris saines et FK ( $\Delta$ F508 et/ou invalidation du gène CFTR – CFTR-

KO). Nous prévoyons éventuellement étudier les processus de réparation des cellules extraites de ces poumons ainsi que la signalisation de l'EGF.

## **Chapitre 5 – Conclusions**

L'absence du canal CFTR dans la pathologie de la fibrose kystique (FK) cause une dysfonction du transport des fluides et des ions au niveau de l'épithélium des voies aériennes. Ce phénomène entraîne la déshydratation et l'épaississement de la couche de mucus, ce qui favorise la colonisation bactérienne ainsi que la persistance de la réponse inflammatoire. Des processus lésionnels sont engendrés et causent une destruction progressive de l'épithélium respiratoire, entraînant inévitablement une défaillance respiratoire. Promouvoir la réparation épithéliale pourrait s'avérer être une nouvelle option thérapeutique pour rétablir un épithélium fonctionnel.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ma maîtrise souligne l'importance des canaux  $K^+$  dans la physiologie du système respiratoire. En effet, des études révèlent différents rôles des canaux  $K^+$ , tels que l'échange gazeux, la sécrétion de surfactant, la réponse inflammatoire, le transport transépithélial des fluides et des ions, qui pourraient s'avérer utile dans l'amélioration de la condition des patients atteints de la FK.

Notre étude a cependant permis de démontrer pour la première fois l'implication des canaux  $K^+$  dans les processus de réparation épithéliale alvéolaire et bronchique stimulée à l'EGF. Nous avons élaboré un modèle dans lequel, suite à une lésion, les cellules en réparation sécrètent de l'EGF. Celui-ci agit de façon autocrine et se lie à son récepteur EGFR pour l'activer, ce qui enclenche différentes voies de signalisation classiques. Toutefois, nos résultats démontrent pour la première fois que l'activation du récepteur EGFR stimule les processus de réparation via l'activité des canaux  $K^+$ .

Nos résultats ont démontré via l'utilisation de modulateurs pharmacologiques que les canaux  $K_{ATP}$  et  $K_vLQT1$ , qui constituaient le courant  $K^+$  basolatéral total dans les cellules épithéliales bronchiques, participaient au processus de réparation. Toutefois, nous avons également démontré l'implication d'un troisième canal dans la réparation épithéliale. En effet, il semblerait que le canal  $KCa3.1$  serait activé seulement suite à un stress comme une lésion, par exemple. Nous avons donc démontré que la combinaison des trois modulateurs avait un effet additif sur l'inhibition de la réparation épithéliale stimulée à l'EGF. En effet, comme rapporté dans plusieurs autres types cellulaires, il semblerait exister un mécanisme de couplage entre la voie EGF/EGFR et l'activation des

canaux  $K^+$  au niveau de l'épithélium respiratoire. Nos résultats ont démontré que les courants  $K^+$  étaient stimulés par l'EGF.

Un fait intéressant, nous avons remarqué que les cellules FK (CuFi-1) de génotype homozygote  $\Delta F508$  présentaient un retard de réparation. La sévérité de l'atteinte pulmonaire pourrait donc dépendre non seulement de l'apparition des lésions chez les patients atteints de la FK, mais aussi d'une défaillance dans les processus de régénération épithéliale suite à ces lésions. Nos résultats de réparation en présence d'anticorps anti-EGF, de p-EGFR et de milieux conditionnés suggèrent également que les cellules FK en réparation sécrètent moins d'EGF et que l'activation des récepteurs EGFR est plus faible. Nous avons aussi noté une expression des canaux  $K^+$  et des courants  $K^+$  plus faibles dans les cellules FK. Nous suggérons donc que ce défaut dans la voie d'activation du récepteur EGFR couplé à une défaillance au niveau des canaux  $K^+$  serait la cause du délai de réparation des cellules FK. Notre étude suggère donc que plusieurs mécanismes de régulation des processus de réparation mis en place dans l'épithélium respiratoire seraient dérégulés dans la pathologie de la FK. Pour avoir une vision plus globale des processus lésionnels et de réparation, il sera intéressant également de mieux étudier les effets de l'inflammation sur les processus de réparation.

Notre étude amène donc une toute nouvelle conception des processus de réparation de l'épithélium respiratoire. Cette étude, qui montre que le couplage de l'activité des canaux  $K^+$  et de l'EGF est crucial pour les processus de réparation au niveau des voies aériennes et des alvéoles, amène de nouvelles connaissances et ouvre à de nouvelles voies de recherche pour éventuellement permettre le développement de traitements pour promouvoir la régénération épithéliale. Cette nouvelle option thérapeutique, qui jumelée avec d'autres traitements présentement disponibles, pourrait possiblement aider et améliorer la condition des patients atteints de la FK.

## **Bibliographie**

1. Fraser RS. Histology and gross anatomy of the respiratory tract. Chapter 1 in Physiologic basis of respiratory disease. Ed: Hamid Q, Shannon J & Martin J. Hamilton Canada, BC Decker Inc. 2005, p.1-14.
2. Jonhson MD. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst.* 2007, **3**(3):178-86. Review.
3. Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, **99**(4):1966-71.
4. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res.* 2001, **2**(1):33-46. Review.
5. Pitkänen OM, Smith D, O'Brodovich H, Otulakowski G. Expression of alpha-, beta-, and gamma-hENaC mRNA in the human nasal, bronchial, and distal lung epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001, **163**(1):273-6.
6. Matsushita K, McCray PB Jr, Sigmund RD, Welsh MJ, Stokes JB. Localization of epithelial sodium channel subunit mRNAs in adult rat lung by in situ hybridization. *Am J Physiol.* 1996, **271**(2 Pt 1):L332-9.
7. Talbot CL, Bosworth DG, Briley EL, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE, Barker PM. Quantitation and localization of ENaC subunit expression in fetal, newborn, and adult mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999, **20**(3):398-406.
8. Gaillard D, Hinnrasky J, Coscoy S, Hofman P, Matthay MA, Puchelle E, Barbry P. Early expression of beta- and gamma-subunits of epithelial sodium channel during human airway development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000, **278**(1):L177-84.
9. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 1996, **12**(3):325-8.

10. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 2004, **10**(5):487-93.
11. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet.* 1992, **2**(3):240-8.
12. Ballard ST, Trout L, Bebök Z, Sorscher EJ, Crews A. CFTR involvement in chloride, bicarbonate, and liquid secretion by airway submucosal glands. *Am J Physiol.* 1999, **277**(4 Pt 1):L694-9.
13. Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM. Adrenergic regulation of ion transport across adult alveolar epithelial cells: effects on Cl<sup>-</sup> channel activation and transport function in cultures with an apical air interface. *J Membr Biol.* 2001, **181**(3):195-204.
14. Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest.* 1994, **93**(2):737-49.
15. Fang X, Song Y, Hirsch J, Galiotta LJ, Pedemonte N, Zemans RL, Dolganov G, Verkman AS, Matthay MA. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, **290**(2):L242-9.
16. Braunstein GM, Zsembery A, Tucker TA, Schwiebert EM. Purinergic signaling underlies CFTR control of human airway epithelial cell volume. *J Cyst Fibros.* 2004, **3**(2):99-117.
17. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc.* 2008, **5**(7):772-7. Review.
18. Herzog EL, Brody AR, Colby TV, Mason R, Williams MC. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc.* 2008, **5**(7):778-82. Review.
19. Berthiaume Y., Matthay MA. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007, **159**(3):350-9.
20. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch.* 2003, **445**(4):495-8. Review.

21. Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest.* 1998, **102**(6):1125-31.
22. Boucher RC. Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994, **150**(1):271-81.
23. Boucher RC. Human airway ion transport. Part two. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994, **150**(2):581-93. Review.
24. Sartori C, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J.* 2002, **20**(5):1299-313. Review.
25. Boucher RC. Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol.* 1999, **516**(Pt 3):631-8. Review.
26. Cott GR, Sugahara K, Mason RJ. Stimulation of net active ion transport across alveolar type II cell monolayers. *Am J Physiol.* 1986, **250**(2 Pt 1):C222-7.
27. Collett A, Ramminger SJ, Olver RE, Wilson SM. Beta-adrenoceptor-mediated control of apical membrane conductive properties in fetal distal lung epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, **282**(4):L621-30.
28. Blouquit S, Morel H, Hinrasky J, Naline E, Puchelle E, Chinet T. Characterization of ion and fluid transport in human bronchioles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002, **27**(4):503-10
29. Chinet T. Physiopathology of cystic fibrosis lung disease. *Rev Mal Respir.* 1999, **16**(3):339-45. Review.
30. Johnson MD, Bao HF, Helms MN, Chen XJ, Tigue Z, Jain L, Dobbs LG, Eaton DC. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, **103**(13):4964-9.
31. Shi W, Bellusci S, Warburton D. Lung development and adult lung diseases. *Chest.* 2007, **132**(2):651-6. Review.
32. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000, **342**(18):1334-49. Review.
33. Lewis JF, Veldhuizen R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu Rev Physiol.* 2003, **65**:613-42. Review.

34. Schwab A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001, **280**(5):F739-47. Review.
35. Schwab A. Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci.* 2001, **16**:29-33. Review.
36. Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax.* 1999, **54**(2):150-60.
37. Cotton CU. Basolateral potassium channels and epithelial ion transport. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000, **23**(3):270-2. Review.
38. Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X, Emtage S. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* 2004, **23**(2):282-93.
39. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999, **79**(1 Suppl):S23-45. Review.
40. McCarty NA. Permeation through the CFTR chloride channel. *J Exp Biol.* 2000, **203**(Pt 13):1947-62. Review.
41. Moran O, Galiotta LJ, Zegarra-Moran O. Binding site of activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the nucleotide binding domains. *Cell Mol Life Sci.* 2005, **62**(4):446-60.
42. Linsdell P. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol.* 2006, **91**(1):123-9. Review.
43. Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, Maloney PC, Guggino WB, Hunt JF, Emtage S. 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.* 2005, **280**(2):1346-53.



44. Stutts MJ, Boucher RC. Cystic fibrosis gene and functions of CFTR implications of dysfunctional ion transport for pulmonary pathogenesis. *Cystic Fibrosis in Adults*. 1999, pp 3-25
45. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem*. 2008, **77**:701-26. Review.
46. Schillers H. Imaging CFTR in its native environment. *Pflugers Arch*. 2008, **456**(1):163-77. Review.
47. Mornon JP, Lehn P, Callebaut I. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol Life Sci*. 2008, **65**(16):2594-612.
48. Dovey M, Wisseman CL, Roggli VL, Roomans GM, Shelburne JD, Spock A. Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1989, **21**(3):521-34.
49. Dorwart M, Thibodeau P, Thomas P. Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cyst Fibros*. 2004, **3** Suppl 2:91-4. Review.
50. McAuley DF, Elborn JS. Cystic fibrosis: basic science. *Paediatr Respir Rev*. 2000, **1**(2):93-100.
51. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2003, **9**(6):486-91. Review.
52. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2004, **23**(1):146-58.
53. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007, **13**(6):231-40.
54. Ratjen F. Recent advances in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2008, **9**(2):144-8.
55. Kulczycki LL, Kostuch M, Bellanti JA. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *Am J Med Genet A*. 2003, **116A**(3):262-7. Review.
56. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000, **67**(2):117-33. Review.
57. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 2003, **67**(Pt 5):471-85. Review.

58. Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract (Minneap)*. 1997, **32**(6):115-8, 123-9, 134, passim. Review.
59. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004, **3**(4):223-31. Review.
60. Richman-Eisenstat J. Cytokine soup: making sense of inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1996 **21**(1):3-5.
61. 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*. 2004, **31**(4):377-81. Review.
62. Kronborg G, Hansen MB, Svenson M, Fomsgaard A, Høiby N, Bendtzen 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*. 1993, **15**(5):292-7.
63. De Rose V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2002, **19**(2):333-40. Review.
64. Chmiel JF, Konstan MW. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med*. 2007, **28**(2):331-46. Review.
65. Thelin WR, Boucher RC. The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2007, **7**(3):290-5. Review.
66. Konstan MW, Davis PB. Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002, **54**(11):1409-23. Review.
67. Cantin AM. Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2004, **10**(6):531-6. Review.
68. Lim M, Zeitlin PL. Therapeutic strategies to correct malfunction of CFTR. *Paediatr Respir Rev*. 2001, **2**(2):159-64. Review.
69. Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Verghese MW, Randell SH. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004, **169**(5):645-53.

70. Bush A, Chodhari R, Collins N, Copeland F, Hall P, Harcourt J, Hariri M, Hogg C, Lucas J, Mitchison HM, O'Callaghan C, Phillips G. Primary ciliary dyskinesia: current state of the art. *Arch Dis Child*. 2007, **92**(12):1136-40. Review.
71. Pedersen M. Ciliary activity and pollution. *Lung*. 1990, **168** Suppl:368-76. Review.
72. Bertrand B, Collet S, Eloy P, Rombaux P. Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 2000, **54**(3):309-16. Review.
73. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989, **245**(4922):1066-73.
74. Hanrahan JW, Wioland MA. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc*. 2004, **1**(1):17-21.
75. Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC. The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol*. 2006, **128**(4):413-22.
76. Guggino WB, Stanton BA. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006, **7**(6):426-36.
77. Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature*. 1993, **361**(6411):467-70.
78. Meyer KC, Zimmerman JJ. Inflammation and surfactant. *Paediatr Respir Rev*. 2002, **3**(4):308-14. Review.
79. Fu LM. The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003, **7**(11):1027-32.
80. Jonard L, Banh L, Pressac M, Just J, Bahuau M. Les défensines en physiopathologie humaine = Defensins in human health and disease. *Immuno-analyse & biologie spécialisée*. 2006, **21** (6) : 342-347.
81. Ballard ST, Inglis SK. Liquid secretion properties of airway submucosal glands. *J Physiol*. 2004, **556**(Pt 1):1-10. Review.

82. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol.* 2007, **211**(3):340-50.
83. Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Repair and regeneration of the airway epithelium *Med Sci (Paris).* 2005, **21**(12):1063-9. Review.
84. Shute J, Marshall L, Bodey K, Bush A. Growth factors in cystic fibrosis - when more is not enough. *Paediatr Respir Rev.* 2003, **4**(2):120-7. Review.
85. Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science.* 1991, **251**(4994):679-82.
86. Bear CE, Duguay F, Naismith AL, Kartner N, Hanrahan JW, Riordan JR. Cl-channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem.* 1991, **266**(29):19142-5.
87. Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, Collins FS. Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1991, **254**(5039):1797-9.
88. Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation-regulated Cl- channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature.* 1991, **352**(6336):628-31.
89. Pasyk S, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease. *Biochem J.* 2009, **418**(1):185-90.
90. Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J.* 2007, **406**(2):257-63.
91. Randak CO, Welsh MJ. Adenylate kinase activity in ABC transporters. *J Biol Chem.* 2005, **280**(41):34385-8. Review.
92. Thibodeau PH, Brautigam CA, Machius M, Thomas PJ. Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. *Nat Struct Mol Biol.* 2005, **12**(1):10-6.

93. Cui L, Aleksandrov L, Chang XB, Hou YX, He L, Hegedus T, Gentzsch M, Aleksandrov A, Balch WE, Riordan JR. Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J Mol Biol.* 2007, **365**(4):981-94.
94. Baker JM, Hudson RP, Kanelis V, Choy WY, Thibodeau PH, Thomas PJ, Forman-Kay JD. CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol.* 2007, **14**(8):738-45.
95. Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 1987, **237**:749-53.
96. Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl<sup>(-)</sup> secretion in human airway epithelia. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* 2000, **23**:283-9.
97. Demolombe S, Franco D, de Boer P, Kuperschmidt S, Roden D, Pereaon Y, Jarry A, Moorman AF, Escande D. Differential expression of KvLQT1 and its regulator Isk in mouse epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **280**:C359-C372.
98. Cowley EA, Linsdell P. Characterization of basolateral K<sup>+</sup> channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* 2002; **538**:747-57.
99. Bernard K, Bogliolo S, Soriani O, Ehrenfeld J. Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *J Membr. Biol* 2003, **196**:15-31.
100. Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 2006, **291**:L1207-L1219.
101. Moser SL, Harron SA, Crack J, Fawcett JP, Cowley EA. Multiple KCNQ potassium channel subtypes mediate basal anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3. *J Membr. Biol.* 2008, **221**:153-63.
102. O'Grady SM, Lee SY. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 2003, **284**:L689-L700.

103. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J et al. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann.N.Y.Acad Sci* 1999, **868**:233-85.
104. DeCoursey TE, Jacobs ER, Silver MR. Potassium currents in rat type II alveolar epithelial cells. *J Physiol* 1988, **395**:487-505.
105. 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* 2003, **53**:608-18.
106. Thompson-Vest N, Shimizu Y, Hunne B, Furness JB. The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J Anat.* 2006, **208**:219-29.
107. 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* 2000, **279**:C461-C479.
108. Dulong S, Bernard K, Ehrenfeld J. Enhancement of P2Y6-induced Cl<sup>-</sup> secretion by IL-13 and modulation of SK4 channels activity in human bronchial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007, **20**:483-94.
109. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function in transepithelial transport of K<sub>(ATP)</sub> channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2004, **286**:L1027-L1037.
110. Ridge FP, Duszyk M, French AS. A large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in a human lung epithelial cell line (A549). *Biochim.Biophys.Acta* 1997, **1327**:249-58.
111. Kunzelmann K, Pavenstädt H, Beck C, Unal O, Emmrich P, Arndt HJ, Greger R. Characterization of potassium channels in respiratory cells. I. General properties. *Pflugers Arch.* 1989, **414**:291-6.
112. Monaghan AS, Baines DL, Kemp PJ, Olver RE. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents of alveolar type II cells isolated from fetal guinea-pig lung: regulation by G protein- and Mg<sup>2+</sup>-dependent pathways. *Pflugers Arch.* 1997, **433**:294-303.
113. Doring F, Derst C, Wischmeyer E et al. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci.* 1998, **18**:8625-36.

114. Plummer HK, III, Dhar MS, Cekanova M, Schuller HM. Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines. *BMC.Cancer* 2005, **5**:104.
115. Inglis SK, Brown SG, Constable MJ, McTavish N, Olver 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* 2007, **292**:L1304-L1312.
116. Davis KA, Cowley EA. Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflugers Arch.* 2006, **451**:631-41.
117. Kemp PJ, Lewis A, Hartness ME et al. Airway chemotransduction: from oxygen sensor to cellular effector. *Am J Respir.Crit Care Med.* 2002, **166**:S17-S24.
118. O'Grady SM, Lee SY. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem.Cell Biol* 2005, **37**:1578-94.
119. Lopez-Barneo J, del Toro R, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Saenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl.Physiol* 2004, **96**:1187-95.
120. Lewis A, Peers C, Ashford ML, Kemp PJ. Hypoxia inhibits human recombinant large conductance, Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>(+)</sup> (maxi-K) channels by a mechanism which is membrane delimited and Ca<sup>(2+)</sup> sensitive. *J Physiol* 2002, **540**:771-80.
121. Haller T, Auktor K, Frick M, Mair N, Dietl P. Threshold calcium levels for lamellar body exocytosis in type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1999, **277**:L893-L900.
122. Wadsworth SJ, Chander A. H<sup>+</sup>-and K<sup>+</sup>-dependence of Ca<sup>2+</sup> uptake in lung lamellar bodies. *J Membr.Biol.* 2000, **174**:41-51.
123. Wang Z. Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch.* 2004, **448**:274-86.
124. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999, **(6)**:637-43. Review.
125. Jin X, Malykhina AP, Lupu F, Akbarali HI. Altered gene expression and increased bursting activity of colonic smooth muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2004, **287**:G274-G285.

- 126.** Lu G, Mazet B, Sun C, Qian X, Johnson CP, Adams MB, Roman RJ, Sarna SK. Inflammatory modulation of calcium-activated potassium channels in canine colonic circular smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1999, **116**:884-92.
- 127.** El Ani D, Zimlichman R. TNF $\alpha$  stimulated ATP-sensitive potassium channels and attenuated deoxyglucose and Ca uptake of H9c2 cardiomyocytes. *Ann.N.Y.Acad Sci* 2003, **1010**:716-20.
- 128.** Maruyama N, Kakuta Y, Yamauchi K, Ohkawara Y, Aizawa T, Ohru T, Nara M, Oshiro T, Ohno I, Tamura G, et al. Quinine inhibits production of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages. *Am J Respir.Cell Mol.Biol.* 1994, **10**:514-20.
- 129.** Pompermayer K, Amaral FA, Fagundes CT, Vieira AT, Cunha FQ, Teixeira MM, Souza DG. Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Eur.J Pharmacol.* 2007, **556**:215-22.
- 130.** Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K<sup>+</sup> channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* 2006, **61**:880-5.
- 131.** Sakuma T, Takahashi K, Ohya N, Nakada T, Matthay MA. Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol Toxicol.* 1998, **83**:16-22.
- 132.** Wallace WA, Fitch PM, Simpson AJ, Howie SE. Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point. *Int J Exp Pathol.* 2007, **88**(2):103-10. Review.
- 133.** Watelet JB, Van Zele T, Gjomarkaj M, Canonica GW, Dahlen SE, Fokkens W, Lund VJ, Scadding GK, Mullol J, Papadopoulos N, Bonini S, Kowalski ML, Van Cauwenberge P, Bousquet J; GA(2)LEN Workpackage Members 2.7. Tissue remodelling in upper airways: where is the link with lower airway remodelling? *Allergy.* 2006, **61**(11):1249-58. Review.
- 134.** 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**(1):208-29. Review.



135. Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C. Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch.* 2007, **453**(4):421-32. Review
136. de Bentzmann S, Roger P, Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J.* 1996, **9**(10):2145-50. Review.
137. Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J.* 2008, **32**(4):1068-81.
138. Portnoy J, Pan T, Dinarello CA, Shannon JM, Westcott JY, Zhang L, Mason RJ. Alveolar type II cells inhibit fibroblast proliferation: role of IL-1 $\alpha$ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, **290**(2):L307-16.
139. Howat WJ, Holgate ST, Lackie PM. TGF- $\beta$  isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, **282**(1):L115-23.
140. Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Med Wkly.* 2003, **22**;133(43-44):586-90. Review.
141. Vermeer PD, Harson R, Einwalter LA, Moninger T, Zabner J. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003, **28**(3):286-95.
142. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008, **214**(2):199-210. Review.
143. 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.* 2004, **5** Suppl A:S35-40. Review.
144. Kube D, Sontich U, Fletcher D, Davis PB. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001, **280**(3):L493-502.
145. Villalonga N, Martínez-Mármol R, Roura-Ferrer M, David M, Valenzuela C, Soler C, Felipe A. Cell cycle-dependent expression of Kv1.5 is involved in myoblast proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 2008, **1783**(5):728-36.
146. Wonderlin WF, Woodfork KA, Strobl JS. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *J Cell Physiol.* 1995, **165**(1):177-85.

147. Mifune M, Ohtsu H, Suzuki H, Frank GD, Inagami T, Utsunomiya H, Dempsey PJ, Eguchi S. Signal transduction of betacellulin in growth and migration of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004, **287**(3):C807-13.
148. Wang SP, Wang JA, Luo RH, Cui WY, Wang H. Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible roles in cell proliferation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008, **35**(9):1077-84.
149. Woodfork KA, Wonderlin WF, Peterson VA, Strobl JS. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J Cell Physiol.* 1995, **162**(2):163-71.
150. Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, **99**(4):2350-5.
151. Kukavica-Ibrulj I, Levesque RC. Animal models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: useful tools for cystic fibrosis studies. *Lab Anim.* 2008, **42**(4):389-412. Review.
152. Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB Jr, McLennan G, Meyerholz DK, Namati E, Ostedgaard LS, Prather RS, Sabater JR, Stoltz DA, Zabner J, Welsh MJ. The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008, **295**(2):L240-63. Review.
153. Booth BW, Adler KB, Bonner JC, Tournier F, Martin LD. 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.* 2001, **25**(6):739-43.
154. Allahverdian S, Harada N, Singhera GK, Knight DA, Dorscheid DR. Secretion of IL-13 by airway epithelial cells enhances epithelial repair via HB-EGF. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008, **38**(2):153-60.
155. Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J.* 2000, **14**(10):1362-74.

156. Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol.* 2009, **218**(3):460-6. Review.
157. Van Winkle LS, Isaac JM, Plopper CG. Distribution of epidermal growth factor receptor and ligands during bronchiolar epithelial repair from naphthalene-induced Clara cell injury in the mouse. *Am J Pathol.* 1997, **151**(2):443-59.
158. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007, **293**(3):L525-34. Review.
159. Xu D, Wang L, Dai W, Lu L. 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.* 1999, **94**(1):139-45.
160. Enomoto K, Cossu MF, Maeno T, Edwards C, Oka T. Involvement of the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel activity in the hyperpolarizing response induced by epidermal growth factor in mammary epithelial cells. *FEBS Lett.* 1986, **203**(2):181-4.
161. Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, de Laat SW. Epidermal growth factor-activated calcium and potassium channels. *J Biol Chem.* 1991, **266**(30):19938-44.
162. Ivanov A, Gerzanich V, Ivanova S, Denhaese R, Tsybalyuk O, Simard JM. Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle. *J Physiol.* 2006, **570**(Pt 1):73-84.
163. Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L. Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. *J Membr Biol.* 2003, **196**(1):41-50.
164. Lang F, Föllner M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol.* 2005, **205**(3):147-57. Review.
165. Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martínez-Mármol R, Solé L, Ferreres JC, Condom E. Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer Detect Prev.* 2006, **30**(4):375-85. Review.

166. Remillard CV, Yuan JX. Activation of K<sup>+</sup> channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004, **286**(1):L49-67. Review.
167. Kelley TJ, Elmer HL, Corey DA. Reduced Smad3 protein expression and altered transforming growth factor-beta1-mediated signaling in cystic fibrosis epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001, **25**(6):732-8.
168. Ramnarain DB, Paulmurugan R, Park S, Mickey BE, Asaithamby A, Saha D, Kelliher MA, Mukhopadhyay P, Banani F, Madden CJ, Wright PS, Chakravarty S, Habib AA. RIP1 links inflammatory and growth factor signaling pathways by regulating expression of the EGFR. *Cell Death Differ*. 2008, **15**(2):344-53.
169. Shepard HM, Brdlik CM, Schreiber H. Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest*. 2008, **118**(11):3574-81. Review.
170. Kunzelmann K, Schreiber R. CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol*. 1999, **168**(1):1-8. Review.
171. Manukyan M, Nalbant P, Luxen S, Hahn KM, Knaus UG. RhoA GTPase activation by TLR2 and TLR3 ligands: connecting via Src to NF-kappa B. *J Immunol*. 2009, **182** (6):3522-9.
172. Chang W, Chen J, Schlueter CF, Hoyle GW. Common pathways for activation of proinflammatory gene expression by G protein-coupled receptors in primary lung epithelial and endothelial cells. *Exp Lung Res*. 2009, **35** (4):324-43.
173. Chaturvedi A, Pierce SK. How Location Governs Toll-Like Receptor Signaling. *Traffic*. 2009 Mar 17. [Epub ahead of print]
174. Lattin J, Zidar DA, Schroder K, Kellie S, Hume DA, Sweet MJ. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007, **82** (1):16-32. Review.
175. Hollande E, Cantet S, Ratovo G, Daste G, Brémont F, Fanjul M. Growth of putative progenitors of type II pneumocytes in culture of human cystic fibrosis alveoli. *Biol Cell*. 2004, **96** (6):429-41.