

Université de Montréal

Régulation des processus de réparation de l'épithélium bronchique
sain et Fibrose Kystique par le TNF- α

Par :

Émilie Maillé

Département de Physiologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es science (M.Sc.)
en Physiologie option Physiologie et biophysique moléculaire

Juillet 2011

© Émilie Maillé, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Régulation des processus de réparation de l'épithélium bronchique
sain et Fibrose Kystique par le TNF- α

Présenté par :
Émilie Maillé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Céline Bergeron

Présidente-rapporteuse

Dre Emmanuelle Brochiero

Directrice de recherche

Dre Nathalie Grandvaux

Codirectrice de recherche

Dr André Dagenais

Membre du jury

Résumé:

La Fibrose Kystique, causée par des mutations du canal CFTR, mène à la dysfonction du transport des fluides et des ions causant la déshydratation du liquide de surface des voies aériennes et ainsi une défaillance de la clairance mucociliaire. Ce défaut entraîne l'accumulation et l'épaississement du mucus au niveau des bronches qui devient alors un environnement idéal pour le développement d'infections chroniques et d'inflammation qui sont associées à la destruction progressive de l'épithélium chez les patients Fibrose Kystique. Même si leur rôle dans les processus lésionnels est très bien connu, l'impact de médiateurs inflammatoires sur la capacité de réparation ne l'est cependant pas. L'objectif de ma maîtrise était donc d'étudier la régulation des mécanismes de réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique par le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , une cytokine pro-inflammatoire cruciale dans l'initiation et la propagation de la réponse inflammatoire chez les patients FK.

À l'aide d'un modèle de plaies mécaniques, nous avons montré que le TNF- α stimule la réparation de l'épithélium bronchique sain (NuLi-1) et Fibrose Kystique (CuFi-1). De façon surprenante, l'exposition chronique au TNF- α augmente cette stimulation tout comme le taux de migration cellulaire pendant la réparation. Cette augmentation de réparation semble être médiée par l'activation de la métalloprotéinase MMP-9, la relâche d'EGF par les cellules épithéliales et ainsi l'activation de la voie d'EGFR. De plus, l'activation de la réparation par le TNF- α semble aussi impliquer l'activation des canaux K^+ , dont nous avons démontré le rôle important dans la réparation. Contrairement à son effet sur la migration cellulaire et sur la réparation, le TNF- α diminue la prolifération cellulaire.

En somme, en plus de son rôle dans les processus lésionnels, le TNF- α semble avoir un rôle complexe dans les processus de réparation puisqu'il stimule la migration et ralentit la prolifération cellulaire.

Mots clés :

Inflammation, voies respiratoires, canaux potassiques (K_vLQT1 , K_{ATP}), EGFR, MMP

Abstract:

Cystic fibrosis (CF) pathology, caused by mutations of *cftr* gene, leads to ion and fluid transport dysfunction that results in mucus thickening and accumulation in the airways. This mucus accumulation promotes bacterial infection and airway inflammation associated with progressive airway epithelial damage in CF patients, unfortunately leading to respiratory failure. However, the effect of inflammatory products on the repair capacity of respiratory epithelia is unclear. Thus, the objective of my project was to study the regulation of normal and CF bronchial epithelial repair mechanisms by tumor necrosis factor-alpha (TNF)- α , a major component of inflammation initiation and propagation in CF.

With a wound healing model, we observed that TNF- α stimulated the non-CF (NuLi-1) and CF (CuFi-1) bronchial wound healing rate. Surprisingly, chronic exposure to TNF- α enhanced this stimulation as well as the migration rate during repair. This wound healing rate stimulation by TNF- α seems to be due to metalloproteinase MMP-9 activation, EGF shedding by epithelial cells and subsequent EGFR transactivation. Furthermore, we recently reported a crucial relationship between the EGF response and K⁺ channel function, both controlling bronchial repair. We now show that TNF- α wound healing stimulation also implicated KvLQT1 and K_{ATP} currents activation. In contrast to its effect on cell migration, TNF- α downregulate cell proliferation.

Thus, in addition to its recognized role in the inflammatory response leading to epithelial injury, TNF- α could exert complex actions on repair mechanisms of CF airway epithelia by upregulating cell migration while downregulating proliferation.

Keywords:

Airways, inflammation, K⁺ channels (KvLQT1, K_{ATP}), EGFR, MMP

Table des Matières

Résumé	p. iii
Abstract	p. iv
Liste des figures	p. viii
Liste des sigles et abréviations	p. ix
Remerciements	p. xv
Chapitre 1 : Introduction	p. 1
1. Anatomie et histologie du système respiratoire	p. 1
1.1. Le système respiratoire supérieur	p. 2
1.2. Le système respiratoire inférieur	p. 2
1.2.1 La zone de conduction	p. 2
1.2.1.1 Les cellules ciliées	p. 5
1.2.1.2 Les cellules muqueuses	p. 5
1.2.1.3 Les cellules basales	p. 5
1.2.1.4 Les cellules de Clara	p. 6
1.2.2 La zone respiratoire	p. 6
1.2.2.1 Les cellules alvéolaires de type I	p. 7
1.2.2.2 Les cellules alvéolaires de type II	p. 8
2. Physiologie de l'épithélium pulmonaire	p. 9
2.1. Le transport des ions et des fluides	p. 10
2.1.1. Le canal sodique ENaC	p. 10
2.1.2. Le canal chlore CFTR	p. 12
2.1.3. Les canaux potassiques	p. 14
2.2. Les mécanismes de défense	p. 16
2.2.1. La clairance mucociliaire	p. 17
2.2.2. La réponse immunitaire et inflammatoire	p. 19
2.2.2.1. La réponse immunitaire innée	p. 20
2.2.2.2. La réponse immunitaire adaptative	p. 21
2.2.3. La régénération épithéliale	p. 22
2.2.3.1. Causes et conséquences des lésions épithéliales	p. 22

2.2.3.2. Processus de réparation épithéliale	p. 23
2.2.3.3. Régulation de la régénération épithéliale	p. 27
2.2.3.3.1. Rôle des facteurs solubles dans la régénération épithéliale	p. 27
2.2.3.3.2. Rôle des récepteurs membranaires dans la régénération épithéliale : exemple du récepteur EGFR	p. 29
2.2.3.3.3. Rôle des canaux ioniques dans la régénération épithéliale	p. 31
2.2.3.4. Fibrose et remodelage épithélial	p. 33
3. Pathologie de la Fibrose Kystique	p. 35
3.1. Classes de mutations du gène <i>cftr</i>	p. 36
3.1.1. Mutations de classe I : ARN tronqué	p. 36
3.1.2. Mutations de classe II : Dégradation de la protéine mal repliée ...	p. 37
3.1.3. Mutations de classe III : Mauvaise régulation du canal	p. 38
3.1.4. Mutations de classe IV : Réduction d'activité du canal	p. 38
3.1.5. Mutations de classe V : Défaut de stabilité de l'ARN	p. 38
3.2. Relation génotype-phénotype	p. 39
3.3. Pathologie pulmonaire	p. 40
3.3.1. Dysfonction du transport des fluides et des ions	p. 40
3.3.2. L'infection et l'inflammation reliées à la Fibrose Kystique	p. 42
3.3.3. Lésions et remodelage associés à la Fibrose Kystique	p. 45
3.3.4. Défaut de régénération de l'épithélium Fibrose Kystique	p. 45
3.4. Thérapies et traitements de la Fibrose Kystique	p. 46
3.4.1. Viscosité du mucus	p. 47
3.4.2. Infections en antibiotiques	p. 47
3.4.3. Inflammation et anti-inflammatoires	p. 48
3.4.4. Défaut de base et thérapies géniques	p. 49
3.4.5. Stratégies alternatives	p. 49
3.4.6. Transplantation	p. 51

Chapitre 2 : Hypothèses de travail	p. 52
Chapitre 3 : Résultats publiés et contribution à l'article	p. 54
1. Regulation of normal and cystic fibrosis bronchial epithelial repair processes by TNF- α after injury.....	p. 56
Chapitre 4: Discussion et perspectives	p. 94
1. Modèle de plaies mécanique.....	p. 94
Limitation du modèle de plaies mécaniques	p. 95
Limitation du modèle au niveau des processus de réparation ...	p. 96
Limitation du modèle au niveau de l'environnement cellulaire	p. 97
Modèles alternatifs pour étudier la réparation	p. 98
2. Limitation des expériences de prolifération cellulaire	p. 99
3. L'inflammation dans la régénération épithéliale	p. 100
3.1. Effet du TNF- α sur l'activation des MMPs	p. 101
3.2. Effet du TNF- α sur la transactivation du récepteur EGFR	p. 102
3.3. Effet du TNF- α sur l'activation des canaux potassiques	p. 104
3.4. Limitation de l'effet des différents inhibiteurs utilisés dans les essais de réparation	p. 107
4. Retour sur les thérapies anti-inflammatoires utilisées en Fibrose Kystique ...	p. 107
5. Hypothèses du défaut de régénération en Fibrose Kystique	p. 108
5.1. Responsabilité du CFTR dans le défaut de régénération de l'épithélium bronchique FK	p. 109
5.2. Rôle de l'infection et de l'inflammation chronique dans le défaut de régénération de l'épithélium bronchique FK	p. 110
Chapitre 5 : Conclusion	p. 113
Références	p. 114

Liste des figures

Figure 1: Représentation du système respiratoire	p. 1
Figure 2: Arbre bronchique	p. 3
Figure 3: Évolution histologique de l'épithélium pulmonaire	p. 4
Figure 4: Histologie de l'épithélium de la zone de conduction	p. 4
Figure 5: Structure de l'épithélium alvéolaire	p. 7
Figure 6: Représentation du transport ionique de l'épithélium des voies aériennes et alvéolaire	p. 9
Figure 7: Représentation schématique du canal ENaC	p. 11
Figure 8: Représentation du canal CFTR	p. 13
Figure 9: Canaux potassiques de l'épithélium pulmonaire	p. 15
Figure 10: Mouvement ciliaire	p. 18
Figure 11: Réponse immunitaire	p. 19
Figure 12: Processus de réparation	p. 24
Figure 13: Activation et voie de signalisation du récepteur EGFR	p. 31
Figure 14: Modèle du rôle des mécanismes de transport ionique dans le processus de migration cellulaire	p. 32
Figure 15: Mutation du CFTR	p. 36
Figure 16: Conséquences de la mutation $\Delta F508$	p. 37
Figure 17: Transport ionique des voies aériennes saines et Fibrose Kystique	p. 41
Figure 18: Représentation schématique de l'impact du TNF- α sur l'activation de la voie de signalisation EGF/EGFR	p. 104
Figure 19: Représentation schématique de l'impact du TNF- α sur la régulation des processus de réparation de l'épithélium sain et Fibrose Kystique	p. 106

Liste des sigles et abréviations

4-PBA: 4-phénylbutyrate de sodium

ΔF508: délétion du résidu phénylalanine 508

ABC: cassette liant l'ATP (*ATP nucleotide binding cassette*)

ADAM: domaine désintégrine et métalloprotéase (*a disintegrin and metalloprotease domain*)

ADN: acide désoxyribonucléique

ADO: adénosine

ADP: adénosine diphosphate

AHL: lactones homosérines acylées (*acyl homoserine lactone*)

AKT: sérine/thréonine protéine kinase aussi appelé PKB (protéine kinase B)

AMP: adénosine monophosphate

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

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

AQP: aquaporine

ARDS: syndrome de détresse respiratoire aiguë (*acute respiratory distress syndrome*)

ARN: acide ribonucléique

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

ATI: cellule alvéolaire de type I

ATII: cellule alvéolaire de type II

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: hydrolase d'ATP

BAL: lavage broncho-alvéolaire (*broncho-alveolar lavage*)

BK: bradikinine

Ca²⁺: ion calcium

CaCC (canal): canal chlore activé par le calcium (*calcium-activated chloride channel*)

CCL20: ligand de chémokine à motif C-C 20 (*Chemokine (C-C motif) ligand 20*)

CCR: récepteur de chémokine à motif C-C (*Chemokine C-C motif receptor*)

CC(X): protéines spécifiques aux cellules de Clara (*Clara cell-specific protein*)

CD-(X): pôle de différenciation (*cluster of differentiation*)

CFTR: régulateur transmembranaire Fibrose Kystique (*cystic fibrosis transmembrane regulator*)

CK: caséine kinase

Cl⁻: ion chlorure

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

CNG (canal): canal sensible aux nucléotides cycliques (*cyclic nucleotide-gated channel*)

CpG: cytosine polyguanine

CPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

C-terminal: carboxy-terminal

CuFi (cellule): cellules fibrose kystique de l'université d'Iowa (*cystic fibrosis university of iowa*)

CXCR: récepteur de chémokine à motif CXC (*Chemokine CXC motif receptor*)

D (acide aminé): acide aspartique

DC: cellules dendritiques (*dendritic cell*)

DNase: désoxyribonucléase

E (acide aminé): acide glutamique

E-cadhérine: cadhérine des cellules épithéliales

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

EGFR ou erbB: récepteur de facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor*)

EMT: Transition épithéliale-mésenchymateuse (*epithelial-mesenchymal transition*)

ENaC: canal sodique épithélial (*epithelial Na⁺ channel*)

ERK: kinase régulée par un signal extracellulaire (*extracellular signal-regulated kinase*)

F (acide aminé): phénylalanine

FEV: volume expiratoire forcé (*forced expiratory volume*)

FGF: facteur de croissance de fibroblaste (*fibroblast growth factor*)

FK: Fibrose Kystique

G (acide aminé): glycine

GM-CSF: facteur stimulant la colonisation de granulocyte-macrophage (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GPCR: récepteurs couplés aux protéines G (*G protein coupled receptor*)

H (acide aminé): histidine

H⁺: proton

H₂O: eau

HBE (cellule): cellule épithéliale bronchique humaine (*human bronchial epithelial cell*)

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

HCO₃⁻: anion bicarbonate

HGF: facteur de croissance d'hépatocyte (*hepatocyte growth factor*)

HSC (canal): canal cationique hautement sélectif (*highly selective cation channel*)

HSC: protéine de choc thermique apparentée (*heat shock cognate protein*)

HSP: protéine de choc thermique (*heat shock protein*)

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

IFN: interférons

Ig: immunoglobuline

IGFBP: protéine fixant le facteur de croissance insulin-like (*insulin-like growth factor binding protein*)

IL: interleukine

IRAK-4: kinase associée au récepteur de l'IL-1 (*IL-1R-associated kinase 4*)

IRAP: antagoniste du récepteur à l'interleukine 1 (*interleukin-1 receptor antagonist protein*)

- IRF:** facteur de régulation des interférons (*interferon regulatory factor*)
- IκB:** protéine inhibitrice de κB (*inhibitory protein-kappa B*)
- K⁺:** ion potassium
- K_{ATP} (canal):** canal potassique sensible à l'ATP
- Kb:** kilobase
- KCa (canal):** canal potassique activé par le calcium
- KDa:** kilodalton
- KGF:** facteur de croissance des kératinocytes (*keratinocyte growth factor*)
- Kir (canal):** canal potassique à rectification interne
- Kv (canal):** canal potassique dépendant du voltage
- L (acide aminé):** leucine
- LL-37:** cathélicidines
- LPS:** lipopolysaccharides
- LRR:** séquences riches en leucine (*leucine-rich region*)
- LTB₄:** leucotriène B₄
- MAPK:** protéine kinase mitogène-activée (*mitogen activated protein kinase*)
- MCP-1:** protéine chimiotactique de monocytes (*monocyte chemoattractant protein-1*)
- MMP:** métalloprotéinase matricielle (*matrix metalloproteinase*)
- MPOC:** maladie pulmonaire obstructive chronique
- MSD:** domaine transmembranaire (*membrane spanning domain*)
- MyD88:** facteur de différenciation de myéline 88 (*myeloid differentiation factor 88*)
- Na⁺:** ion sodique
- NaCl:** chlorure de sodium
- NADPH:** nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- Na⁺K⁺ATPase:** pompe sodium/potassium
- NBD:** domaine de fixation de nucléotides (*nucleotide binding domain*)
- NEB:** corps neuro-épithélial (*neuro-epithelial body*)

- NFκB:** facteur nucléaire kappa B (*nuclear factor-kappa B*)
- NHE:** échangeur sodium-proton (*Na⁺/H⁺ exchanger*)
- NHERF:** facteur régulateur de l'échangeur sodium/proton (*Na⁺/H⁺-exchange regulator factor*)
- NK (cellule):** cellule tueuse naturelle (*natural killer*)
- NLR:** récepteur NOD-like (*NOD-like receptor*)
- NOD:** domaine d'oligomérisation fixant des nucléotides (*nucleotide-binding oligomerization domain*)
- NSAID:** anti-inflammatoire non-stéroïdien (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)
- NSC:** canal cationique non-sélectif (*non-selective cation channel*)
- N-terminal:** amino-terminal
- NuLi (cellule):** cellules pulmonaires normales de l'université d'Iowa (*normal lung university of Iowa*)
- P (acide aminé):** proline
- P₂Y₂:** purinorécepteur
- PA:** *Pseudomonas aeruginosa*
- PI3K:** kinase 3-phosphatidylinositol (*phosphatidylinositol 3-kinase*)
- PAMP:** motif moléculaire associé aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*)
- PCL:** liquide périciliaire (*periciliary liquid*)
- PDGF:** facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*)
- pEGFR:** récepteur de facteur de croissance épidermique phosphorylé
- PLC:** phospholipase C
- PGE₂:** prostaglandine 2
- PKA:** protéin kinase A
- PRR:** récepteur de reconnaissance de structures conservées (*pattern recognition receptor*)
- PO₂:** pression partielle d'oxygène
- PTB:** motif protéique fixant les tyrosines phosphorylées (*phospho-tyrosine binding*)

O₂: oxygène

Q (acide amine): glutamine

R: régulateur (*regulatory*)

R (acide amine): arginine

RIG-I: gène inductible par l'acide rétinoïque 1 (*retinoic acid inducible gene 1*)

RLR: récepteur RIG-like (*RIG-like receptor*)

ROS: espèce réactive oxygénée (*reactive oxygen species*)

RNS: espèce réactive nitrogenée (*reactive nitrogen species*)

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

S (acide amine): sérine

SH2: motif protéique homologue à Src (*Src homology 2*)

siRNA: petit ARN interférant (*small interfering RNA*)

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

Th: lymphocyte auxiliaire (*T-helper*)

TIMP-1: inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase 1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*)

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

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

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

W (acide aminé): tryptophane

Y (acide aminé): tyrosine

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury, le Dre Céline Bergeron et le Dr André Dagenais, pour avoir gentiment accepté d'évaluer mon mémoire.

De plus, ce projet n'aurait pu se réaliser sans le support et l'aide de ma directrice de recherche, le Dre Emmanuelle Brochiero qui dès le début a cru à mon potentiel. Elle m'a accueillie dans son laboratoire lorsque j'étais au baccalauréat et depuis elle a su m'encourager à mieux connaître le monde de la recherche scientifique et à repousser mes propres limites.

L'ambiance du laboratoire n'aurait pas été aussi agréable sans la présence de mes collègues de travail. Anik, tu es toujours là pour aider et ta bonne humeur est contagieuse. Merci pour ton aide et pour avoir rendu mes journées au laboratoire aussi plaisantes. Thu Ngan, tu as été là pour moi dès le début en me prenant sous ton aile pendant mon premier stage. Depuis, tu as su m'aider et m'encourager à continuer. Merci pour tes bons conseils et pour ton amitié. Olivier, pour ton esprit taquin et ton sens de l'humour, merci! J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi.

C'est grâce à ma famille si je suis la personne que je suis maintenant. Vous avez été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments et vous me soutenez depuis toujours dans tout ce que j'entreprends, merci de tout cœur pour tout. Finalement, Joël, mon amour, merci pour ta présence et ton soutien durant la dernière année, cela signifie beaucoup pour moi.

Chapitre 1 : Introduction

1. Anatomie et histologie du système respiratoire

La respiration est essentielle à la vie et est assurée par le système respiratoire qui s'étend des fosses nasales à la partie la plus distale des poumons. En effet, l'air s'introduit par le nez ou la bouche et est ensuite acheminé vers le pharynx et le larynx. L'air se dirige dans la trachée qui se divise ensuite en deux bronches principales, puis en bronches lombaires (secondaires) et segmentaires (tertiaires). Les deux poumons, droits et gauches, sont enveloppés d'une fine membrane de tissus conjonctifs qui s'étend jusqu'au parenchyme divisant les poumons en différents lobes; soit en trois lobes pour le poumon droit et en deux lobes pour le poumon gauche. Ce système respiratoire est divisé en deux parties : le système respiratoire supérieur et inférieur (1) (**figure 1**).

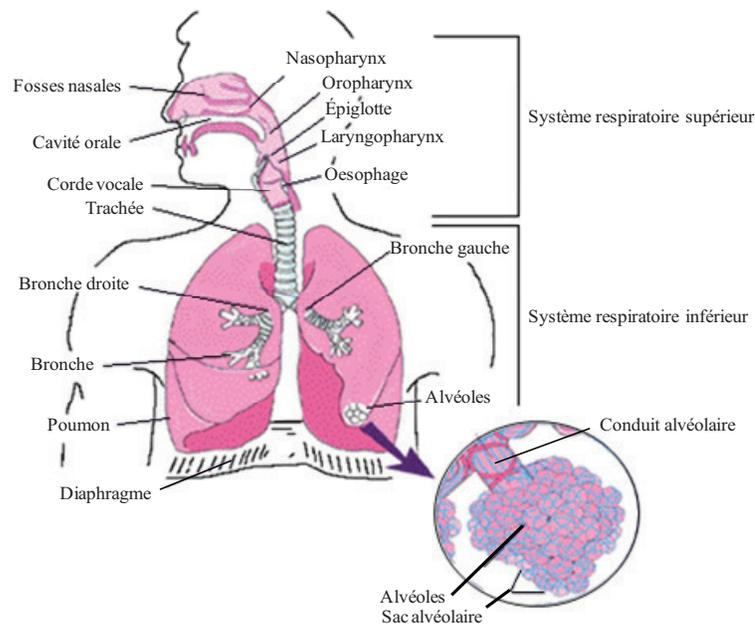


Figure 1: Représentation du système respiratoire. Schéma représentant l'anatomie du système respiratoire supérieur allant du nez au pharynx, et inférieur allant du larynx aux embranchements les plus distaux des voies aériennes. (tiré de: *santé canada* (<http://www.ec.gc.ca/air/default.asp?lang=Fr&xml=FCAFC364-06FA-47DB-958C-06903205E962>))

1.1. Le système respiratoire supérieur

Le système respiratoire supérieur s'étend des fosses nasales aux trois parties du pharynx, soit le nasopharynx, l'oropharynx et le laryngopharynx. Les fosses nasales sont composées d'un épithélium pseudostratifié prismatique formé de cellules ciliées, de cellules muqueuses et de cellules séreuses présentes aussi au niveau du système respiratoire inférieur et ayant chacune des rôles distincts (**voir section 1.2.1.1**). Cet épithélium repose sur la lamina propria constituée principalement de réseau de capillaires, de réticuline, de fibres élastiques et nerveuses (1).

1.2. Le système respiratoire inférieur

Le système respiratoire inférieur s'étend du larynx à la partie la plus distale du parenchyme pulmonaire. Cette partie des voies respiratoires est divisée en deux groupes : soit la zone de conduction et la zone respiratoire. La morphologie de base des voies respiratoires de la zone de conduction consiste en un épithélium de surface composé en grande partie de cellules ciliées et de cellules sécrétrices reposant sur les tissus sous-épithéliaux qui sont en grande partie faits de tissus conjonctifs et de glandes (1).

1.2.1. La zone de conduction

La zone de conduction du système respiratoire inférieur, qui sert principalement à acheminer, purifier, humidifier et réchauffer l'air provenant de l'extérieur, comprend le larynx, la trachée, les différentes ramifications bronchiques et les bronchioles non respiratoires (**figure 2**).

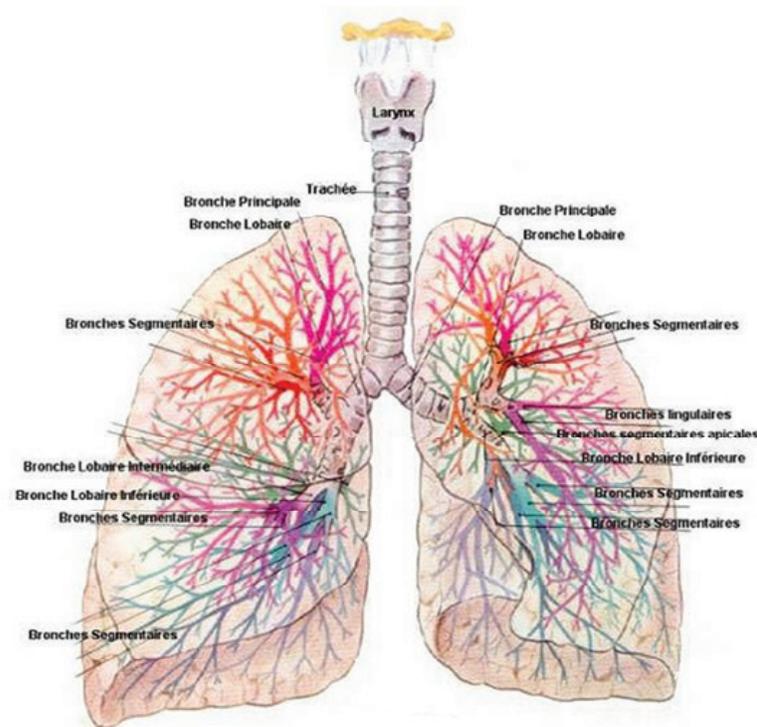


Figure 2: Arbre bronchique. Représentation schématique des subdivisions bronchiques (tiré de: *Le corps humain* de A. Faller et P. Sprumont (site: http://www.dynavie.com/dynavie/PAGES_PRO/CORPS_HUMAIN/Appareil_Respiratoire.html))

La trachée est formée de cartilage en forme de U pointé du côté postérieur de cette dernière. Cette forme de cartilage est conservée dans les bronches principales, devient plus irrégulière dans les bronches lobaires et segmentaires et disparaît au niveau des bronchioles. L'épithélium trachéal et des bronches proximales est un épithélium pseudostratifié composé en grande partie de cellules ciliées prismatiques, de cellules muqueuses et de cellules basales de forme triangulaire. L'épithélium au niveau des bronches et des bronchioles se modifie pour être bien adapté aux différentes fonctions de l'épithélium. (**figure 3**).

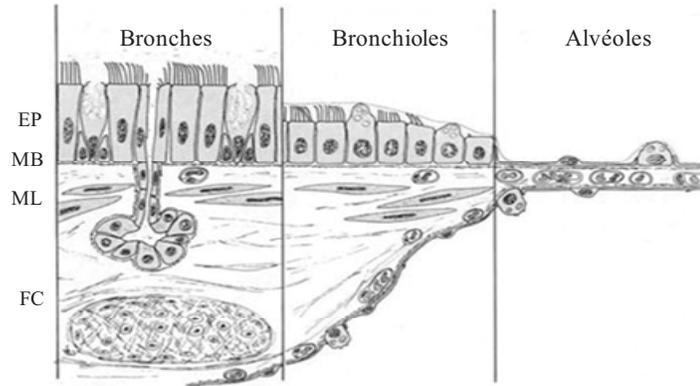


Figure 3. Évolution histologique de l'épithélium des voies aériennes. Schéma de l'évolution histologique de l'épithélium des bronches aux alvéoles. L'épithélium pseudostratifié prismatique cilié des voies aériennes, composé de cellules épithéliales (EP), d'une membrane basale (MB) de cellules de muscles lisses (ML) et de fibrocartilage (FC), s'amincit progressivement le long de l'arbre bronchique pour devenir un épithélium cuboïde dans les bronchioles terminales. L'épithélium alvéolaire est composé de cellules alvéolaires de type I et de type II. (Schéma tiré du *Handbook of physiology The Respiratory System, Circulation and Nonrespiratory Functions* supp.10 (site: <http://www.comprehensivephysiology.com/WileyCDA/CompPhysArticle/refIdcp030102.html>))

En effet, au niveau de la trachée et des bronches où l'on veut principalement purifier l'air et éliminer les pathogènes qu'y aurait pu s'infiltrer, un épithélium prismatique pseudostratifié avec des cellules ciliées et sécrétrices est observé pour permettre cette fonction (**figure 4**). Au niveau des bronchioles respiratoires, l'épithélium devient seulement prismatique et donc plus mince pour ainsi faciliter les échanges gazeux (1).

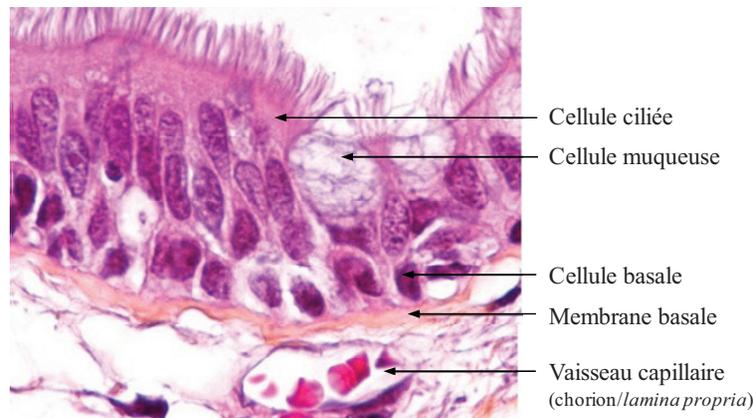


Figure 4: Histologie de l'épithélium de la zone de conduction. Représentation des différents types cellulaires présents dans l'épithélium trachéal et bronchique (tiré de: *Histologie broncho-pulmonaire* par B. Vergier, A. Taytard, H. Bégueret, *Respir* site de la FGMR (site: <http://www.respir.com/images/histologieEpithResp1.asp?expand=CNIL>))

1.2.1.1. Les cellules ciliées

Les cellules ciliées sont présentes au niveau de la trachée et des bronches où elles sont environ cinq fois plus nombreuses que les cellules muqueuses. Ensuite, leur nombre diminue et va jusqu'à disparaître au niveau des bronchioles terminales. Ces cellules sont attachées ensemble à leur surface apicale par des jonctions serrées, formant une barrière physiquement imperméable à la plupart des substances, et sont attachées les unes aux autres latéralement ainsi qu'aux cellules basales par des desmosomes. La principale fonction des cellules ciliées est la clairance de mucus grâce aux battements coordonnés des cils qui effectuent un mécanisme de « tapis roulant » permettant de faire remonter le mucus (**voir section 2.1.1**). De plus, elles sont impliquées dans la sécrétion de peptides antimicrobiens ce qui leur permet de contribuer d'une autre façon à la clairance des pathogènes (1; 2).

1.2.1.2. Les cellules muqueuses

Les cellules muqueuses représentent 20 à 30% des cellules dans les fosses nasales. Cependant, leur nombre est grandement diminué dans la trachée et dans les bronches et seulement quelques cellules muqueuses sont observées dans les bronchioles. Le cytoplasme des cellules muqueuses est distendu du côté apical par la présence de nombreuses vésicules de sécrétion contenant des mucines et des sulfomucines. Ces mucines forment le mucus situé à la surface des cellules ciliées qui créent une barrière chimique et physique à laquelle se fixent des particules et des micro-organismes (1).

1.2.1.3. Les cellules basales

Les cellules basales sont plus nombreuses dans la trachée où elles forment une membrane plus ou moins continue. Ensuite, leur nombre diminue graduellement dans les bronches jusqu'à pratiquement disparaître dans les bronchioles. Ces cellules sont relativement petites et de forme triangulaire. Leur base est attachée à la membrane

basale et leur sommet ne rejoint pas la lumière des voies aériennes. Elles servent de cellules progénitrices pour la restauration de l'épithélium de façon normale ou suite à une lésion. Elles sont aussi impliquées dans l'attachement des cellules épithéliales prismatiques à la membrane basale (1).

1.2.1.4. Les cellules de Clara

Au niveau des bronchioles, un autre type cellulaire est observé. En effet, on ne retrouve les cellules de Clara qu'à partir des bronchioles où elles constituent la majorité de l'épithélium avec les cellules ciliées. Elles ont une forme prismatique dans les parties plus proximales et une forme cubique dans les parties les plus distales. Ces cellules montrent des gonflements qui atteignent parfois la lumière des voies respiratoires entre les cellules ciliées. Le cytoplasme des cellules de Clara contient un appareil de Golgi proéminent, un réticulum endoplasmique rugueux abondant et des mitochondries contenant un grand nombre de lipides et de protéines, telles que les protéines spécifiques aux cellules de Clara (*clara cell-specific protein*) CCl0, CCl6 qui pourraient avoir un rôle dans la régulation locale de la réponse inflammatoire et immunitaire (1). Aussi, tout comme les cellules basales, les cellules de Clara sont des cellules progénitrices pour la régénération de l'épithélium bronchique (1; 3).

1.2.2. La zone respiratoire

La zone respiratoire inclut les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires et les alvéoles. L'épithélium de ces voies respiratoires est cuboïde au niveau des bronchioles respiratoires et disparaît graduellement pour laisser la place à l'épithélium alvéolaire. Plus la présence d'alvéoles augmente, plus la lamina propria diminue. Cependant, pour ce qui est du muscle lisse et des tissus élastiques, ils restent continus, en forme de spirale, tout au long des bronchioles et même dans les conduits alvéolaires. À l'extrémité des conduits alvéolaires, on note la présence de sacs alvéolaires contenant les alvéoles. L'interstitium, qui entoure les sacs alvéolaires, est

composé de capillaires, qui permettent les échanges gazeux, de tissus conjonctifs et d'autres types cellulaires permettant de maintenir la forme et la défense des alvéoles (1). L'épithélium alvéolaire est formé de deux types cellulaires distincts, soit les cellules alvéolaires de type I et les cellules alvéolaires de type II (1; 4-6) (**figure 5**). De plus, des macrophages alvéolaires sont aussi présents à la surface épithéliale alvéolaire où ils sont responsables de la clairance des pathogènes potentiels (1) (**voir section : 2.1.2.1**).

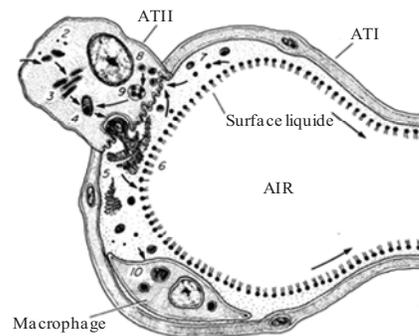


Figure 5. Structure de l'épithélium alvéolaire. Schéma de la structure d'une alvéole montrant les cellules alvéolaires de type I (ATI) et de type II (ATII) ainsi que les macrophages résidant dans les alvéoles. (Image tirée de Hawgood & Clements, *J Clin Invest.* 1990)

1.2.2.1. Les cellules alvéolaires de type I

Les cellules alvéolaires de type I (ATI) sont de larges cellules contenant un cytoplasme très mince et étendu. Ces cellules recouvrent, malgré leur petit nombre, 95% de la surface alvéolaire (1; 4; 5). Elles sont attachées les unes aux autres par des jonctions serrées qui procurent une barrière partiellement étanche à la diffusion de fluides dans l'espace intra-alvéolaire (1). Elles servent donc à procurer une barrière pouvant permettre les échanges gazeux (1; 4). Le cytoplasme des cellules ATI contient des vésicules pinocytiques qui pourraient transporter des substances entre l'espace intra-alvéolaire et le sang (1). De plus, elles contiennent des aquaporines, qui sont des canaux transportant l'eau, ce qui leur confère le rôle de cellules ayant la plus grande perméabilité à l'eau chez les mammifères. Aussi, Johnson et ses collègues (4) ont montré que les cellules alvéolaires de type I expriment des canaux sodiques ENaC fonctionnels, situés du côté apical, ainsi que la pompe Na^+/K^+ ATPase, qui est située du côté basolatéral et qui procure le gradient électrochimique pour le transport de

sodium. Cette étude a donc permis de découvrir un rôle insoupçonné des cellules ATI, anciennement connues pour être seulement impliquées dans les échanges gazeux. En effet, par l'établissement de canaux ENaC et de pompes Na^+/K^+ ATPase fonctionnels, les cellules ATI semblent aussi impliquées dans la réabsorption d'ions, et secondairement de liquide, permettant ainsi de maintenir l'espace aérien libre d'un excès de liquide (4; 5).

1.2.2.2. Les cellules alvéolaires de type II

Les cellules alvéolaires de type II (ATII), qui sont de formes cuboïdes, recouvrent seulement 2 à 5% de la surface alvéolaire bien qu'elles soient très nombreuses (elles représentent 95% des cellules alvéolaires) (4; 5). Elles semblent se localiser à la jonction de deux alvéoles (1). Ces cellules sont responsables de la production, de la sécrétion et du recyclage de surfactant et participent de façon active au transport ionique (4-6). En effet, ces dernières contiennent des corps lamellaires qui sont responsables de la production et de la sécrétion de surfactant recouvrant la surface alvéolaire d'une fine couche continue (1). Le surfactant est responsable de l'augmentation de la clairance de particules inhalées et de la diminution de la tension de surface qui empêche les alvéoles de se collapser suite à l'expiration (1; 5; 6). Aussi, le surfactant, qui est constitué de plusieurs types de protéines tels que SP(*surfactant protein*)-A, SP-B, SP-C et SP-D, est biostatique, aide à prévenir la transsudation de liquide interstitiel dans les alvéoles et, par la présence de ces protéines, participe à la réponse immunitaire de l'épithélium alvéolaire (1; 6). Pour ce qui est de leur participation au transport ionique, les ATII possèdent tout comme les cellules ATI, la pompe Na^+/K^+ ATPase, le canal sodique ENaC, le canal chlore CFTR et plusieurs aquaporines leur permettant d'être impliquées dans la réabsorption de liquide au niveau de l'épithélium alvéolaire (**figure 6B**) (4-7). Un autre rôle important des cellules alvéolaires de type II est de servir de cellules progénitrices. En effet, elles peuvent se diviser et se différencier en cellules alvéolaires de type I lors de lésions ou de mort cellulaire pour régénérer l'épithélium alvéolaire (1; 6).

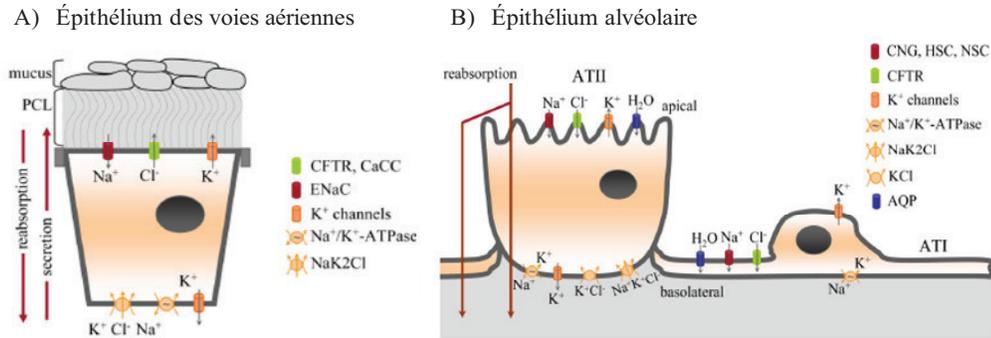


Figure 6: Représentation du transport ionique de l'épithélium des voies aériennes et alvéolaire. **A)** Au niveau de l'épithélium des voies aériennes, l'équilibre entre la sécrétion et la réabsorption de liquide est très importante pour maintenir le volume périciliaire. La sécrétion de chlore implique son entrée du côté basolatéral via le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NaK2Cl) et sa sortie par le canal CFTR du côté apical. La réabsorption de sodium dépend de son entrée par le canal ENaC et de sa sortie par la pompe Na^+/K^+ ATPase du côté basolatéral. **B)** L'épithélium alvéolaire est un épithélium de réabsorption. Les principaux mécanismes de transports au niveau alvéolaire sont présentés sur la figure **B**: les canaux sodiques (régulé par les nucléotides cycliques (CNG), hautement sélectif tel que ENaC (HSC) et non-sélectif (NSC)), les canaux chlores (CFTR et ceux activés par le Ca^{2+} (CaCC)), les canaux K^+ , les cotransporteurs NaK2Cl et KCl , la pompe Na^+/K^+ ATPase et les aquaporines (AQP). (figure tirée de: Bardou O. et al. *AJP* 2009)

2. Physiologie de l'épithélium pulmonaire

Même si la fonction principale du poumon est de permettre les échanges gazeux avec le sang, il possède aussi d'autres fonctions permettant de maintenir son bon fonctionnement. Premièrement, les poumons sont impliqués dans le transport des ions et des fluides ce qui permet de maintenir un volume de liquide périciliaire et alvéolaire adéquat et donc une bonne clairance mucociliaire et un bon échange gazeux (**voir section 2.1**). De plus, ils possèdent des mécanismes de défense, tels que la clairance mucociliaire et les réponses immunitaires innées et adaptatives, permettant d'éliminer les pathogènes et les particules nocives qui auraient pu être inhalés (**voir section 2.2**). Finalement, les poumons mettent en place des processus de réparation afin de tenter de se régénérer suite à des lésions favorisant ainsi le maintien de leur fonction principale, soit les échanges gazeux (**voir section 2.3**). Ces différentes fonctions seront présentées dans les sections suivantes.

2.1. Le transport des ions et des fluides

Au niveau des poumons, les mécanismes de transport ioniques, permettant le mouvement de liquide et d'ions d'un côté à l'autre de l'épithélium pulmonaire, sont extrêmement importants. Le rôle du transport ionique diffère dans les zones de conduction (voies aériennes) et respiratoire (alvéoles). Au niveau des voies aériennes, le transport ionique sert à maintenir un équilibre entre la réabsorption et la sécrétion de liquide, permettant le maintien du volume de liquide de surface utile pour la clairance mucociliaire. D'autre part, au niveau de l'épithélium alvéolaire, le transport ionique permet de s'assurer qu'il y ait principalement une réabsorption de liquide pour ainsi favoriser une bonne clairance alvéolaire et maintenir un espace exempt de liquide nécessaire aux échanges gazeux.

Le transport ionique transmembranaire est assuré par les canaux, les transporteurs et les pompes ioniques. Du côté apical, le transport des ions est principalement assuré par le canal sodique ENaC, le canal chlore CFTR et les canaux potassiques (7-10). Pour ce qui est du côté basolatéral, ce sont les canaux potassiques, le transporteur $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$, la pompe Na^+/K^+ ATPase et le co-transporteur K^+Cl^- qui assure majoritairement les échanges ioniques (7; 8; 11). La force motrice du transport d'ion au niveau des voies aériennes est la pompe Na^+/K^+ ATPase. Elle génère un gradient électrochimique favorable à l'absorption de sodium du côté apical via le canal ENaC. De plus, elle permet le recyclage des ions potassium, en concordance avec les canaux potassiques, situés du côté basolatéral (8; 11). Ces mouvements d'ions permettent donc la sécrétion ou l'absorption d'eau par les jonctions entre les cellules et par les canaux à eau, soit les aquaporines (**figure 6**). La fonction des principaux canaux (ENaC, CFTR et canaux K^+) sera exposée ci-dessous.

2.1.1. Le canal sodique ENaC

L'absorption de Na^+ représente un transport ionique important au niveau de l'épithélium des voies aériennes et de l'épithélium alvéolaire. Ce transport est assuré principalement par le canal sodique épithélial ENaC (*epithelial Na^+ channel*). Ce

canal est formé de quatre sous-unités homologues appelées α , β , γ et δ (12-14). Chacune des sous-unités est composée de deux domaines transmembranaires qui se chevauchent et d'un grand domaine extracellulaire contenant de multiples domaines riches en cystéine (15). Avant la découverte de la sous-unité δ , il avait été proposé que le canal ENaC s'associait en hétérotétramère composé de deux sous-unités α , une sous-unité β et une sous-unité γ (**figure 7**) (16; 17). Depuis, la découverte de la quatrième sous-unité, il a été proposé que la sous-unité δ pourrait, dans certains cas, remplacer la sous-unité α grâce à leur très grande homologie de séquence. En fait, certains canaux seraient composés des sous-unités α , β et γ et d'autres seraient composés des sous-unités δ , β et γ (13; 14). De plus, la grande quantité de sous-unité α au niveau de l'épithélium alvéolaire entraîne la formation de canaux cationiques non-sélectifs formés seulement de la sous-unité α du canal ENaC. Ces canaux permettent autant le passage de Na^+ que de K^+ (18).

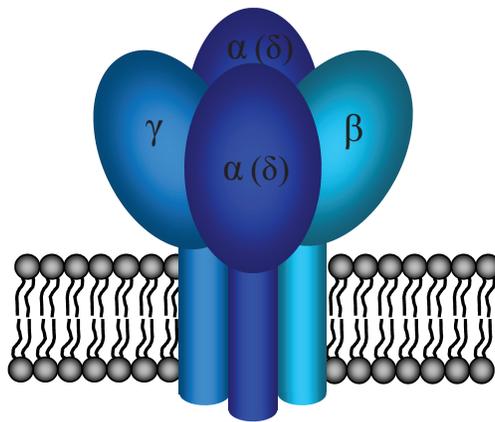


Figure 7: Représentation schématique du canal ENaC. Schéma montrant l'assemblage tétramérique du canal ENaC, formé de deux sous-unités α ou δ d'une sous-unité β et d'une sous-unité γ , autour du pore central (Schéma tiré de: Kellenberger S et al. *Physiol. Rev.* 2002)

Le canal ENaC joue un rôle important dans l'absorption de liquide au niveau des voies respiratoires et des alvéoles. En effet, ce canal est grandement impliqué dans la clairance alvéolaire au moment de la naissance et dans la résolution d'un œdème pulmonaire (19-23). En effet, il a été montré qu'un peu avant la naissance, l'expression du canal ENaC augmente, permettant aux poumons de passer d'un environnement liquide (favorisant leur croissance) à un environnement aérien (permettant au nouveau-né de respirer) (16). De plus, il a été observé que les souris $\alpha\text{ENaC}(-/-)$ n'arrivaient pas à survivre plus de 48 heures après leur naissance dû à leur incapacité d'éliminer le liquide les empêchant de bien respirer (20). Ceci montre

donc que le canal ENaC joue un rôle important dans la clairance alvéolaire. L'activité et l'expression du canal ENaC sont finement régulées pour ainsi permettre un ajustement fin de l'ASL dans les voies aériennes et ainsi de la fonction mucociliaire.

La régulation du canal ENaC peut se faire au niveau de l'activité et de l'expression génique et protéique du canal. Pour commencer, il a été montré que la stimulation des récepteurs de médiateurs inflammatoires tels que la phospholipase C (PLC) et la bradykinine (BK) semble diminuer l'activité du canal ENaC. En effet, la BK et la PLC via l'activation de la cascade de signalisation de la PLC entraînent l'activation du récepteur P2Y₂ causant la dégradation de PI(4,5)P₂ menant à la diminution de l'activité d'ENaC (24; 25). De plus, certains composés régulent l'expression du canal ENaC tel que les glucocorticoïdes et les agonistes des récepteurs β-adrénergiques entraînant l'augmentation de l'expression de la sous-unité α du canal ENaC ainsi que de l'activité du canal (21; 26-28).

2.1.2. Le canal chlore CFTR

Le transport de chlore au niveau de l'épithélium des voies aériennes et alvéolaires est principalement assuré par le canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*). Le canal CFTR est une glycoprotéine, membre de la famille des protéines ABC (*ATP nucleotide binding cassette*), située à la membrane apicale. Même si le canal CFTR possède, comme les protéines ABC, deux domaines homologues servant à la fixation et à l'hydrolyse d'ATP comme une ATPase, le canal CFTR est le seul membre de cette famille à fonctionner comme un canal ionique (15; 29; 30). Le canal CFTR est composé de cinq domaines soit deux domaines transmembranaires (MSD; *membrane-spanning domain*), deux domaines fixant des nucléotides (NBD; *nucleotide-binding domain*) et un domaine de régulation (R; *regulatory domain*) (30; 31). Ces domaines s'associent de la façon suivante : MSD1 – NBD1 – R – MSD2 – NBD2 (**figure 8**).

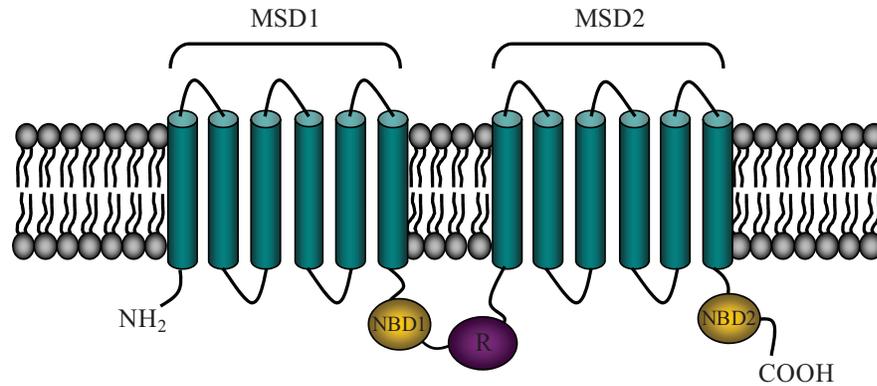


Figure 8: Représentation du canal CFTR. Représentation schématique de la structure secondaire du canal CFTR montrant les deux domaines transmembranaires (*membrane-spaning domain*; MSD1 et 2), les deux domaines fixant des nucléotides (*nucleotide-binding domain*; NBD 1 et 2) et le domaine de régulation (R).

Les deux domaines MSD sont composés de six segments transmembranaires connectés par des boucles intra- et extra-cellulaires. Ces domaines s'assemblent pour former un pore à faible conductance, sélectif aux anions, avec un grand vestibule intracellulaire et un petit vestibule extracellulaire séparé par un filtre de sélectivité (30). Pour ce qui est des deux domaines NBD, ils forment ensemble un dimère en tête-à-queue contenant deux sites de fixation pour l'ATP situés à l'interface du dimère (30; 32). Finalement, le domaine R possède de multiples sites de phosphorylation et des acides aminés chargés (29; 30; 33).

Depuis plusieurs années, plusieurs modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer le mécanisme d'ouverture du canal CFTR (34-39). Selon le modèle le plus récent, soit le modèle « hydrolytique – non hydrolytique », la fixation d'ATP au dimère des NBD entraînerait l'ouverture du canal et l'hydrolyse de l'ATP permettrait la fermeture du canal (30; 32; 38; 39). Aussi, il a été suggéré que lorsque le domaine R n'est pas phosphorylé, il interagirait fortement avec les NBD empêchant leur interaction, tandis que lorsqu'il est phosphorylé, par la protéine kinase A et C (PKA et PKC) par exemple, l'interaction entre le domaine R et les NBD serait plus faible permettant ainsi la dimérisation des deux NBD et la stabilisation de l'ouverture du canal (33; 34).

Le canal CFTR joue un rôle primordial dans la sécrétion de chlore et l'équilibre entre l'absorption de sodium et la sécrétion de chlore est crucial au maintien du liquide périciliaire (PCL : *periciliary liquid*) (10; 40). Par exemple, dans la pathologie de la Fibrose Kystique, causé par une mutation au niveau du canal CFTR, on note une diminution importante du volume de liquide périciliaire (**voir section : 3.3.1**).

Le canal CFTR peut être régulé de plusieurs façons. Pour commencer, l'ouverture du canal, assurée par l'hydrolyse d'ATP, peut aussi être régulée par la présence d'AMP ou d'ADP. Par exemple, l'AMP cyclique peut activer le canal CFTR en activant la PKA phosphorylant le domaine R. De plus, des études *in vitro* ont démontré que le NBD2 possédait, en plus d'une fonction ATPase, une fonction d'adénylate kinase qui permet, en présence excessive d'ADP ou d'AMP, la formation d'ATP (41). D'autre part, les protéines NHERF1 et NHERF3 pourraient aider à la dimérisation et à la stabilisation du canal permettant une augmentation de sa conductance et de sa perméabilité (33). De façon plus indirecte, il a aussi été montré que les récepteurs liés à la PLC initient la sécrétion de chlore par le CFTR via l'activation des canaux potassiques basolatéraux (42).

2.1.3. Les canaux potassiques

Depuis le clonage du premier canal potassique, soit le canal Shaker de la drosophile en 1987, plus d'une centaine de canaux potassiques ont été identifiés (43), dont plus de trente au niveau des poumons. Ces canaux ont été divisés en trois groupes différents selon leur nombre prédictif de segments transmembranaires. Le premier groupe, comprenant les canaux K^+ ayant six segments transmembranaires, se divise en deux sous-groupes : les canaux K^+ voltage-dépendants et les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} . Le deuxième groupe comporte les canaux potassiques ayant quatre segments transmembranaires et deux pores. Le troisième groupe est composé des canaux K^+ à rectification interne comprenant deux segments transmembranaires (8). Parmi ceux appartenant au premier groupe, l'expression de KvLQT1 a été rapportée dans les cellules épithéliales nasales, trachéales, bronchiques et ATII (8; 44-48). Plusieurs

autres canaux K^+ dépendants du voltage sont aussi présents au niveau du système respiratoire tels que Kv1.1, -1.3, -1.4, -2.2, -4.1, -4.2, -4.3, -7.2, -7.3, -7.5 et -9.3 (49). Aussi, on note la présence du canal K^+ activé par le calcium, SK4 (appelé KCa3.1 ou IKCa), dans la trachée, les bronches et les bronchioles ainsi que la présence des canaux KCa à grande conductance (BK_{Ca}) au niveau des cellules épithéliales nasales et alvéolaires (8; 44-46; 50). Pour ceux appartenant au deuxième groupe, plusieurs membres ont été identifiés chez les lignées cellulaires H441 et Calu-3 tels que Twik-2 et Trek-1 localisés à la membrane plasmique (8; 51; 52). Finalement, parmi plusieurs transcrits de canaux du troisième groupe, seulement deux d'entre eux semblent être fonctionnels, soit Kir 2.1 et Kir 6.1 (K_{ATP}) (8; 44; 45; 53) (**figure 9**).

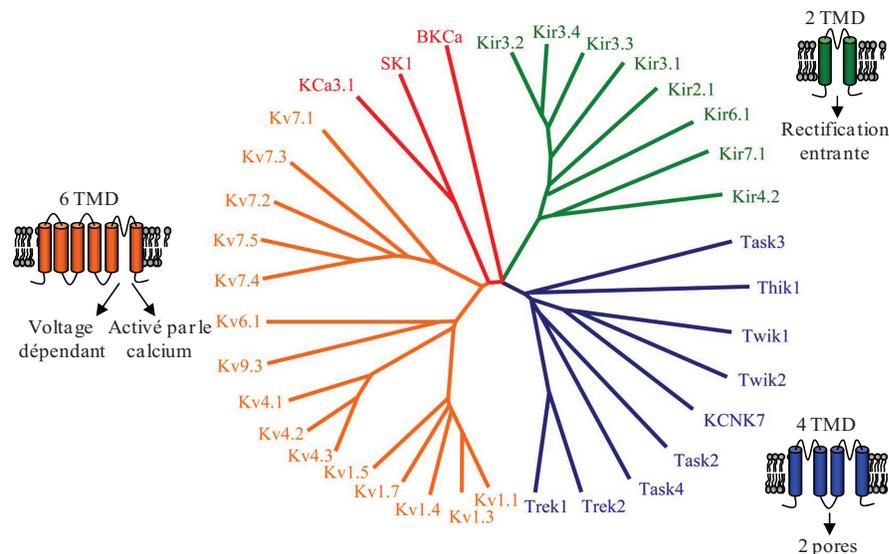


Figure 9: Canaux potassiques de l'épithélium pulmonaire. Représentation de l'arbre phylogénique des différents canaux K^+ présents dans l'épithélium respiratoire ainsi que celle des différentes classes de canaux K^+ soit ceux à 6 domaines transmembranaires (orange et rouge), à 4 domaines transmembranaires (bleu) et à 2 domaines transmembranaires (vert). (figure tirée de: Bardou O. et al. *AJP* 2009)

Les canaux potassiques sont principalement impliqués dans le contrôle du transport ionique via leur implication dans la variation du potentiel membranaire. Par exemple, KvLQT1 et KCa3.1 ont été associés au contrôle de la sécrétion de chlore. En effet, il a été montré que l'inhibition de ces canaux (par des agents pharmacologiques) réduit fortement le transport de chlore dans les cellules épithéliales nasales, trachéales et

bronchiques (47; 48; 54; 55). À l'inverse, l'activation de KCa3.1 stimule la sécrétion de chlore via le canal CFTR ou le canal chlore activé par le calcium (CaCC) en favorisant le gradient électrochimique (56). Aussi, la modulation des canaux potassiques basolatéraux des cellules ATII régule le transport du Na^+ et du Cl^- ainsi que l'expression du canal ENaC et CFTR (50).

Même si la principale fonction des canaux potassiques est le contrôle du potentiel membranaire des cellules épithéliales et le maintien du gradient électrochimique, ils sont aussi impliqués dans plusieurs processus physiologiques tels que la régénération épithéliale (**voir section 2.2.3.2**), l'inflammation et les échanges gazeux. Pour ce qui est de leur implication dans la réponse inflammatoire, il a été montré que les canaux K^+ sont impliqués dans la régulation de la production de cytokines (8; 57). En effet, l'inhibition des canaux potassiques, plus particulièrement l'inhibition du canal Kv1.3, mène à une diminution de production de $\text{TNF-}\alpha$ par les macrophages ainsi qu'à une diminution de l'infiltration par les neutrophiles polynucléaires au niveau du poumon et des intestins (8; 58). Dans le cas de leur implication dans les échanges gazeux, le canal à deux-pores Task-3 et le canal voltage-dépendant Kv3.3 sont exprimés dans les corps neuroépithéliaux (NEB) servant de senseur à la pression d'oxygène dans les voies aériennes, les corps artériels carotides et les muscles lisses pulmonaires (59; 60). Il a été montré que les canaux Kv sont inhibés suite à une hypoxie aiguë (59-61). De plus, le temps d'ouverture du canal BKCa est grandement diminué lorsque la PO_2 diminue au niveau des cellules A549(62). Ainsi, les canaux potassiques semblent être des éléments clés pour la détection du niveau d' O_2 et pour la réponse cellulaire face à l'hypoxie (8).

2.2. Les mécanismes de défense

Les voies respiratoires, étant continuellement en contact avec l'air extérieur, sont exposées à des particules nocives et à des pathogènes qui pourraient les endommager. Il existe cependant plusieurs mécanismes de défense qui préviennent l'atteinte de ces

dernières tels que la clairance mucociliaire, la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire.

2.2.1. La clairance mucociliaire

Les voies respiratoires sont premièrement protégées des poussières, des bactéries et des substances nocives inhalées par une mince couche de liquide à la surface de l'épithélium des voies aériennes (ASL) normalement de 5 à 10 μm d'épaisseur. L'ASL est formé d'au moins deux couches : la couche supérieure forme la couche de mucus et la couche inférieure est un liquide lubrifiant formant le liquide périciliaire (PCL) (63; 64).

La couche de mucus forme un gel au dessus du liquide périciliaire ce qui crée une barrière physique pour les pathogènes. Il est composé à 97% d'eau et à 3% de particules solides telles que des mucines, des sels, des lipides, et des débris cellulaires (40; 64). Les mucines sont des protéines glycosylées complexes qui aident à la séquestration des pathogènes, des polluants et des allergènes (40; 65). Leur sécrétion, assurée par les cellules sécrétrices telles que les cellules muqueuses, est en grande partie contrôlée par l'activation des récepteurs P_2Y_2 via la présence d'ATP (40). De plus, les cellules muqueuses sécrètent, en plus des mucines, une variété de molécules antimicrobiennes (défensine et lysosymes), de molécules immunomodulatrices (sécrétoglobines et cytokines) et de molécules protectrices qui peuvent être incorporées au mucus (40).

Le niveau d'hydratation du mucus est un élément important pour sa clairance efficace par les cellules ciliées. En effet, il a été montré que l'hydratation du mucus influence grandement les propriétés élastiques et de viscosité du mucus. Par exemple, l'hypersécrétion de mucines ou une diminution du volume de surface peut augmenter la concentration de solides de 3% à 15% créant un mucus plus élastique et visqueux plus difficile à éliminer. De plus, le mucus déshydraté adhère plus facilement à l'épithélium des voies aériennes (40).

La couche de mucus repose sur le liquide périciliaire ayant une épaisseur d'environ $7\mu\text{m}$ (10; 40; 64). La couche de mucus est propulsée vers le haut des voies aériennes par le battement des cils des cellules ciliées permettant ainsi la clairance des particules et des pathogènes inhalés qui sont coincés dans le mucus (1; 2; 40; 63). En effet, les cellules ciliées possèdent de 200 à 250 cils à leur surface entraînant le mucus, selon un mécanisme de « tapis roulant », des voies aériennes à l'oropharynx où il sera soit avalé ou expectoré (1; 2). Le battement des cils est assuré par la présence d'interactions complexes entre les bras de dynéine et les microtubules de l'axonème des cils. Les cils se stimulent physiquement les uns et les autres dans un mouvement coordonné pour ainsi produire une vague métachronale. En fait, les cils effectuent une « effective stroke » pendant laquelle ils battent de l'avant ce qui permet de faire avancer le mucus. Ensuite, ils effectuent un « recovery stroke » qui leur permet de retourner à leur position initiale sans faire revenir trop de liquide pour ainsi produire un flot positif. Le modèle classique expliquant ce phénomène montre que le liquide périciliaire, qui procure un environnement non visqueux, permet aux cils de se rabattre (63) (**figure 10**). Finalement, le battement des cils est régulé principalement par la concentration intracellulaire de calcium (2).

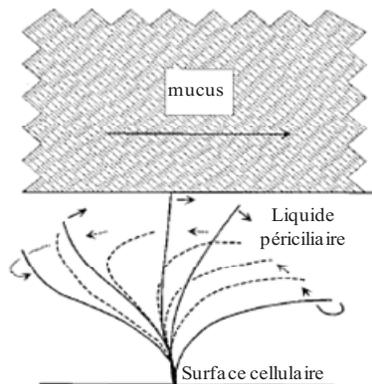


Figure 10: Mouvement ciliaire. Schématisation montrant le mouvement ciliaire dans le liquide périciliaire qui permet l'avancement du mucus. (Tiré de: Matsui H. et al. *J Clin Invest.* 1998)

Le liquide périciliaire, en plus de permettre le rabattement des cils sans faire reculer le mucus, empêche l'adhésion de la couche de mucus (mucine) aux cellules épithéliales (63). L'épaisseur de cette couche de liquide périciliaire est donc très importante pour une bonne clairance mucociliaire. Le maintien du volume de l'ASL, et par le fait même du PCL, est régulé par la concentration de sel à la surface des

voies aériennes. En effet, l'épithélium étant perméable à l'eau, il permet le rétablissement rapide du volume de l'ASL à un état presque isotonique. Ce phénomène est régulé par l'absorption de sodium via le canal sodique ENaC et la sécrétion de chlore via le canal CFTR et le canal chlorique activé par le calcium (CaCC) (10; 40). En effet, lorsque le volume de l'ASL se rapproche de son volume physiologique, l'activité du canal ENaC est réduite ce qui ralentit le taux d'absorption de liquide. Le volume de liquide périciliaire est aussi régulé localement par la concentration d'adénine et d'uridine. Ces dernières sont sécrétées dans le liquide périciliaire par exocytose via les cellules muqueuses (40).

2.2.2. La réponse immunitaire et inflammatoire

Lorsque la clairance mucociliaire n'est pas suffisante pour éliminer les pathogènes, la deuxième ligne de défense, soit la réponse immunitaire, est activée pour ainsi tenter d'éliminer ces pathogènes. Le système immunitaire est formé de deux composantes : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise (**figure 11**).

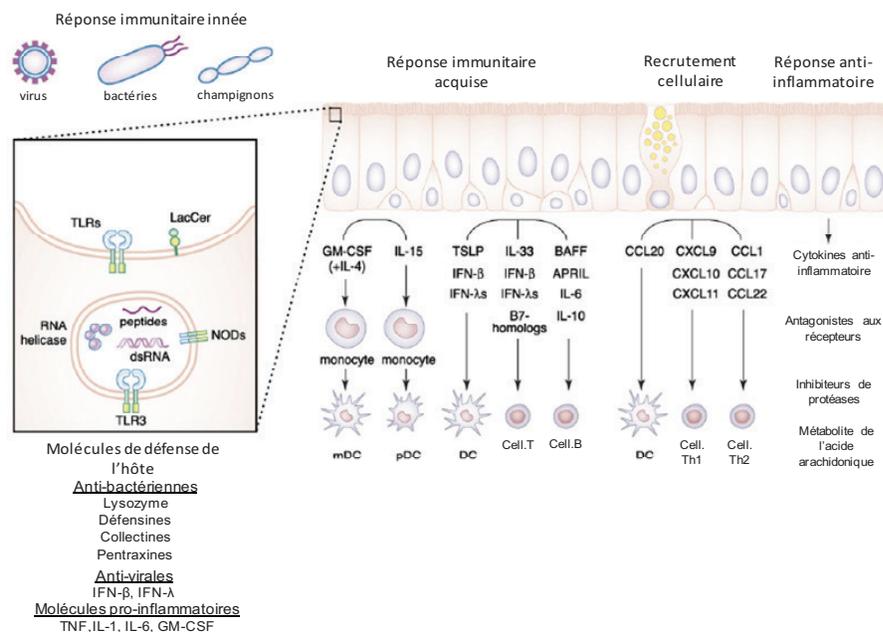


Figure 11: Réponse immunitaire. Modèle résumant l'implication des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire ainsi que dans la réponse anti-inflammatoire. (Tiré de: Kato A et al. *Current Opinion in immunology*, 2007)

2.2.2.1. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est responsable de la reconnaissance immédiate et du contrôle de l'invasion bactérienne et virale. En effet, elle possède l'habileté de reconnaître les stimuli potentiellement pathogènes et d'y répondre (65). L'activation de la réponse immunitaire se fait principalement par les cellules épithéliales, en contact avec les pathogènes (66). En fait, les cellules épithéliales détectent la présence d'infections grâce à la présence de récepteur de reconnaissance de structures conservées (PRR). Les récepteurs PRR reconnaissent les composantes conservées et essentielles à la survie des pathogènes, soit les PAMP (pathogen-associated molecular patterns) (66). Ces récepteurs permettent donc la reconnaissance rapide des pathogènes et ainsi leur destruction à l'aide d'effecteur immunitaire. Les études approfondies sur les PRR ont permis de découvrir plusieurs types de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes tels que les TLR (*toll-like receptors*), les RLR (*RIG-I-like receptors*) et les NLR (*NOD-like receptors*) qui sont les principaux PRR reconnaissant les composantes bactériennes et virales (67).

Il existe chez l'humain dix TLR différents. Chacun des TLR reconnaît une structure moléculaire unique telle que les peptidoglycanes des bactéries gram-positive (reconnus par TLR-2), les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-négative (reconnus par TLR-4), les flagellines bactériennes (reconnus par TLR-5), les diacyl-lipopeptides (reconnus par l'hétérodimère TLR-6/2), les triacyl-lipopeptides (reconnus par l'hétérodimère TLR-1/2), les ARN simples et double brin (reconnus par TLR-3) et l'ADN riche en groupements CpG (reconnus par TLR-9) (65-70). La signalisation des TLR engendre l'activation des facteurs de transcription NFκB et IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) (66; 68-70). L'activation de NFκB mène à la transcription de gènes entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF (*tumor necrosis factor*)-α, l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-12 (IL-12). Pour ce qui est de IRF-3, il entraîne la production d'interférons (IFN) de type I (IFN-α et IFN-β) ainsi que l'activation d'une réponse immunitaire antivirale (66; 69; 70). Les récepteurs de la famille des RLR reconnaissent principalement les

composantes virales (67). Pour ce qui est des NLR, ce sont, contrairement aux TLR et au RLR, des récepteurs cytoplasmiques détectant les PAMP intracellulaires (70).

La reconnaissance d'un pathogène, entraîne la production de molécules de défense telles que des protéines antibactériennes et antivirales, des chémokines et des cytokines pro-inflammatoires (comme détaillé ci-dessus). Les cytokines pro-inflammatoires et les chémokines mènent au recrutement et à l'activation de phagocytes, tels que les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes, responsables de la phagocytose et donc de l'élimination du pathogène (65; 71; 72). En effet, suite à la reconnaissance d'un pathogène par leur PRR, les neutrophiles, qui sont recrutés suite à la production d'IL-8, entraînent une réponse immunitaire robuste. En fait, en plus de phagocyter les pathogènes, ils génèrent un nombre important de molécules microbicides, telles que des ROS (*reactive oxygen species*), des RNS (*reactive nitrogen species*), de l'élastase et des peptides antimicrobiens tels que l' α -défensine. Pour ce qui est des macrophages et des monocytes, ils possèdent eux aussi des PRR à leur surface qui leur permettent de reconnaître les pathogènes, de les phagocyter dans des vésicules endocytiques ou des phagosomes pour ainsi les détruire (65; 71).

2.2.2.2. La réponse immunitaire adaptative

Les cellules épithéliales, autant des voies aériennes que alvéolaires, régulent la réponse immunitaire innée (**voir section 2.2.2.1.**) tout comme la réponse immunitaire acquise par la production de molécules fonctionnelles et via des interactions avec les cellules immunitaires. En effet, les cellules épithéliales sont impliquées dans la réponse immunitaire acquise via leurs interactions avec les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T et B. Premièrement, les cellules épithéliales entraînent la migration des cellules dendritiques au niveau de l'épithélium via la production de CCL20 (*chemokine (C-C motif) ligand 20*), induite par plusieurs stimuli, tels que la présence de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-13 et IL-17), de PAMP, d'allergènes et de nucléotides extracellulaires. Les cellules dendritiques permettent ensuite de faire le pont entre la réponse immunitaire innée et acquise. En effet, suite à l'internalisation

de pathogènes, les cellules dendritiques produisent des antigènes permettant l'activation des lymphocytes T, B et des cellules NK (*natural killer*) impliqués dans la réponse immunitaire acquise (66; 72). De plus, les cellules épithéliales sont aussi impliquées dans le recrutement des lymphocytes T de type Th1 (*Th :T helper*) via la production de ligands du récepteur à chémokines CXCR3 (chémokines de type CXC)(66; 73) et dans la migration des lymphocytes T de type Th2 grâce à la production de ligands pour les récepteurs à chémokines CCR8 et CCR4 (chémokines de type C-C)(66; 74; 75). Les lymphocytes de type Th1 mènent à l'activation de la réponse inflammatoire à médiation cellulaire qui consiste à recruter des cellules immunitaires capables de phagocyter les pathogènes telles que les macrophages, les mastocytes et les neutrophiles. Pour ce qui est des lymphocytes de type Th2, ils entraînent une réponse inflammatoire de type humorale impliquée dans la production d'anticorps pour l'antigène ciblé via les lymphocytes B. En effet, les lymphocytes B, qui sont recrutés à l'épithélium suite à la sécrétion de facteurs activateurs de lymphocytes B de la famille des TNF- α , entraînent la production d'Ig (immunoglobulines) A et d'IgE, importants pour la protection des voies aériennes (66).

En somme, la reconnaissance des pathogènes par les cellules immunitaires ainsi que les cellules épithéliales mène à l'activation d'une réponse immunitaire innée et acquise engendrant une réponse inflammatoire. La réponse inflammatoire ainsi produite participe alors à la clairance des pathogènes via le recrutement de cellules immunitaire et à sa capacité à activer une réponse immunitaire acquise. En résumé, ces deux systèmes physiologiques sont intimement reliés et forment un mécanisme de défense important contre les pathogènes inhalés.

2.2.3. La régénération épithéliale

2.2.3.1. Causes et conséquences des lésions épithéliales

Les lésions au niveau de l'épithélium pulmonaire peuvent être causées par des réactions allergiques, une exposition à des xénobiotiques (fumée de cigarette), des

traumas physiques (ventilation mécanique), des infections virales et bactériennes ainsi que de l'inflammation (3; 44). En effet, il a été montré que la relâche de protéases par les neutrophiles (qui sont recrutés, comme mentionné ci-dessus, suite au déclenchement de la réponse immunitaire et la production de cytokines pro-inflammatoires) ou par les bactéries et les virus, contribue au développement de lésions épithéliales. De plus, la surproduction elle-même de cytokines pro-inflammatoires dans certaines pathologies comme l'asthme et la fibrose kystique joue un rôle dans le développement de lésion et le remodelage de l'épithélium pulmonaire (44; 76).

Ces lésions peuvent engendrer plusieurs conséquences importantes. En effet, ces lésions, qui entraînent une perte de l'intégrité épithéliale, mènent à la rupture de la barrière physique formée par l'épithélium. La rupture de cette barrière donne aux pathogènes un accès aux tissus bronchiques pouvant causer une infection importante, de l'inflammation et un choc septique (77). Au niveau des alvéoles, la présence de lésions peut créer un œdème et causer l'affaissement des alvéoles suite à la destruction des cellules alvéolaires de type II qui produisent le surfactant responsable de la diminution de la tension de surface. De plus, cette perte d'intégrité épithéliale mène à une défaillance du transport des fluides et des ions pouvant créer au niveau des voies respiratoires une mauvaise clairance mucociliaire et alvéolaire (10; 21). Suite aux lésions, une adhérence plus importante des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* peut aussi être observée (78-80)

2.2.3.2. Processus de réparation épithéliale

Suite à une lésion, l'épithélium des voies aériennes doit rapidement se régénérer pour rétablir ses fonctions. Le processus de régénération est un phénomène complexe qui se met en place rapidement suite au développement de lésions au niveau de l'épithélium pulmonaire (81). Les lésions sont premièrement réparées par la formation provisoire de matrice extracellulaire composée de laminine, de collagène de type IV, de fibrine et de produits provenant des fibroblastes et des cellules

épithéliales tels que de la fibronectine, plusieurs types de collagènes, des prostaglandines et des cytokines (82). Puis, séquentiellement, les cellules épithéliales à la frontière de la lésion se dédifférencient pour acquérir un phénotype appelé « cellule en réparation », s'étalent, migrent pour recouvrir la surface dénudée de cellules, prolifèrent et se redifférencient pour reformer un épithélium fonctionnel (**figure 12**) (3; 76; 81; 82).

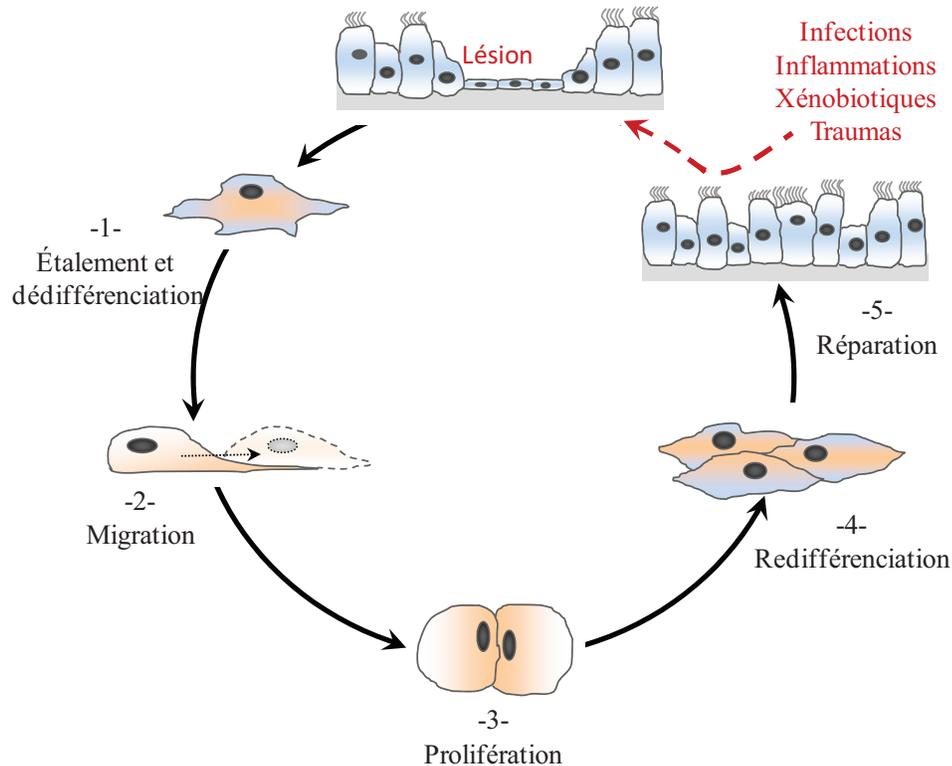


Figure 12: Processus de réparation. Modèle représentant séquentiellement les différents processus de réparation de l'épithélium respiratoire lors du développement de lésion (*modifié de: Bardou O. et al. AJP 2008*)

Il a été montré dans des modèles animaux que la régénération de l'épithélium est amorcée par la migration cellulaire (81). Il a aussi été établi que les filaments d'actine jouent un rôle crucial dans la migration cellulaire. En effet, on note la formation d'un dense réseau de ces filaments dans les lamellipodes des cellules migrantes. Ces derniers s'organisent dans la direction de locomotion au bout des lamellipodes et, de cette façon, ils dirigent la protubérance au pôle avant de la cellule. La rétraction de l'arrière de la cellule migrante serait reliée à la contraction des réseaux

d'actomyosines corticales sous la membrane cellulaire (83-85). De plus, la polarisation fonctionnelle des mécanismes de migration du cytosquelette, permettant l'avancement du lamellipode et la rétractation du derrière de la cellule, est maintenue par le gradient intracellulaire de calcium qui est plus grand à l'arrière de la cellule qu'au niveau du lamellipode (**voir section 2.1.3.3.4**). La matrice extracellulaire joue aussi un rôle important dans la migration cellulaire. En effet, le cytosquelette peut seulement participer au déplacement de la cellule quand les forces générées par la « machinerie de migration » cellulaire sont transmises à la matrice extracellulaire (84). C'est pourquoi les interactions entre la matrice extracellulaire et les récepteurs d'adhésion de la cellule doivent être très bien coordonnées. Ces interactions dépendent en grande partie des protéines de la matrice extracellulaire, des intégrines ainsi que des récepteurs d'adhésion cellulaire. Les intégrines sont des récepteurs composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Ces hétérodimères permettent les interactions cellule-cellules et l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (3; 81; 82). Sur ce, il a été montré que les sous-unités β_1 des intégrines sont nécessaires à la migration rapide des cellules épithéliales des voies respiratoires sur le collagène IV et sur la laminine-1 et -2 (86). Pour ce qui est des sous-unités α_2 , α_3 et α_6 des intégrines, elles sont directement impliquées dans la migration cellulaire sur le collagène de type IV (81).

Les métalloprotéinases sont aussi grandement impliquées dans la migration cellulaire. Parmi les cinq types de métalloprotéinases, les adamylinases (aussi appelé *a disintegrin and metalloproteinase domain*; ADAM) et les matrixines (aussi appelé métalloprotéinase de la matrice; MMP) sont les plus étudiées pour leur rôle dans la migration cellulaire. Pour commencer, les ADAMs sont impliquées dans la migration cellulaire par leur capacité à couper les pro-domaines de facteurs de croissance, tels que l'EGF et le TGF- α activant le récepteur EGFR (**voir section 2.2.3.2.2**) (87; 88). Pour ce qui est des MMPs, elles sont impliquées dans la migration cellulaire de deux façons soit par le remodelage de la matrice extracellulaire et par la maturation des facteurs de croissance. Il existe 25 types de MMP différentes dont plusieurs sont impliquées dans la migration cellulaire soit les MMP-1, -3, -7, 9, 10, -11 -14 et -28 (88). Cependant, au niveau du poumon, seulement les MMP-3, -7, -9, -10 et -11

semblent impliquées dans ce processus. En fait, la MMP-7 (matrilysine) favorise la migration cellulaire en clivant les E-cadherines au niveau des jonctions serrées permettant le détachement des cellules les unes aux autres (81; 88). Pour ce qui est de la MMP-9 (gélatinase B), elle est impliquée dans la migration cellulaire par le remodelage de la matrice extracellulaire (89) tout comme les MMP-3 (stromélysine-1), -10 (stromélysine-2) et -11 (stromélysine-3) (3; 81) en plus d'être impliquée dans la maturation de l'EGF (88).

Suite à la migration, les cellules épithéliales dans l'aire de réparation commencent à proliférer pour ainsi former un épithélium métaplasique épidermoïde transitoire (**figure 12 : étape 3**) (3). Ce processus de régénération nécessite donc la présence de cellules progénitrices. Il est maintenant suggéré que chacune des subdivisions du poumon possède ses propres cellules progénitrices. Par exemple au niveau des alvéoles, ce sont les cellules ATII qui servent de cellules progénitrices pour les cellules ATI et ATII (3; 45; 82). Pour ce qui est de la trachée et des bronches, deux types cellulaires servent de cellules progénitrices. Premièrement, les cellules basales sont considérées comme telles au niveau de l'épithélium des voies aériennes grâce à leur grande capacité à proliférer et à leur habilité à reformer un épithélium (3; 90). Deuxièmement, les cellules de Clara sont aussi connues comme des cellules progénitrices de l'épithélium des voies aériennes, plus particulièrement au niveau de l'épithélium des bronches et des bronchioles. En effet, on note une activation de leur prolifération lors de lésion au niveau de l'épithélium, puis, lorsque l'épithélium est rétabli, ces dernières retournent en quiescence (1; 3). Les MMP sont aussi impliquées dans la prolifération cellulaire. En fait, la MMP-2 et la MMP-9, qui sont toutes les deux des gélatinases (A et B), diminuent la prolifération en inhibant l'attachement des cellules au collagène de type I (81; 88; 91). D'autre part, la MMP-14 qui est aussi exprimée au niveau du poumon stimule la prolifération des cellules de Clara (88).

Finalement, suite à la migration et la prolifération cellulaire, menant à l'établissement d'un épithélium épidermoïde métaplasique transitoire, il y a une re-différenciation progressive pour restaurer un épithélium fonctionnel. En effet, la régénération complète de l'épithélium des voies respiratoires implique, non seulement la ré-

épithélialisation de l'espace dénudé, mais aussi le rétablissement de l'intégrité épithéliale et la re-différenciation cellulaire pour restaurer les fonctions de l'épithélium (**figure 12 : étape 4**) (81). Plusieurs protéines membranaires et facteurs de croissance jouent un rôle important dans la re-différenciation cellulaire. Pour commencer, la MMP-7 et la MMP-9 influencent la reconstitution de l'épithélium des voies respiratoires en modulant la différenciation des cellules ciliées et des cellules sécrétrices. Sur ce, on note l'augmentation progressive de l'expression et de la sécrétion de MMP-7 et -9 lors de la régénération épithéliale (81; 92). De plus, la β -catenine, qui s'associe à la E-cadherine, impliquée dans la migration cellulaire, et à la α -catenine, reliée au cytosquelette, joue un rôle dans la différenciation des cellules alvéolaires de type II (93; 94). Dans un autre ordre d'idée, le facteur de croissance hépatique (HGF) semble impliqué dans la différenciation des cellules bronchiques (95) et l'activation du récepteur EGFR dans la différenciation des cellules muqueuses (96)

2.2.3.3. Régulation de la régénération épithéliale

La régulation des processus de réparation de l'épithélium pulmonaire est complexe. Elle dépend de l'interaction de multiples facteurs initiateurs, de ligands solubles, de voies de signalisation et de facteurs environnementaux qui seront présentés dans les sections suivantes.

2.2.3.3.1. Rôle des facteurs solubles dans la régénération épithéliale

Il a été montré que les lésions au niveau de l'épithélium, ainsi que la réponse inflammatoire qui s'en suit, entraînent la sécrétion d'une variété de facteurs solubles par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages ainsi que par les cellules épithéliales à proximité de la lésion. On note parmi ces composés la présence de facteurs de croissance épidermiques (EGF), transformants (TGF- α et TGF- β), des kératinocytes (KGF), des hépatocytes (HGF), des fibroblastes (FGF) et dérivés des plaquettes (PDGF) ainsi que des cytokines (l'IL-2, l'IL-4, l'IL-13, le TNF- α ...), des

chémokines (MCP-1), des prostaglandines (PGE2) et des composantes de la matrice extracellulaire (MMP) (3). Ces facteurs solubles participent tous à la régénération épithéliale. Pour commencer, il a été montré, au niveau des bronchioles de souris ainsi qu'au niveau de cellules épithéliales bronchiques (16HBE), que l'expression d'EGF (*epidermal growth factor*) et de TGF- α (*transforming growth factor- α*) est augmentée dans les deux premiers jours suivant la formation de lésions et favorise la réparation de l'épithélium (3; 76). Pour ce qui est de l'expression d'EGF, nous avons précédemment montré au laboratoire de Dre Brochiero que l'EGF, sécrété par les cellules épithéliales, était impliqué dans la réparation des cellules alvéolaires de type II et des cellules bronchiques (44; 45). En effet, suite à une lésion, les cellules épithéliales sécrèteraient de l'EGF qui viendrait activer le récepteur EGFR entraînant la stimulation de la migration et de la prolifération cellulaire (**voir section : 2.2.3.3.2**)(44; 45) Le TGF- α , entraîne aussi l'activation du récepteur EGFR qui, par sa voie catalytique, favorise les processus de réparation (3; 76). D'autre part, le HGF participe aussi à la régénération épithéliale. En effet, il renverse l'effet inhibiteur du TGF- β sur la prolifération cellulaire et stimule l'expression du facteur de croissance angiogénique (VEGF) et de son récepteur sur les cellules endothéliales (97). De son côté, le KGF stimule la prolifération cellulaire de l'épithélium alvéolaire et des voies respiratoires lors de la croissance des poumons, mais il ne semble pas être impliqué dans la réparation (3; 97; 98).

Les cytokines ont un rôle complexe dans la réparation. Par exemple, l'IL-13, tout comme l'IL-1 β , entraîne la sécrétion de TGF- α et de HB-EGF menant à l'activation du récepteur EGFR stimulant ainsi la prolifération et la migration des cellules épithéliales bronchiques de la lignée des HBE et des cellules alvéolaires (99). Cependant, dans les cellules Calu-3, qui sont des dérivées des cellules séreuses de voies respiratoires humaines, l'IL-13, par l'activation d'une réponse immunitaire, diminue leur migration (3). Ainsi, il semblerait que l'effet de cette cytokine diffère selon le type cellulaire. Pour ce qui est de l'IL-4, elle semble avoir les mêmes effets que l'IL-13 dans ces deux types cellulaires, cependant, l'activation de la migration des cellules HBE semble plutôt être due à l'activation des récepteurs à l'insuline (3; 100). Dans le cas de l'IL-2, il semblerait qu'elle favorise la migration et réduise

l'apoptose des cellules alvéolaires de type II via l'activation de la voie ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) (3).

D'autre part, le TNF- α , qui est présent dans plusieurs pathologies inflammatoires pulmonaires, tel que l'asthme (101; 102) et la fibrose kystique (103; 104) (**voir section : 3.3.2**), le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) et la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (102), a aussi un rôle très complexe dans la réparation. En effet, cette cytokine, dépendamment du type cellulaire, joue un rôle pro- ou anti-apoptotique (105; 106). En effet, le TNF- α , par sa fixation à son récepteur peut activer les caspases 3 et 8 induisant l'apoptose tout en activant les voies de signalisation de p38 d'AKT et de NF κ B favorisant la prolifération cellulaire (106). D'autre part, le TNF- α , par son action sur NF κ B, modulerait l'expression de gènes anti-apoptotiques et proliférateurs (105). Par ailleurs, il a été montré que le TNF- α inhibait la prolifération des cellules ATII via l'augmentation de l'expression d'IGFBP-2 (*insulin-like growth factor binding protein-2*) (107), mais qu'il favorisait la prolifération et la migration des hépatocytes et des cellules épithéliales mammaires (87; 108) et gastriques (109) par l'activation d'EGFR via la sécrétion de TGF- α et d'EGF. En effet, il a été montré que suite à sa fixation à son récepteur, le TNF- α entraîne l'activation de métalloprotéinases (ADAM et MMP) permettant la maturation de l'EGF et du TGF- α pouvant activer le récepteur EGFR (87; 108). Bref, le rôle des cytokines sur la réparation n'est pas très bien établi et, dépendamment des voies de signalisation activées et du type cellulaire, son rôle semble varier. Il serait donc pertinent d'approfondir les recherches sur ce sujet.

2.2.3.3.2. Rôle des récepteurs membranaires dans la régénération épithéliale : exemple du récepteur EGFR

Les facteurs de croissance, tels que l'EGF, le TGF- α et le HB-EGF, exercent leur effet biologique via leur fixation au récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR). Au niveau des voies aériennes, on retrouve les récepteurs EGFR de type erbB1, erbB2 et erbB3 (110). Le récepteur EGFR occupe un rôle important comme

régulateur principal des fonctions des cellules épithéliales. De plus, il est impliqué dans la réparation épithéliale de la peau, des voies gastro-intestinales et dans des modèles animaux de lésions pulmonaires aiguës (76). En effet, l'activation d'EGFR est une composante intrinsèque de l'activation des processus de réparation et implique la relâche de ligand par des voies de signalisation autocrine (3; 76). D'ailleurs, on note un plus grand nombre de récepteurs EGFR actifs en bordure de la plaie lors de tests de réparation sur les cellules épithéliales bronchiques 16HBE (76).

Le récepteur EGFR est une glycoprotéine membranaire de 170 kDa possédant une activité tyrosine kinase. Le récepteur est composé d'un domaine N-terminal extracellulaire, contenant deux domaines riches en cystéines permettant la fixation des ligands, un domaine transmembranaire, constitué d'une hélice alpha unique, et d'un domaine cytoplasmique en C-terminal possédant une activité protéine tyrosine kinase qui permet l'interaction avec des protéines contenant les motifs SH2 (*Src homology 2*) et PTB (*phospho-tyrosine binding*). L'activation du récepteur EGFR peut se faire de deux façons différentes. Premièrement, suite à la fixation d'un ligand, les récepteurs EGFR se dimérisent grâce à la phosphorylation de résidus tyrosine en C-terminal (111). Deuxièmement, la dimérisation des récepteurs peut se faire de façon intrinsèque via l'activation d'autres récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et les TLR (110). Suite à la phosphorylation de ses tyrosines kinases, le récepteur EGFR entraîne l'activation de voies de signalisation telles que les voies ERK et PI3K qui sont impliquées dans la migration et la prolifération cellulaire (112). De plus, il a été montré au laboratoire de Dre Brochiero que, suite à l'activation du récepteur EGFR dans les cellules ATII et bronchiques, on observe une stimulation des canaux K^+ K_vLQT1 et K_{ATP} dont la fonction est cruciale pour la réparation de ces deux épithéliums (**voir section 2.1.3.3.3**) (44; 45) (**figure 13**).

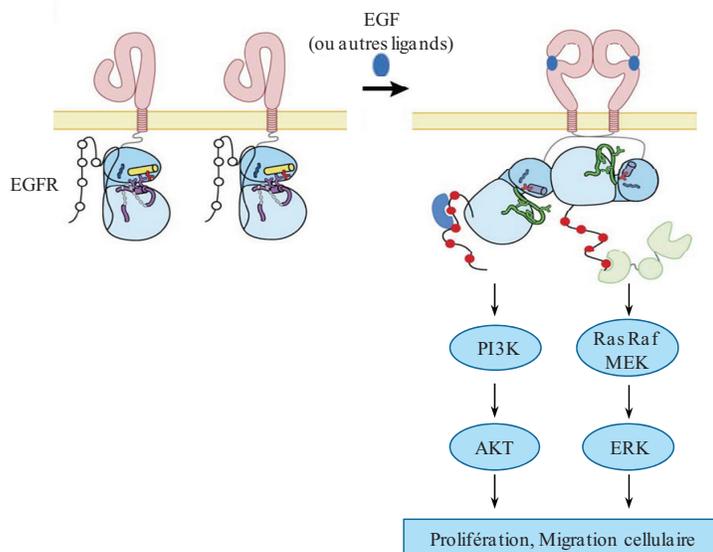


Figure 13: Activation et voies de signalisation du récepteur EGFR. Suite à la liaison d'un ligand au domaine extracellulaire du récepteur EGFR, ce dernier se dimérise et enclenche la phosphorylation des résidus tyrosines permettant l'activation de différentes voies de signalisation telles que la voie de ERK et de AKT impliquées dans la prolifération et la migration cellulaire. (modifié de: Yu FS et al. *Brain Res Bull* 2010 et Zhang X et al. *Cell* 2006)

2.2.3.3.3. Rôle des canaux ioniques dans la régénération épithéliale

La fonction des canaux ioniques et des transporteurs est intimement reliée à la migration cellulaire. En effet, dépendamment de leur type, les canaux ioniques et les transporteurs modulent la « machinerie de migration » du cytosquelette en modifiant la concentration intracellulaire de calcium ou le volume de la cellule migrante par exemple (84). Selon le modèle proposé par le Dr Schwab (84) (**figure 14**), la présence des échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ainsi que des co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ et $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ au devant de la cellule entraînerait l'influx de Cl^- et de Na^+ permettant ainsi une entrée d'eau dans la cellule (84; 113). Ce phénomène mènerait à l'augmentation graduelle du volume cellulaire favorisant la formation du lamellipode et l'avancée des protusions. Ceci induirait une tension à la membrane plasmique entraînant l'activation des canaux Ca^{2+} mécano-sensibles. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} à l'arrière de la cellule entraînerait l'activation des canaux K^+ , tels que KCa3.1 . Puis, le flux de potassium à l'arrière de la cellule mènerait à une sortie d'eau entraînant la rétractation du corps cellulaire (84; 113).

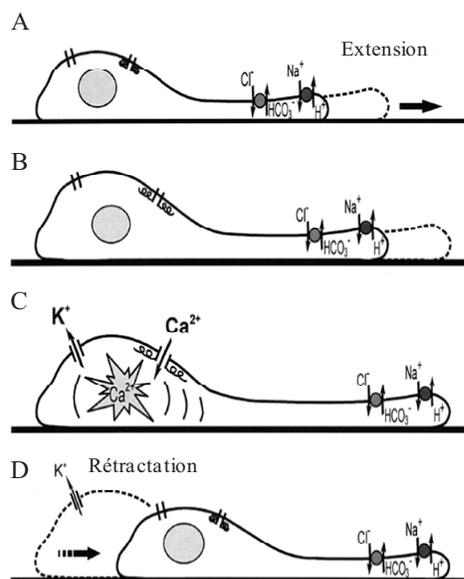


Figure 14: Modèle du rôle des mécanismes de transport ionique dans le processus de migration cellulaire. Le gain d'eau dans la cellule, dû à un changement osmotique, entraîne l'activation des échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ à l'avant de la cellule migrante contribuant à l'extension du lamellipode (A et B). L'augmentation du volume cellulaire et de la tension membranaire induit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} via l'activation des canaux calciques activés par l'étirement de la membrane entraînant la rétractation de l'arrière de la cellule suite à l'efflux de K^+ via l'activation de canaux K^+ (C et D). (figure tiré de: Schwab A. *AJP* 2001)

De plus, il a été montré que l'activation des canaux K^+ permet de maintenir un potentiel membranaire essentiel à l'influx de calcium indispensable à la migration cellulaire (114). En effet, il a été montré au niveau des intestins que l'hyperpolarisation des cellules intestinales, via l'activation des canaux potassiques $\text{Kv}1.1$ et $\text{Kv}1.5$, entrainerait un influx de calcium et une réparation plus rapide des lésions au niveau de cet épithélium (115). Par ailleurs, des études menées au laboratoire de Dre Brochiero montrent que l'activité des canaux potassiques KvLQT1 et K_{ATP} joue un rôle important dans la réparation de l'épithélium alvéolaire et que les canaux KvLQT1 , K_{ATP} et $\text{KCa}3.1$ sont impliqués dans la réparation de l'épithélium bronchique en favorisant la migration et la prolifération cellulaire (44; 45). Il a aussi été montré que les canaux potassiques, tels que le canal $\text{Kv}1.3$, peuvent interagir directement avec les intégrines et réguler la fonction de ces dernières et ainsi l'adhésion et la migration cellulaire (116).

En plus d'être impliqués dans la migration cellulaire, les canaux ioniques jouent aussi un rôle dans la prolifération cellulaire. Il a été montré par exemple que l'activation des canaux potassiques entraîne une hyperpolarisation de la membrane, une diminution du volume cellulaire et une activation de canaux calciques favorisant la progression du cycle cellulaire de la phase G_0 à G_1 (8; 117-119).

En conclusion, les canaux ioniques sont impliqués dans différents processus de la régénération épithéliale tels que la migration cellulaire, par la formation de lamellipodes et la rétractation de l'arrière de la cellule, et la prolifération cellulaire par leur implication dans l'activation de voies de signalisation et dans la progression du cycle cellulaire.

2.2.3.4. Fibrose et remodelage bronchique

Dans plusieurs pathologies, telles que la fibrose kystique, l'asthme, le syndrome de bronchiolite oblitérante, la maladie pulmonaire obstructive chronique et la fibrose idiopathique pulmonaire, on note au niveau de l'épithélium pulmonaire la présence de remodelage épithélial et éventuellement le développement de fibrose (120; 121). Le remodelage tissulaire est une conséquence des processus de réparation représentant un processus dynamique associé à la production et à la dégradation de matrice en réaction à un processus inflammatoire. En effet, dépendamment de la capacité de réparation, on observe une reconstitution normale ou pathologique des tissus (121). En fait, lorsque l'inflammation est chronique et/ou que le besoin de réparation est continu, on note l'accumulation de composantes de la matrice extracellulaire entraînant du remodelage tissulaire (120; 122).

Le remodelage des voies aériennes inclut plusieurs changements structuraux tels que la perte d'intégrité épithéliale, le durcissement de la membrane basale, une fibrose sous-épithéliale ainsi qu'une hypertrophie des glandes sous-muqueuses et des cellules muqueuses (123). Pour commencer, l'altération épithéliale associée au remodelage inclut le détachement de l'épithélium, la perte des cellules ciliées et l'hyperplasie des cellules muqueuses (123; 124). L'hyperplasie de ces cellules en plus de celle des glandes sous-muqueuses entraîne une augmentation de la production de sputum et, par conséquent, un rétrécissement des voies aériennes. Un autre aspect du remodelage des voies aériennes est la fibrose sous-épithéliale. Cette fibrose se produit dans la lamina reticularis, en dessous de la membrane basale. La fibrose est le résultat de l'augmentation des protéines de la matrice extracellulaire produites par les

fibroblastes telles que le collagène de type I, III et V, la fibronectine et la tenascine (123). Plus précisément, les fibroblastes dirigent la production et la dégradation de la matrice extracellulaire lors des processus de réparation ainsi que la production d'enzymes, d'activateurs pro-inflammatoires et de modulateurs de la réponse immunitaire stimulant le dépôt de composantes du tissu conjonctif impliquées dans le remodelage et la destruction de l'architecture normale des tissus (101; 121). De plus, comme les fibroblastes expriment à leur surface une variété de TLR, la présence de ligands de ces récepteurs peut directement activer les fibroblastes et promouvoir leur différenciation en myofibroblastes (122). Les myofibroblastes, qui dérivent aussi des cellules épithéliales lors de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), sont responsables de l'accumulation de matrice extracellulaire et de collagènes de type I, III et V au niveau des tissus conjonctifs sous-muqueux associés à la pathologie de l'asthme (121; 122). Finalement, le muscle lisse semble aussi impliqué dans le remodelage bronchique. En effet, lors de ce processus on observe une hypertrophie et une hyperplasie des cellules de muscles lisses ce qui augmente la masse musculaire des voies aériennes. De plus, ces cellules semblent être impliquées dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de protéines de la matrice extracellulaire et de chémokines favorisant le remodelage (124).

Il existe plusieurs modulateurs impliqués dans le remodelage tissulaire et le développement de fibrose. Premièrement, le TGF- β , qui a été le régulateur le plus étudié de la matrice extracellulaire, semble impliqué dans le développement de fibrose dans de nombreuses pathologies (3; 101; 122). En effet, suite à l'activation de son récepteur, le TGF- β entraîne l'activation des protéines Smad connues pour moduler la transcription de pro-collagène I et III (101). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que le TGF- β dérivé des macrophages entraîne le développement de fibrose en activant directement les cellules résidant dans le mésenchyme comme les cellules épithéliales qui se différencient en myofibroblaste lors de la transition épithéliale-mésenchymateuse (122). Les cytokines de type Th2 sont aussi impliquées dans les mécanismes de fibrose. En effet, il a été montré que la surexpression d'IL-13 (125), tout comme celle d'IL-4 (126), au niveau des poumons entraîne le développement de fibrose au niveau des voies respiratoires. De plus, il existe des

évidences montrant que les cytokines de type Th2 coopèrent avec le TGF- β pour induire la production de fibrose. En effet, il a été montré que l'IL-13 induit la production de TGF- β latent dans les macrophages et qu'il peut servir comme activateur indirect du TGF- β en régulant à la hausse l'expression de protéines permettant l'activation de ce dernier (122; 127). Pour ce qui est des chémokines, qui sont des chémoattractants de leucocytes, ils coopèrent avec les cytokines pro-inflammatoires dans le développement de fibrose et dans le recrutement des myofibroblastes et des macrophages (122). Ainsi, le phénomène de fibrose pulmonaire et d'EMT est également finement régulé par de nombreuses composantes pulmonaires.

3. Pathologie de la Fibrose Kystique

La Fibrose Kystique est une maladie autosomale récessive qui touche une naissance sur 2500 au niveau de la population caucasienne (128) et, plus précisément, une naissance sur 3600 au Canada (www.cysticfibrosis.ca). Cette maladie est causée par la mutation du gène *CFTR* codant pour la protéine CFTR formant un canal chlore situé à la membrane apicale des cellules épithéliales (64; 97; 128). Ce défaut au niveau du CFTR entraîne des défaillances au niveau des poumons, des intestins, du foie, des glandes sudoripares et du système reproductif (97; 128). Cependant, la morbidité et la mortalité associées à la Fibrose Kystique résultent majoritairement de la progression de l'atteinte pulmonaire caractérisée par un cycle d'obstruction des voies aériennes, d'infections bactériennes et d'inflammation chroniques pouvant entraîner une bronchiectasie et une insuffisance respiratoire (104; 129). À ce jour, la survie moyenne des patients atteints de Fibrose Kystique est d'environ 39 ans (www.cysticfibrosis.ca).

3.1. Classe de mutation du gène *CFTR*

Le gène *CFTR* ainsi que les mutations associées à la pathologie de la Fibrose Kystique ont été identifiés en 1989 (130). On a ensuite montré que l'activité de la protéine CFTR était déficiente chez les patients de Fibrose Kystique du pancréas (64). Le gène *CFTR*, situé sur le chromosome 7 (128; 131), consiste en 27 exons qui codent pour un transcrit mature de 6.5 kb formant une protéine de 1480 acides aminés d'approximativement 168 kDa (128). Jusqu'à maintenant, plus de 1800 mutations ont été définies tout au long du gène *CFTR* (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app). Les mutations du gène *CFTR* ont été classées en cinq différents groupes selon le mécanisme par lequel elles affectent la fonction du CFTR (128) (**figure 15**).

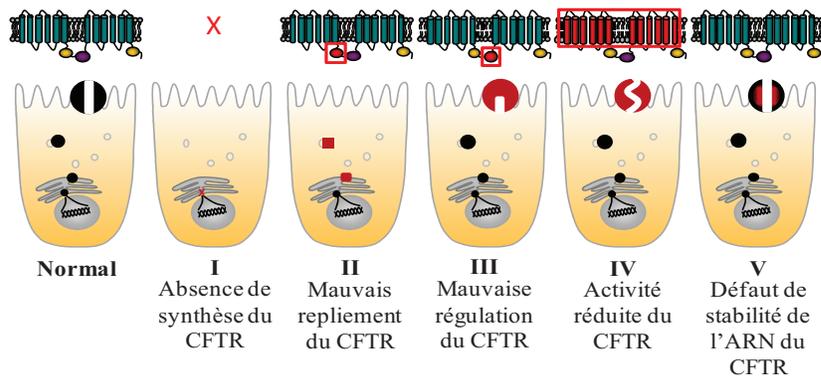


Figure 15: Mutation du CFTR. Schématisation des cinq classes de mutations du gène *cftr* (adapté de Proesmans M et al. *Eur. J. Pediatr.* 2008)

3.1.1. Mutation de classe I : ARN tronqué

Les mutations de classe I causent un problème de biosynthèse de la protéine du CFTR. Cette classe de mutation englobe plusieurs types de mutations différentes telles que les mutations faux-sens menant au remplacement d'un nucléotide par un autre, les mutations causant un décalage du cadre de lecture, les mutations au niveau du promoteur qui réduisent l'efficacité de transcription et les mutations non-sens changeant un nucléotide menant à l'insertion d'un codon stop. Ces types de mutations mènent à la création de protéines tronquées ou à l'absence totale de protéine (68; 131; 132). Les patients ayant ce type de mutation n'ont donc pas de protéine CFTR fonctionnelle à la membrane et montrent alors un phénotype clinique sévère avec l'apparition précoce d'une insuffisance pancréatique et d'une maladie pulmonaire

progressive (131). Les mutations non-sens telles que G542X, soit la deuxième mutation la plus commune, ainsi que W1282X, R553X, Q39X, E60X, R75X, L719X, Y1092X et S1196X sont des exemples de mutations de la classe I et représentent ensemble 5 à 10% du nombre total d'allèles mutés chez les patients FK (132; 133).

3.1.2. Mutation de classe II : Dégradation de la protéine mal repliée

Les protéines CFTR ayant des mutations de classe II sont traduites, mais sont mal repliées ce qui les rend incapables de prendre une conformation tertiaire appropriée. La protéine CFTR immature est retenue et dégradée au niveau du réticulum endoplasmique suite à sa polyubiquitination et le recrutement de protéasome (131; 132). On observe alors une absence de CFTR mature à la membrane apicale des cellules épithéliales (131). La plus commune des mutations de CFTR, comptant pour approximativement 70% des allèles affectés en Fibrose Kystique, est une délétion d'une phénylalanine à la position 508 ($\Delta F508$) localisée dans le NBD1 (131; 133). Même si cette délétion entraîne un changement minime au niveau de la structure du NBD1, elle mène à une mauvaise interaction entre le NBD1 et les deux MSD empêchant l'interaction du NBD2 au MSD1 (**figure 16**). Ceci a donc pour conséquence une augmentation de la sensibilité aux protéases des domaines NBD2 et MSD1 expliquant la dégradation rapide de cette protéine au niveau du réticulum endoplasmique (29). Les mutations de classe II sont associées à un phénotype sévère tout comme les mutations de la classe I (132; 133).

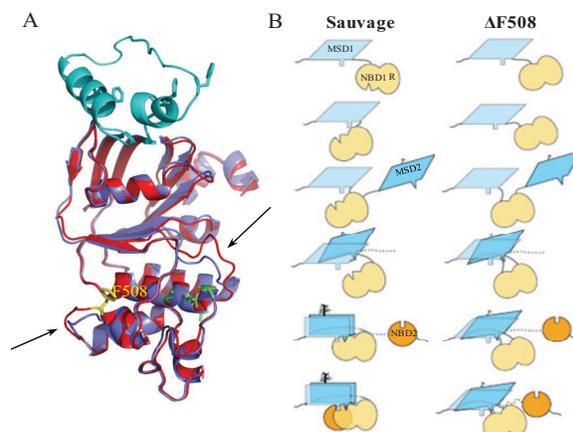


Figure 16: Conséquences de la mutation $\Delta F508$. **A)** superposition de la structure secondaire de la protéine sauvage et $\Delta F508$. Les flèche indiquent les boucles qui diffèrent entre les deux structures. **B)** Modélisation du repliement de la protéine CFTR sauvage et de celle comportant la délétion F508. (image tirées de: Riordan J.R. *Annu. Rev. Biochem.* 2008)

3.1.3. Mutation de classe III : Mauvaise régulation du canal

Les mutations de classe III entraînent la bonne production et progression de CFTR dans le cytoplasme, son transport et son insertion à la membrane apicale. Cependant, la protéine est résistante à la phosphorylation ou à la fixation de l'ATP ce qui empêche sa régulation et son activation. Un exemple de ce type de mutation est un remplacement de la glycine par un acide aspartique au codon 551 (G551D) situé sur le NBD1. Cette mutation est la troisième mutation la plus commune chez les patients fibrose kystique. Elle démontre un défaut dans l'attachement de l'ATP et ne permet pas de courant chlore même en présence d'une grande quantité d'AMPc (132; 133). Elle est associée à une insuffisance pancréatique et un phénotype sévère. D'autres mutations de classe III interfèrent avec l'attachement et l'hydrolyse de l'ATP ou la phosphorylation du domaine R et diminuent la fonction du CFTR selon différents degrés. Ces mutants incluent S1255P, G551S, G1244E et G1349D (132).

3.1.4. Mutation de classe IV : Réduction d'activité du canal

Les mutations appartenant à la classe IV sont localisées dans les segments impliqués dans la formation du pore tels que les boucles intracellulaires et les domaines transmembranaires. Lors de ce type de défaut, la protéine CFTR peut être produite, transportée et insérée à la membrane apicale. Cependant, ces canaux démontrent une réduction de leur conductance. Par exemple, la mutation R347P affecte le flot d'ions Cl⁻ alors que les mutations R117H et P574H réduisent le temps d'ouverture du canal. Les mutations de classe IV sont associées à un phénotype moins sévère que les classes I à III (131-133).

3.1.5. Mutation de classe V : Défaut de stabilité de l'ARN

Récemment, une nouvelle classe de mutation a été ajoutée, soit la classe V. Les mutations de classe V englobent les mutations au niveau du promoteur du CFTR, les mutations à l'intérieur des introns régulant la maturation de l'ARNm et la substitution

d'acides aminés tous causant une dérégulation au niveau de la transcription *CFTR* réduisant le nombre de canaux *CFTR* à la membrane. En général, les mutations de classe V sont associées à une suffisance pancréatique et à un phénotype moins sévère de la Fibrose Kystique (131; 132).

3.2. Relation génotype-phénotype

Le phénotype de la Fibrose Kystique est hautement hétérogène entre les patients FK et même entre ceux ayant des mutations de *CFTR* identiques (128). En effet, parmi la variété de manifestations cliniques de la Fibrose Kystique, seulement la fonction pancréatique corrèle vraiment avec le génotype du *CFTR*. En fait, les patients ayant un des deux allèles portant une mutation moins sévère (mutation de classe IV ou V) démontrent une suffisance pancréatique alors que les patients homozygotes ou portant deux allèles avec des mutations de classe I, II ou III souffrent d'une insuffisance pancréatique. L'atteinte pancréatique se caractérise par le blocage des conduits du pancréas, dû à l'absence de *CFTR*, empêchant les enzymes pancréatiques de se rendre au petit intestin créant une sérieuse carence nutritive (128).

Par contre, il n'existe pas vraiment de corrélation entre le génotype et le phénotype pour l'atteinte des glandes sudoripares et du système reproducteur masculin puisque ces dernières sont présentes chez tous les patients. En fait, l'absence de *CFTR* au niveau des cellules épithéliales des conduits des glandes sudoripares augmente à différents degrés la concentration de sel dans la sueur, dû à l'absence d'absorption de Cl^- . Pour ce qui est de l'atteinte du système reproducteur masculin, on note que l'absence de *CFTR* entraîne l'obstruction de l'épididyme empêchant la maturation des spermatozoïdes et leur transport dans le canal déférent (128; 134).

Aussi, l'atteinte pulmonaire est très variable même chez les patients ayant les mêmes mutations (128). En effet, une étude a démontré que chez deux jumeaux identiques ayant donc les mêmes mutations et le même environnement familial, on n'observait pas la même atteinte pulmonaire (128; 135). On peut supposer que la mauvaise corrélation entre le génotype et le phénotype pulmonaire chez ces jumeaux pourrait

s'expliquer en partie par une modulation différente de leurs gènes dus à une régulation épigénétique différente.

Dans d'autres cas, la mauvaise corrélation entre le génotype et le phénotype peut s'expliquer en partie par la présence de gènes modificateurs. En effet, un polymorphisme au niveau du promoteur du gène du TNF- α est associé à l'augmentation de la transcription de cette cytokine et à une atteinte pulmonaire plus sévère. Aussi, un polymorphisme au niveau du gène TGF- β , associé à la prolifération de fibroblastes, accélère le déclin de la fonction pulmonaire (128).

3.3. Pathologie pulmonaire

3.3.1. Dysfonction du transport des fluides et des ions

On note au niveau de l'épithélium des voies aériennes des patients FK, une absence du canal CFTR à la membrane apicale. Malgré la présence de canaux Cl^- alternatifs (comme CaCC), la dysfonction du canal CFTR entraîne une diminution importante de la sécrétion de Cl^- et une déshydratation de l'ASL (64; 129; 131; 136; 137). D'autre part, la protéine CFTR est impliquée dans la régulation d'autres canaux pouvant aussi jouer dans la pathologie de la Fibrose kystique. En effet, l'absence d'activité ou de protéine CFTR entrainerait un déséquilibre au niveau du transport de Na^+ et de Cl^- menant à une diminution du liquide de surface des voies aériennes expliquant en partie la déshydratation de l'ASL associé à la FK (129) (Itani O.A. 2011). La présence d'infection contribue aussi à la diminution de l'ASL. Par exemple, une infection rapide des voies aériennes FK au virus respiratoire syncytial (RSV) entraîne une surexpression de l'ectoenzyme responsable de la métabolisation de l'ATP causant une diminution de l'ATP qui contrôle l'inhibition du canal ENaC et l'activation du canal CFTR (131).

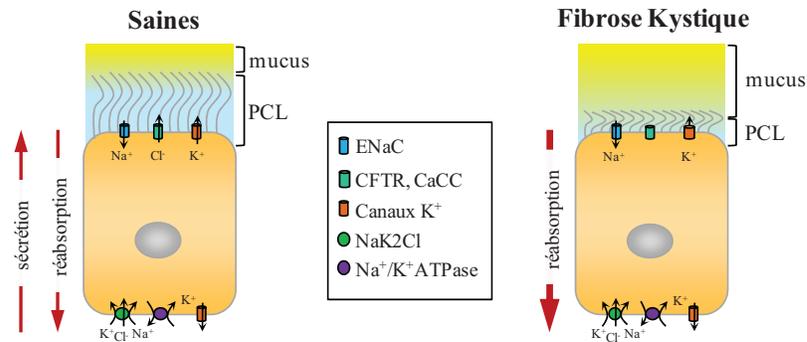


Figure 17: Transport ionique des voies aériennes saines et Fibrose Kystique. Schéma représentant les principaux transporteurs, pompes et canaux impliqués dans le transport de fluides des voies aériennes. L'absence de transport de Cl^- mène à l'augmentation de la réabsorption de liquide entraînant une diminution du liquide périciliaire (PCL) et une accumulation et concentration du mucus.

La diminution du volume de surface des voies aériennes entraîne la déshydratation du liquide périciliaire et de la couche de mucus causant plusieurs conséquences (64; 129; 136; 137). Pour commencer, l'effondrement du volume périciliaire empêche les cils des cellules ciliées de battre de façon adéquate (**figure 17**). Cette défaillance du mouvement cilié mène alors à une mauvaise clairance mucociliaire, et donc à une mauvaise élimination des pathogènes emprisonnés dans le mucus favorisant le développement d'infections chroniques, principalement à *Staphylococcus aureus* et à *Pseudomonas aeruginosa* (68; 131; 137). De plus, le mucus étant un micro-environnement hypoxique, il favorise la formation de biofilms bactériens (68). Pour ce qui est de la déshydratation de la couche de mucus, elle entraîne, avec son adhésion à la surface cellulaire, à l'obstruction des voies aériennes, une des caractéristiques importantes de la pathologie de la Fibrose Kystique (128; 136-138). Aussi, la couche de mucus tapissant l'épithélium des voies aériennes des patients FK étant plus concentrée en mucine que la couche de mucus normale (8% de la composition au lieu de 1%), elle entraîne la formation d'un mucus plus visqueux, collant, élastique plus difficile à éliminer et avec des pores plus petits rendant difficile la pénétration des neutrophiles. Ceci empêche ces derniers de capturer et d'éliminer les pathogènes emprisonnés dans le mucus (64).

3.3.2. L'infection et l'inflammation reliées à la Fibrose Kystique

Comme il a été mentionné plus tôt, l'une des principales caractéristiques de l'atteinte pulmonaire en Fibrose Kystique est la présence importante d'infection et d'inflammation chronique au niveau de l'épithélium des voies aériennes. En effet, les infections bactériennes apparaissent en bas âge chez les patients FK et sont difficiles à éliminer. Tôt dans l'enfance les infections à *Staphylococcus aureus*, à *Haemophilus influenzae* et au RSV sont communes. Cependant, les infections à *Pseudomonas aeruginosa* (PA) prennent par la suite place et PA devient le pathogène majeur des voies aériennes des patients FK (79). En fait, elle est présente chez plus de 85% des patients FK dès l'adolescence. De plus, une partie des patients adultes sont aussi infectés à *Burkholderia cepacia*, un pathogène complexe difficile à éliminer. Les infections chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Burkholderia cepacia* deviennent la plupart du temps chroniques chez les patients affectés (68; 129; 131).

L'une des propriétés des bactéries *P. aeruginosa* retrouvées dans les poumons FK est leur grande capacité à muter qui leur permet de survivre dans les voies respiratoires. En effet, elles peuvent réagir promptement à leur environnement non seulement en inhibant ou en activant différents gènes, mais aussi en augmentant la fréquence d'événements de mutation dans leur génome. Une telle mutation peut leur permettre par exemple de passer d'un phénotype planctonique à un phénotype mucoïde tel qu'observé en FK (129; 139). Face à des contraintes environnementales, telles que l'absence de nutriments ou d'oxygène caractéristique du mucus FK, les mutants ainsi formés entraînent une trop grande production d'exo-polysaccharides mucoïdes. Ces polysaccharides entourent les bactéries les protégeant contre la clairance mucociliaire et la réponse immunitaire (129). De plus, les bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent sécréter de l'élastase et des protéases alcalines qui leur permettent d'échapper à la réponse immunitaire en clivant les immunoglobines, les composantes des compléments et les cytokines (129; 140). D'autres parts, l'exotoxine A inhibe la phagocytose de ces pathogènes et supprime la réponse immunitaire à médiation cellulaire (129). Une autre façon pour les bactéries de se protéger contre les mécanismes de défense est de former des biofilms comme dans les poumons FK

(68; 129; 131; 136). Dans cet état, les micro-colonies de bactéries sont enveloppées d'une dense matrice les protégeant contre la phagocytose et prévenant la pénétration des agents antibiotiques (65; 129; 131). Ces caractéristiques permettant la survie des bactéries, même en présence d'antibiotiques et d'une réponse immunitaire, explique en partie la chronicité des infections à *P. aeruginosa*.

L'une des conséquences importantes des infections bactériennes persistantes est la réponse inflammatoire qu'elles engendrent (136). Cette inflammation peut être causée par l'infection de plusieurs façons. Premièrement, la présence des bactéries mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En effet, les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, comme plusieurs autres types de bactéries, détiennent différentes classes d'adhésines, telles que les pilis et les flagelles, pouvant se fixer à des récepteurs, tel que l'asialoGM1, et ainsi activer le facteur de transcription NFκB responsable de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Le récepteur asialoGM1 est présent en plus grande abondance au niveau des cellules épithéliales des voies respiratoires des patients FK permettant une plus grande capacité d'adhérence pour ces bactéries aux cellules FK qu'aux cellules normales (129). D'autre part, les éléments sécrétés par les bactéries peuvent aussi activer une réponse inflammatoire via l'activation des TLR (**voir section : 2.2.2.1**). Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) sécrétés par les bactéries gram-négatives, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, se fixent au TLR-4 permettant aussi l'activation du facteur de transcription NFκB. L'activation de ce facteur de transcription entraîne la synthèse de TNF-α, d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8, de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et d'IRAP (*interleukin-1 receptor antagonist*) (104; 141; 142). Ces cytokines sont très présentes dans les lavages broncho-alvéolaires des patients Fibrose Kystique.

Cependant, la présence d'inflammation ne semble pas seulement être une conséquence directe de l'infection présente chez les patients FK. En effet, des études ont montré que les voies respiratoires FK présentent une inflammation dès la jeune enfance, même avant l'apparition de pathogènes (103; 129; 141; 143; 144). Ceci suggère que la réponse inflammatoire est en partie indépendante d'un stimulus infectieux et probablement dû au défaut même du CFTR (103; 129; 143; 145; 146).

En effet, il a été montré que l'inhibition de CFTR dans des cellules épithéliales augmente la sécrétion de cytokine ainsi que l'activation de NF κ B (147). Aussi, on note au niveau des cellules FK une autophagie déficiente causée par la diminution de niveau de protéine becline-1 entraînée par la surproduction d'espèces réactives oxygénées (ROS) par les cellules FK. Ceci entraîne l'accumulation de protéines CFTR non fonctionnelles et mal repliées dans les cellules causant le déclenchement d'une réponse inflammatoire (146).

La réponse inflammatoire associée à la Fibrose Kystique est excessive et plusieurs éléments de cette pathologie peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, les voies respiratoires des patients FK sont déficientes en cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, en récepteur soluble du TNF- α , en antagoniste du récepteur de l'IL-1 ainsi qu'en oxyde nitrique (103; 104; 141). La déficience en IL-10 et en oxyde nitrique mène à la dysfonction d'I κ B, soit la protéine responsable de l'inactivation de NF κ B ce qui a donc pour conséquence l'activation continue de ce facteur de transcription impliqué dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (103; 104). Aussi, on note au niveau des voies aériennes des patients FK l'établissement d'un cycle vicieux d'infections et d'inflammation encourageant la persistance de ces phénomènes, la promotion de l'obstruction des voies aériennes et la destruction de l'architecture des voies aériennes (103). Ce cycle vicieux d'infection et d'inflammation est alimenté de plusieurs façons différentes. Pour commencer, les cytokines présentes dans les expectorations des patients FK peuvent elles-mêmes entraîner la sécrétion d'autres cytokines expliquant la présence continue d'inflammation. Par exemple, la présence de TNF- α et d'IL-1 β entraîne la production d'IL-6 et d'IL-8 par les macrophages et les cellules épithéliales (103; 142). D'un autre côté, les processus inflammatoires entraînent un influx massif de neutrophiles dans la lumière des voies respiratoires qui est en grande partie dû à la présence excessive d'IL-8 (103; 131). L'élastase produite par ces neutrophiles ainsi recrutés est responsable de la production d'IL-8 ce qui crée un cycle vicieux entre la production d'IL-8 et le recrutement des neutrophiles. De plus, le TNF- α et l'IL-1 β augmentent l'habilité des neutrophiles à répondre aux chémoattractants, tels que l'IL-8, et augmentent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles

(CD11 et CD18) et des cellules épithéliales (ICAM-1) ce qui accentue ce cycle vicieux (103).

3.3.3. Lésions et remodelage associés à la Fibrose Kystique

L'infection chronique et la réponse inflammatoire excessive, causées principalement par un défaut au niveau des mécanismes de défense, sont en grande partie responsables du développement de lésions épithéliales pulmonaires et du remodelage associés à la Fibrose Kystique (103; 141). En effet, la relâche excessive de protéases, incluant l'élastase produite par les neutrophiles et les bactéries, joue un rôle important dans le développement de lésions pulmonaires, en perturbant les fibres d'élastines et d'autres protéines de la matrice et en augmentant la dégradation tissulaire (141). De plus, le TNF- α produit lors de la réponse inflammatoire entraîne le déclenchement d'une réponse oxydative régulée par les neutrophiles responsables de la détérioration de l'épithélium FK (103).

Outre les bronchiectasies caractéristiques, l'analyse des poumons FK a montré plusieurs différences histologiques par rapport aux poumons sains. En effet, l'épithélium des voies aériennes des patients FK se caractérise par des anomalies au niveau des cils des cellules ciliées, une hyperplasie des cellules basales, une hyperplasie et une augmentation du nombre des cellules muqueuses, des zones de métaplasie et de régénération (138; 148). De plus, au niveau de l'épithélium alvéolaire, on note chez les patients FK des zones lésées, des zones de réparation et des zones qui sont restées intactes. Au niveau des poumons FK, ce sont les petites voies aériennes qui sont les premières à être sujettes à des lésions et représentent le site majeur de lésions chez les patients adultes (138).

3.3.4. Déficit de régénération de l'épithélium Fibrose Kystique

La présence fréquente de lésions au niveau de l'épithélium pulmonaire FK nécessite la mise en place de processus de réparation pour régénérer les tissus. Cependant, il

pourrait exister chez les patients FK un défaut des processus de réparation et de régénération. En effet, il a été montré à l'aide d'un modèle de xénogreffe, consistant à greffer une trachée de rat dans laquelle on ensemence des cellules épithéliales primaires de polypes nasaux humains sur une souris « nude », que la régénération de l'épithélium des voies aériennes FK était plus lente que celle non-FK. Ce défaut semblait associé à une expression et sécrétion altérée de MMP-7, MMP-9 et de leur inhibiteur TIMP-1 qui sont grandement impliqués dans la migration et la prolifération cellulaire. En fait, on note au niveau de l'épithélium FK une hyperprolifération ayant pour conséquence un délai de la différenciation cellulaire (dernière étape de la régénération épithéliale) et une hyperplasie des cellules basales (148). Dans le même ordre d'idée, une étude menée au laboratoire de Dre Brochiero sur une lignée cellulaire non-FK (NuLi-1) et d'une lignée cellulaire FK (CuFi-1) à laquelle j'ai participé a montré qu'il y avait, dans ce modèle aussi, un retard de réparation de l'épithélium FK. Ce retard de réparation était principalement dû à une migration plus lente des CuFi que des NuLi. Ce défaut de réparation était aussi associé avec une plus faible réponse à l'EGF ainsi qu'à une plus faible expression et activité des canaux potassiques, deux éléments clés des processus de réparation (44). De plus, des résultats préliminaires de notre laboratoire semblent montrer que le défaut même du CFTR dans les cellules FK soit impliqué dans ce retard de réparation. De façon intéressante, ce retard de réparation peut être observé non seulement dans les lignées cellulaires FK, mais également dans les cellules bronchiques humaines FK en culture primaire (149).

3.4. Thérapies et traitements de la Fibrose Kystique

Au cours des dernières années, l'espérance de vie des patients souffrants de Fibrose Kystique s'est grandement améliorée. La connaissance des aspects de cette maladie, les nouvelles thérapies utilisées ainsi que la meilleure prise en charge des patients dès le jeune âge expliquent ces progrès. Depuis plusieurs années, les efforts pour améliorer la condition des patients FK visent essentiellement à contrer l'obstruction

des voies aériennes et à contrôler les infections, mais plusieurs autres stratégies sont aussi à l'étude.

3.4.1. Viscosité du mucus

Pour commencer, comme la couche de mucus au niveau des voies aériennes des patients FK est plus concentrée et plus visqueuse que chez les patients normaux, en grande partie dû à sa déshydratation ainsi qu'à la relâche d'ADN par les neutrophiles et les bactéries, l'utilisation de DNase recombinante humaine a été testée. En fait, la DNase réduit la viscosité du mucus en hydrolysant l'ADN présent dans le mucus, ce qui permet une meilleure clairance de ce dernier (131). Des traitements à la DNase en aérosol ont permis d'améliorer la capacité d'expiration et de réduire la fréquence d'exacerbation pulmonaire chez les jeunes patients FK. De plus, l'utilisation de ce produit pendant trois ans prévient l'infiltration neutrophilique dans les voies aériennes. Cependant, ce traitement ne semble pas prévenir le déclin de la fonction pulmonaire (68).

3.4.2. Infections et antibiotiques

Lorsque les infections chez les patients FK deviennent chroniques comme, par exemple, les infections à *Pseudomonas aeruginosa*, des traitements aux antibiotiques fréquents et prolongés sont donnés selon différentes routes (orale, par intraveineuse ou par inhalation) pour diminuer la progression de la pathologie pulmonaire. Or, des données épidémiologiques confirment que le traitement des enfants FK par des antibiotiques administrés par intraveineuse corrèle avec un meilleur pronostic (131). Depuis la découverte que l'infection chronique chez les patients FK est en partie due à la formation de biofilm, d'autres types d'antibiotiques ont été considérés. En effet, les macrolides et les lincosamines sont des inhibiteurs de « quorum sensing » ce qui permet l'arrêt de la communication bactérienne (68; 131). Les antibiotiques macrolides oraux ont aussi des effets anti-inflammatoires et ainsi contribuent à la

réduction de la fréquence d'exacerbation pulmonaire et une amélioration de la fonction pulmonaire (68).

3.4.3. Inflammation et anti-inflammatoires

Dans un autre ordre d'idée, la réponse inflammatoire étant un aspect important de la progression de la maladie, les thérapies anti-inflammatoires ont représenté une option à considérer. Les corticostéroïdes, en réduisant la formation de mucus, en inhibant la chimotaxie, l'adhésion et l'activation des leucocytes, en inhibant l'activation de la voie NFκB et en interférant avec la synthèse et l'action des médiateurs inflammatoires, ont un effet anti-inflammatoire important (104; 150). Cependant, des études cliniques ont montré que l'utilisation à long terme de corticostéroïdes a des effets indésirables chez les patients FK, notamment des retards de croissance, un développement de cataractes ou encore des anomalies au niveau de la digestion du glucose (104; 150). Il n'en reste pas moins que l'utilisation à court terme de ce produit a des effets bénéfiques, tels que l'augmentation de la FEV₁ et la diminution de la concentration d'IgG et de cytokines, suggérant leur utilisation comme traitement lors d'exacerbations (104; 150; 151). Pour contrer l'effet néfaste des corticostéroïdes, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) a été étudiée. Il a été montré chez des animaux infectés au *P. aeruginosa* ainsi que chez des patients FK que de fortes doses d'ibuprofènes entraînent l'inhibition de la migration des neutrophiles. Aussi, ce AINS inhibe l'activation de NFκB et de AP-1, deux facteurs de transcription pro-inflammatoire importants (68; 104; 150-152). Cette drogue qui représentait une opportunité pour diminuer l'inflammation reliée à la fibrose kystique n'est cependant plus beaucoup utilisée maintenant. De plus, d'autres thérapies, telles que l'utilisation d'anti-cytokine, l'administration d'IL-10 ou d'INF-γ et l'utilisation d'antagoniste du récepteur LTB₄, sont aussi étudiées pour tenter de diminuer la présence de médiateurs inflammatoires et l'infiltration de neutrophiles. Cependant, leurs effets sont plus ou moins concluants car ils ne jouent pas sur un large spectre de la réponse inflammatoire et que d'autres voies de la signalisation de la réponse inflammatoire peuvent compenser (104; 150; 151). Finalement, comme il a été

mentionné précédemment, les antibiotiques de type macrolide ont aussi des effets anti-inflammatoires. En effet, depuis les 50 dernières années, plusieurs évidences ont été soulevées montrant que ce type d'antibiotique avait des effets anti-inflammatoires bénéfiques pour certaines maladies respiratoires telles que l'asthme, la bronchiectasie et la Fibrose Kystique (151; 153; 154). Parmi les macrolides, l'azithromycine est, jusqu'à maintenant, le plus utilisé à cause de son effet anti-inflammatoire puissant et à son nombre plus faible d'effets secondaires. L'azithromycine semble avoir des effets anti-inflammatoires grâce à son pouvoir à réguler l'expression et la relâche de médiateurs inflammatoires. Il est maintenant utilisé chez les patients Fibrose Kystique pour ses effets antibiotiques et anti-inflammatoires puissants (153).

3.4.4. Défaut de base et thérapies géniques

Suite à la découverte du gène *CFTR* en 1989, la thérapie génique a représenté une option à privilégier. Initialement, la thérapie génique utilisant des vecteurs viraux pour insérer des gènes *CFTR* sauvages semblait être une voie prometteuse pour réintroduire des copies du gène *CFTR* non muté. Cependant, les vecteurs utilisés dans plusieurs thérapies géniques peuvent eux-mêmes entraîner l'exacerbation de la réponse inflammatoire (68; 137). De plus, comme les cellules épithéliales visées se renouvellent rapidement, l'utilisation répétée de ce traitement serait nécessaire (68; 137). De nouvelles méthodes de thérapies géniques sont présentement à l'étude telle que l'utilisation de nanoparticules d'ADN compact (137).

3.4.5. Stratégies alternatives

Vu le manque de succès de la thérapie génique, d'autres types de thérapies ont été explorés. Pour commencer, comme les codons stops prématurés, engendrés lors de mutations de classe I, ne sont pas aussi efficaces que les codons de terminaison naturels, certains antibiotiques aminoglycosilés, tels que la néomycine (G418X) et la

gentamicine (Y122X), inhibent la reconnaissance du codon stop et restaurent le cadre de lecture de CFTR (68; 132).

Une autre approche alternative pour restaurer la fonction du CFTR dans les voies aériennes est de corriger les défauts associés aux protéines CFTR mutantes par l'utilisation de correcteurs. Par exemple, dans le cas des mutations de classe II, plusieurs stratégies ont été employées pour essayer de ramener des CFTR $\Delta F508$ à la membrane. Le N-oxyde de triméthyle semble pouvoir corriger partiellement le défaut de progression à la membrane du mutant $\Delta F508$ *in vitro*. Plus récemment, d'autres composés, tels que le myoinositol, la bétaine et la taurine, semblent pouvoir faciliter la progression du CFTR $\Delta F508$ dans le cytoplasme (132). Aussi, le 4-phénylbutyrate de sodium (4-PBA) restaure partiellement la sécrétion de chlore activée par l'AMPc dans des cellules épithéliales nasales, bronchiques et pancréatiques en plus de réduire le niveau de Hsc 70 cellulaire et l'induction de Hsp 70; deux chaperones impliquées dans la dégradation de CFTR (132; 137). De plus, le VRT-325 et le VRT-532 peuvent tous les deux permettre l'insertion à la membrane de protéine CFTR $\Delta F508$, malheureusement ces deux composés sont toxiques pour les cellules (155). Finalement, de façon encourageante, le composé VX 809, qui est présentement en étude clinique de phase II, permet le rétablissement du CFTR $\Delta F508$ et, lorsqu'il est administré pendant quatre semaines de façon systémique, il améliore de façon modeste le niveau de chlore dans la sueur (156).

Une autre alternative pour restaurer la fonction du CFTR dans les voies aériennes est d'utiliser des « potentiateurs » afin d'augmenter l'activité du canal. Pour commencer, la génistéine, un isoflavénoïde retrouvé dans les légumes, se fixe au CFTR et stimule l'activité du canal selon un mécanisme kinase-indépendant (157). Les données suggèrent que la génistéine maintienne le courant chlore du CFTR en inhibant la déphosphorylation du domaine R (158). Elle peut aussi inhiber l'hydrolyse de l'ATP par le NBD2 ce qui empêche la fermeture du canal. Dans le même ordre d'idée, le CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), qui se fixe directement au NBD1 et active le transport de chlore par CFTR, peut entraîner la progression de la protéine $\Delta F508$ (132). De plus, certaines études semblent montrées que le curcumin corrige le défaut

bioélectrique dans l'épithélium nasal des souris *CFTR* *-/-* et élimine la mortalité associée à l'obstruction intestinale de ces souris (137). Cependant, un certain scepticisme s'est installé par rapport à la vertu du curcumin étant donné que les études plus récentes sur ce produit naturel n'arrivent pas à reproduire les résultats initiaux (159). Finalement, le milrinone, un inhibiteur de phosphodiesterase de type III, utilisé cliniquement comme un vasodilatateur, a été étudié pour son potentiel à stimuler CFTR en maintenant un niveau d'AMPc élevé (132).

3.4.6. Transplantation

Comme dernier recours pour les patients FK, des transplantations de poumons ont été mise en place depuis 1985. Les avancées au niveau de la transplantation pulmonaire et des traitements post-opératoires faites depuis ces années ont augmenté la survie post-transplantation qui se situe maintenant entre 60 et 70% après cinq à sept ans (131).

En résumé, les thérapies visant à améliorer la condition de vie et la survie des patients Fibrose Kystique sont toujours à l'étude. Toutefois, les thérapies antibiotiques et anti-inflammatoires sont les plus couramment utilisées, alors il faudrait approfondir les connaissances sur ces thérapies pour ainsi mieux les adapter à la pathologie.

Chapitre 2 : Hypothèses de travail

L'infection et l'inflammation chronique sont des caractéristiques importantes de la pathologie de la Fibrose Kystique. En effet, ces deux composantes sont impliquées dans les processus lésionnels menant au développement de lésions sévères au niveau de l'épithélium des voies aériennes évoluant progressivement vers une défaillance respiratoire, soit l'une des causes majeures de mortalité chez les patients FK (103; 141). Plusieurs études ont démontré un retard de réparation de l'épithélium FK par rapport à l'épithélium sain (44; 148). L'une des principales interrogations sur ce défaut de régénération est de savoir si ce retard de réparation est dû à l'absence même du CFTR ou à l'environnement physiologique causé par la pathologie. À cet égard, des études préliminaires effectuées dans notre laboratoire ont montré que l'absence de canal CFTR fonctionnel entraîne un défaut de réparation de l'épithélium bronchique ce qui démontre bien l'implication de ce canal dans la réparation (149). Cependant, l'impact de l'inflammation sur les processus de réparation n'est pas très bien connu et très controversé dépendamment du type d'épithélium (3; 87; 107-109; 160). Donc, pour vérifier si l'environnement inflammatoire joue aussi un rôle dans le défaut de régénération de l'épithélium bronchique FK, nous avons étudié, dans le cadre de ma maîtrise, l'impact de l'inflammation sur les processus de réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique.

Plus précisément, mes hypothèses de travail étaient les suivantes :

1. La réponse inflammatoire observée dans les voies aériennes des patients FK implique plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α (142). Dans le cadre de mon projet de maîtrise, nous nous sommes concentrés sur l'impact d'une de ces cytokines, le TNF- α , sur les processus de réparation de deux lignées cellulaires, soit une lignée non-FK (NuLi) et une lignée FK (CuFi). Nous avons posé l'hypothèse que le TNF- α , en plus de participer aux processus lésionnels, pouvait avoir un effet négatif sur la réparation de ces deux lignées cellulaires, et amplifier ainsi l'effet néfaste de ce composé.

2. La régénération épithéliale implique différents processus tels que la migration et la prolifération cellulaire (3). Alors, comme chacun de ces processus est important au bon déroulement de la réparation, nous avons décidé d'étudier l'effet du TNF- α sur la migration et la prolifération cellulaire.
3. La régénération épithéliale est régulée de plusieurs façons. Pour commencer, il a été montré que les facteurs de croissance, sécrétés notamment par les cellules épithéliales et les fibroblastes, sont grandement impliqués dans ce phénomène (3; 76). Plus précisément, nous avons montré au laboratoire de Dre Brochiero que l'EGF et l'activation du récepteur EGFR sont importants dans la réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique (44). Dans cet ordre d'idée, nous avons évalué la relation entre le TNF- α et la signalisation EGF/EGFR
4. Il a été montré que les métalloprotéinases, tels que les MMP et les ADAM, sont impliquées dans la maturation des facteurs de croissance ainsi que dans la migration et la prolifération cellulaire en permettant le remodelage de la matrice extracellulaire (81; 88; 89; 91). Alors, nous avons voulu déterminer si l'activité des MMP pouvait être influencée par la présence de TNF- α et ainsi avoir un impact sur la sécrétion d'EGF et sur les processus de réparation.
5. Les canaux ioniques sont aussi impliqués dans les processus de réparation (84). À cet égard, nous avons montré au laboratoire que les canaux potassiques sont grandement impliqués dans la réparation de l'épithélium bronchique et alvéolaire (44; 45). De plus, nous avons montré que l'activité de ces canaux est influencée par la voie EGF/EGFR. D'autre part, des données de la littérature indiquent que le TNF- α pouvait réguler les canaux K⁺ dans certains types cellulaires (58; 161; 162). Comme cela n'avait jamais été déterminé dans les cellules bronchiques, nous avons décidé d'étudier la relation entre les canaux K⁺ et la réponse au TNF- α .

Chapitre 3 : Résultats publiés et contribution à l'article

Maillé É, Trinh NTN, Privé A, Bilodeau C, Bissonnette É, Grandvaux N, Brochiero E. Regulation of normal and cystic fibrosis bronchial epithelial repair processes by TNF α after injury. *Am. J. Physiol*, soumis en mai 2011.

Résumé: L'infection chronique et l'inflammation sont impliquées dans l'endommagement progressif de l'épithélium des voies aériennes chez les patients Fibrose Kystique (FK). Cependant, le rôle des médiateurs inflammatoires sur les processus de réparations de l'épithélium respiratoire n'est pas très bien connu. Alors, notre objectif était d'étudier la régulation des mécanismes de réparation par le facteur de nécrose tumorale- alpha (TNF- α), une composante majeure de l'initiation et de la propagation de l'inflammation en FK, à l'aide d'un modèle de plaies mécaniques, dans deux lignées cellulaires, non-FK NuLi-1 et FK CuFi-1. Nous avons observé que le TNF- α stimulait le taux de réparation des NuLi et des CuFi. De façon surprenante, une exposition chronique (24-48 h) au TNF- α accentue cette stimulation tout comme la vitesse de migration cellulaire. Les mécanismes cellulaires impliqués dans cette stimulation ont ensuite été évalués. Premièrement, nous avons montré que l'exposition au TNF- α entraînait l'activation de la métalloprotéinase de la matrice (MMP)-9, la relâche d'EGF et la transactivation subséquente d'EGFR. Deuxièmement, la stimulation du taux de réparation des NuLi et des CuFi induite par le TNF- α était abolie par la présence de GM6001 (inhibiteur de métalloprotéinases), d'un anticorps anti-EGF (pour titrer l'EGF sécrété) ainsi que par des inhibiteurs d'EGFR. De plus, nous avons récemment montré une relation cruciale entre la réponse à l'EGF et la fonction des canaux K⁺, contrôlant tous deux la réparation bronchique. Nous montrons maintenant que le TNF- α augmente les courants de K_vLQT1 et K_{ATP}, alors que leur inhibition prévient la stimulation du taux de réparation induite par le TNF- α . Ces résultats indiquent que l'effet stimulateur du TNF- α est régulé en partie par la transactivation d'EGFR et la stimulation des canaux K⁺. De façon contraire, la prolifération cellulaire lors de réparation est inhibée par le TNF- α . Donc, en plus de son rôle reconnu dans la réponse inflammatoire entraînant le

développement de lésions épithéliales, le TNF- α peut exercer des actions complexes sur les mécanismes de réparation de l'épithélium des voies respiratoires FK.

Ma contribution: Les premières observations à l'origine de cet article ont été effectuées par Anik Privé, assistante de recherche et Nguyen Thu Ngan Trinh, étudiante au doctorat dans le laboratoire. J'ai ensuite effectué la plus grande partie des expériences présentées dans ce papier sous la supervision du Dre Brochiero. J'ai moi-même mis au point plusieurs approches expérimentales telles que la zymographie et la quantification de la relâche d'EGF. De plus, j'ai fait la majeure partie de l'analyse et de l'interprétation des résultats. J'ai également participé activement à la rédaction de ce manuscrit avec Dre Brochiero.

Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- α after injury

Emilie Maillé,^{1,2*} Nguyen Thu Ngan Trinh,^{1,2*} Anik Privé,¹ Claudia Bilodeau,¹ Élyse Bissonnette,⁴ Nathalie Grandvaux,^{1,3} and Emmanuelle Brochiero^{1,2}

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

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

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

airways; inflammation; EGF receptor; K⁺ channels; KvLQT1; K_{ATP}

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

Primary human airway epithelial cells were recovered after nasal polypectomy procedures at CHUM-Hôtel-Dieu (Montréal, Québec, Canada), according to an approved ethics protocol. After dissection, polyps were rinsed with PBS and then incubated with MEM (Invitrogen) supplemented with 7.5% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Fisher, Nepean, ON, Canada), 0.05 mg/ml gentamycin, 25 U/ml penicillin-streptomycin, 0.25 μ g/ml Fongizone (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 0.1% pronase E (Sigma-Aldrich), and 10 μ g/ml DNase (Sigma-Aldrich), overnight, at 4°C, under gentle agitation. After neutralization of pronase-DNase activity with 10% FBS, the cells were gently scraped off the remaining tissue, and the cell suspension was recovered and centrifuged for 5 min at 1,500 revolution/min. The cell pellet was resuspended with 5 ml ACK lysis solution (0.1 mM NH₄Cl, 10 μ M KHCO₃, 10 nM EDTA), incubated on ice for 5 min and then neutralized with 10% FBS. After cell suspension centrifugation, the cell pellet was resuspended, counted, and seeded on supports coated with Purecol (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). The cells were grown in CnT17 medium (CellnTec Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland) until confluence and then in complete SAGM (LHC basal medium supplemented with SAGM) (Clonetics, Walkersville, MD) and 25 ng/ml EGF, 100 U/ml of penicillin-streptomycin, 0.07 μ g/ml phosphorylthanolamine (Sigma-Aldrich), 1.86 ng/ml ethanolanamine (Sigma-Aldrich), 0.05 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich), and stock 11, stock

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

Wound healing. NuLi, CuFi, and human primary cell monolayers were injured mechanically with a P10 pipette tip (6 wounds per Petri dish, 2 Petri dishes per condition) (58), then washed to remove detached injured cells. The mean area of the initial wounds was 0.987 ± 0.005 mm², with maximal variation of 5%, demonstrating the reproducibility of our scratch assay (57, 58). The monolayers were photographed with a digital camera under light microscopy ($\times 4$ enlargement) at *time 0* and after 6 h in BEGM^{+EGF} or 18 h in BEGM^{EGF-free}. A mark on the Petri dishes allowed us to photograph the wounds exactly at the same place at various times and to measure, with ImageJ software, the wound area initially and after repair. Our results are reported as repair rates in μ m²/h and compared with the outcome of different treatments (TNF- α , BioSource; Invitrogen, Carlsbad, CA), GM6001 (USBiological, Swampscott, MA), anti-EGF antibody (EGF-Ab; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), inhibitors of erbB1 (tyrphostin AG-1478) and erbB2 (tyrphostin AG-875), clofilium (a KvLQT1 channel blocker), glibenclamide (a K_{ATP} channel blocker), and TRAM-34 (a KCa3.1 channel blocker) (Sigma-Aldrich) in BEGM^{+EGF} or BEGM^{EGF-free}.

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

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

EGFR/pEGFR expression by immunoblotting. Total proteins were obtained from NuLi and CuFi cells cultured in BEGM^{+EGF} for 10 days and in BEGM^{EGF-BPE-free} for 18 h before protein extraction. EGFR and the phosphorylated form of EGFR (pEGFR) were detected by immunoblotting, with anti-erbB1 and anti-pEGFR⁸⁴⁵ antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) (58). The intensity of pEGFR and EGFR bands was quantified with Multigauge software. The results are reported as the pEGFR/EGFR ratio, in percentage of the control condition.

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

Gelatin zymography analysis. NuLi and CuFi cell monolayers were wounded or not, and the medium was replaced by BEGM^{EGF-BPE-free} supplemented or not with TNF- α and/or GM6001 for 24 h before conditioned medium collection. After centrifugation, the supernatants

were concentrated on Microsep 10K Omega filters (Pall, Ann Arbor, MI) and then separated on 7.5% polyacrylamide-SDS gel containing 0.1% gelatin. The gel was washed for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution and incubated in buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM CaCl₂ (pH 7.6), overnight at 37°C under gentle stirring. The gel was stained for 30 min in a 0.1% Coomassie blue (Sigma), 40% methanol, and 10% acetic acid solution and washed for 18 h in a buffer containing 10% acetic acid and 20% methanol for destaining. Finally, the gel was transferred to a solution of 10% acetic acid and 5% glycerol before drying. Signal intensity was analyzed by Multigauge software.

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

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

RESULTS

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

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

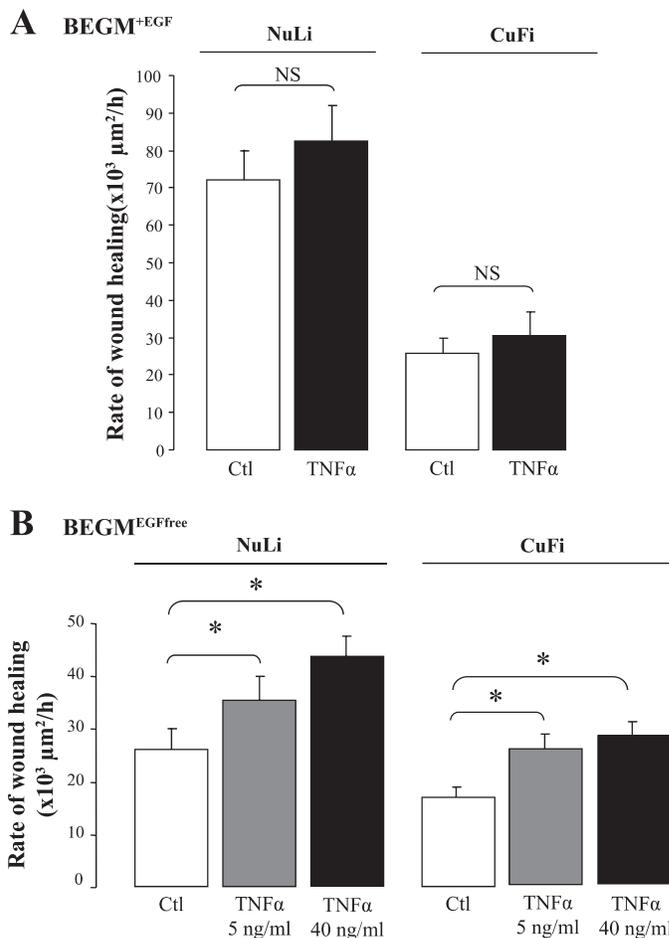


Fig. 1. Effect of tumor necrosis factor (TNF)- α on wound healing of NuLi (non-cystic fibrosis, non-CF) and CuFi (CF) bronchial cell monolayers. The wound-repair rate ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) in NuLi and CuFi was followed over a 6-h period in bronchial epithelial cell growth medium supplemented with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

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

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

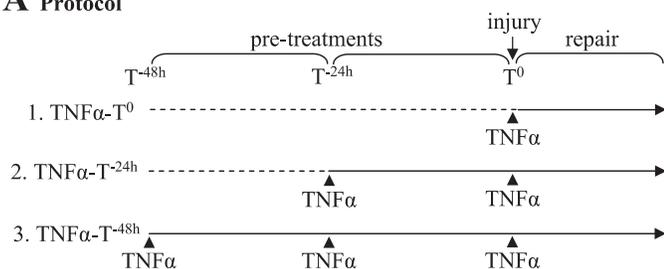
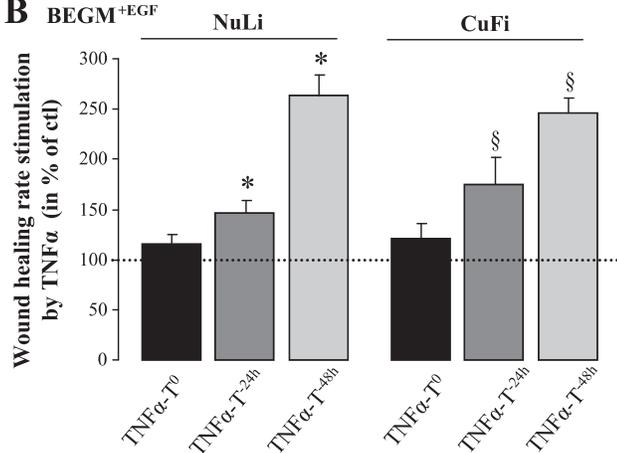
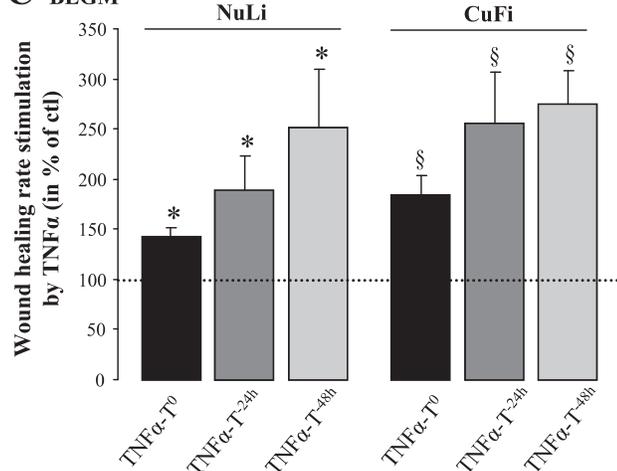
A Protocol**B BEGM^{+EGF}****C BEGM^{EGF-free}**

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

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

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

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

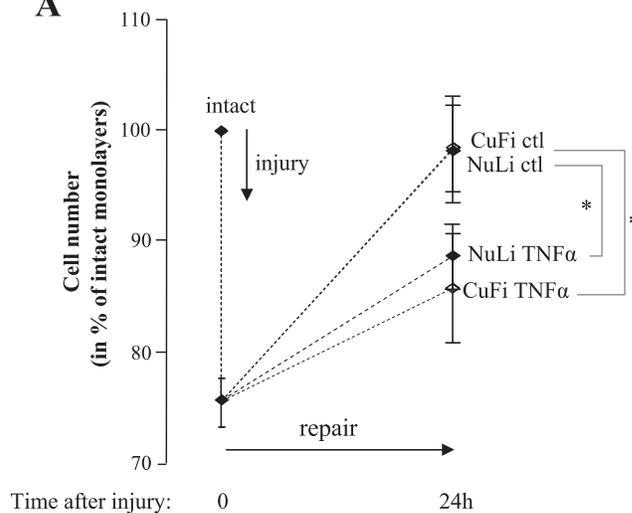
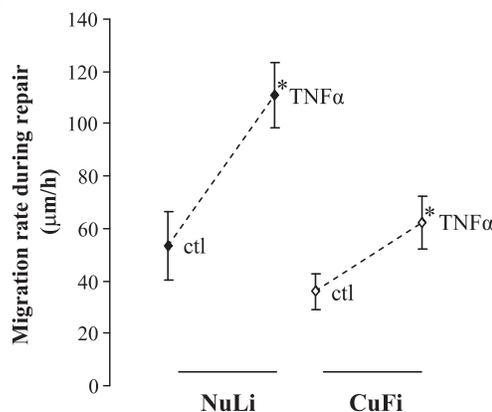
A**B**

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

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

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

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

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

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

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

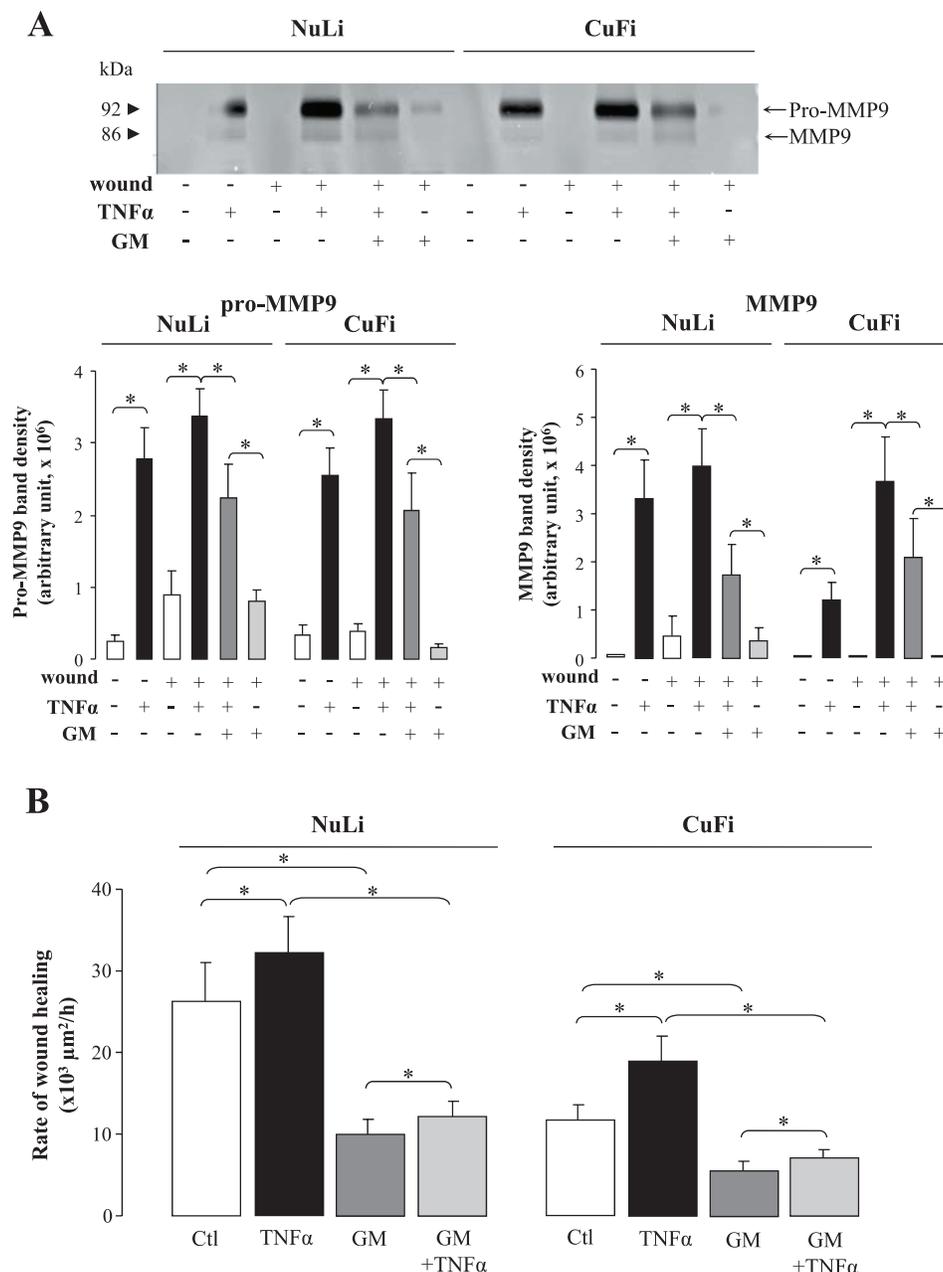


Fig. 4. Role of matrix metalloproteinase (MMP) in TNF- α -induced bronchial wound repair. **A:** intact or wounded NuLi and CuFi cell monolayers were treated for 24 h in BEGM^{EGF-BPE-free}, in the presence or absence of TNF- α (40 ng/ml) and/or GM6001 (GM, 25 μ M), before conditioned medium collection.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

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

DISCUSSION

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

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

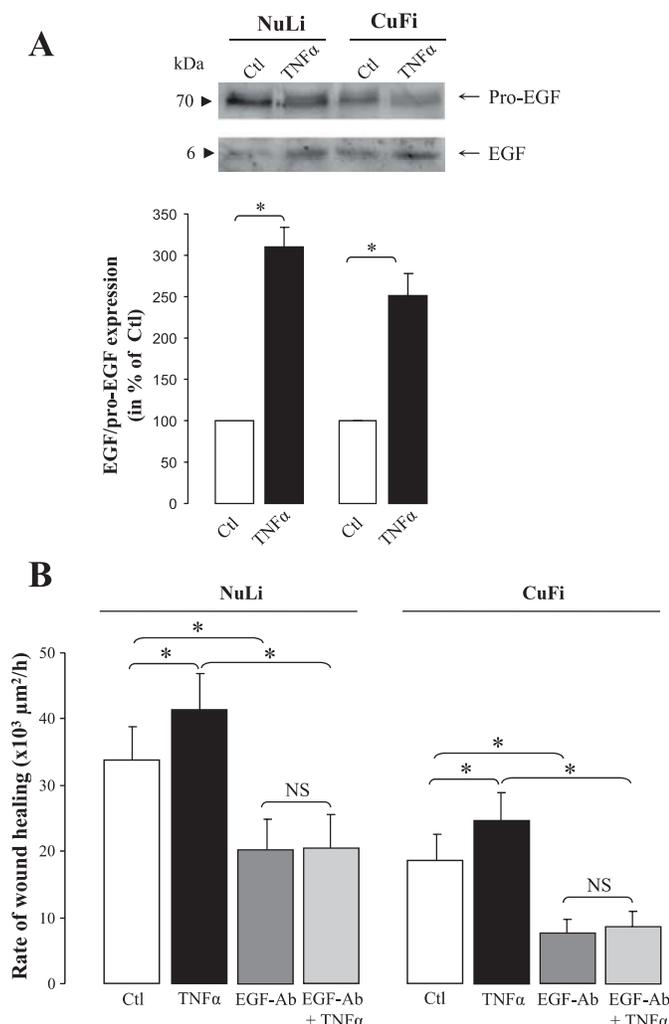


Fig. 5. Role of secreted EGF in TNF- α -induced bronchial wound-repair stimulation. **A**: NuLi and CuFi cell monolayers were treated or not for 24 h with TNF- α (40 ng/ml, in BEBM) before conditioned medium collection. Pro-EGF and EGF expression, in these conditioned media, was then analyzed by Western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

respiratory epithelium, TNF- α thus controls the repair processes of CF airway epithelia.

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

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

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

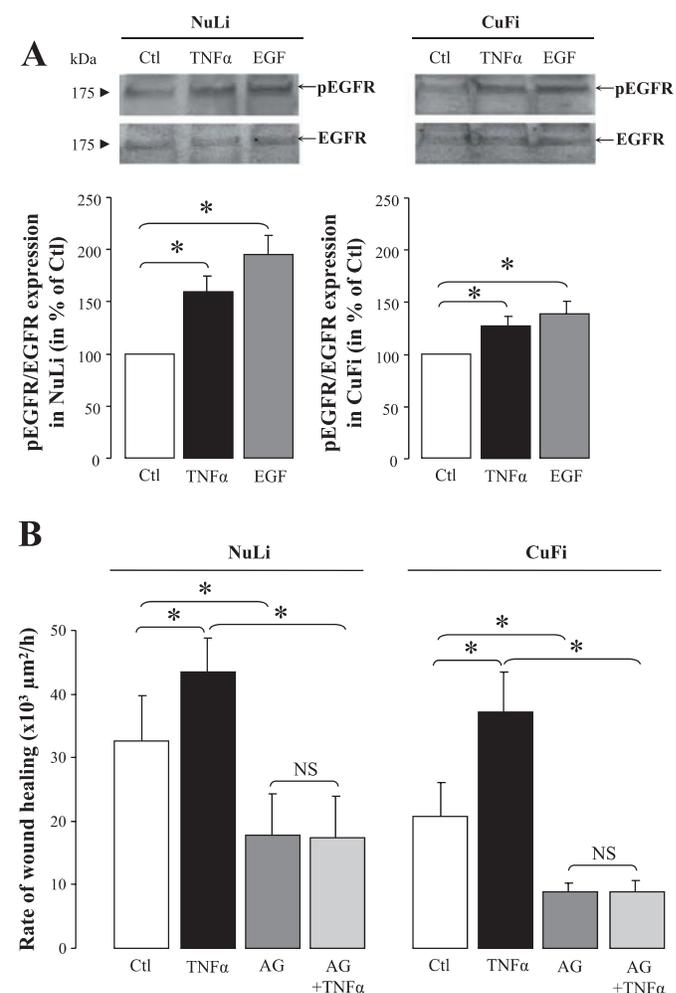


Fig. 6. Involvement of EGF receptor (EGFR) activation in TNF- α -induced stimulation of bronchial wound repair. **A**: EGFR expression and EGFR tyrosine kinase phosphorylation were measured by immunoblotting, with EGFR and anti-phospho-EGFR⁸⁴⁵ antibodies, in extracts from NuLi and CuFi monolayers cultured for 18 h with BEGM^{EGF-BPE-free} before protein extraction and exposed or not for 15 min to TNF- α (40 ng/ml) or EGF (25 ng/ml, positive control). Representative immunoblots as well as the mean pEGFR/EGFR ratio (presented as % of control nontreated cells) are reported for TNF- α and EGF conditions. NuLi * $P < 0.007$, CuFi * $P < 0.03$ (paired t -test), $n = 8$. **B**: NuLi and CuFi monolayers were injured mechanically, and the rate of wound healing (in $\mu\text{m}^2/\text{h}$) was measured after 18 h (BEGM^{EGF-free}) in control (Ctl) and TNF- α (40 ng/ml, TNF- α) and/or erbB1 and erbB2 inhibitor (AG-1478, 10 μM) + (AG-825, 10 μM) (AG)-treated monolayers. * $P < 0.002$ (paired t -test), $n = 7$.

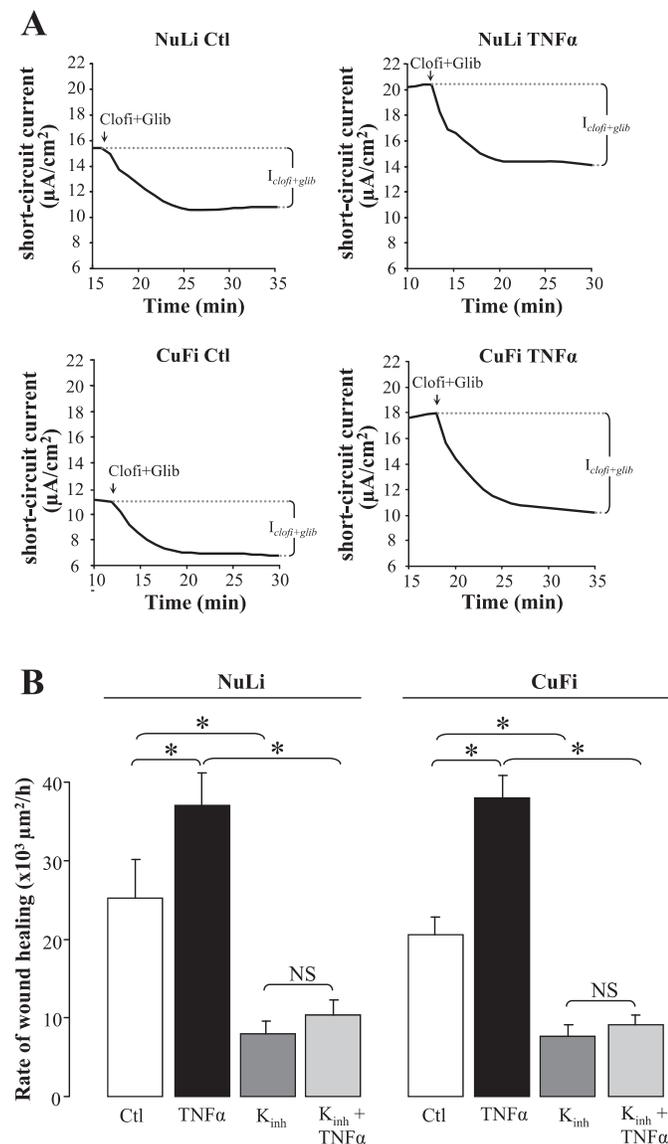


Fig. 7. Coupling between K^+ channel activity and TNF- α stimulation during bronchial wound healing. *A*: NuLi and CuFi cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated or not for an additional 24 h on the basolateral side with TNF- α (40 ng/ml), before short-circuit current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

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

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

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

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

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

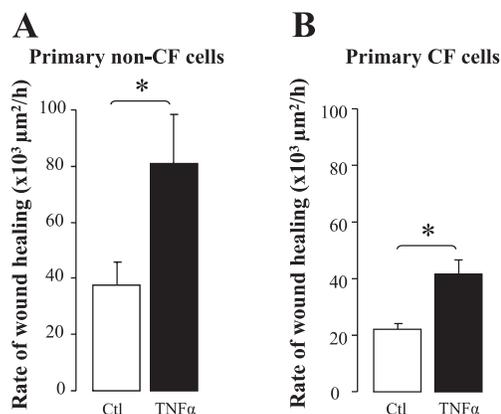


Fig. 8. Wound-repair stimulation by TNF- α in human primary non-CF and CF airway epithelial cells. Airway cells, isolated from non-CF ($n = 5$) and CF patients ($n = 5$), in primary culture, were injured mechanically, and the rate of wound healing (in $\mu\text{m}^2/\text{h}$) was measured after 6 h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

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

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

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

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

Role of K⁺ channels in TNF- α -induced wound-healing stimulation. Ion channels, and in particular K⁺ channels, control the mitogenic and motogenic properties of several cell types, via changes in cell volume, membrane potential, and [Ca²⁺]_i, or by directly interacting with proteins of the migratory machinery, such as integrins (1, 51). In the lungs, among over 30 different K⁺ channels (4), KvLQT1 and K_{ATP}, which are responsible for a major part of basolateral K⁺ permeability, are essential in respiratory epithelial repair processes (57, 58). In addition, KCa3.1 channels could be stimulated after injury and may play a complementary role, with KvLQT1 and K_{ATP} channels, in basal bronchial repair (58). We discovered that simultaneous application of clofilium, glibenclamide, and TRAM-34, inhibitors of KvLQT1, K_{ATP}, and KCa3.1, respectively, completely prevented TNF- α -induced stimulation (Fig. 7B). TRAM-34 is a specific KCa3.1 inhibitor, but clofilium and

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

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

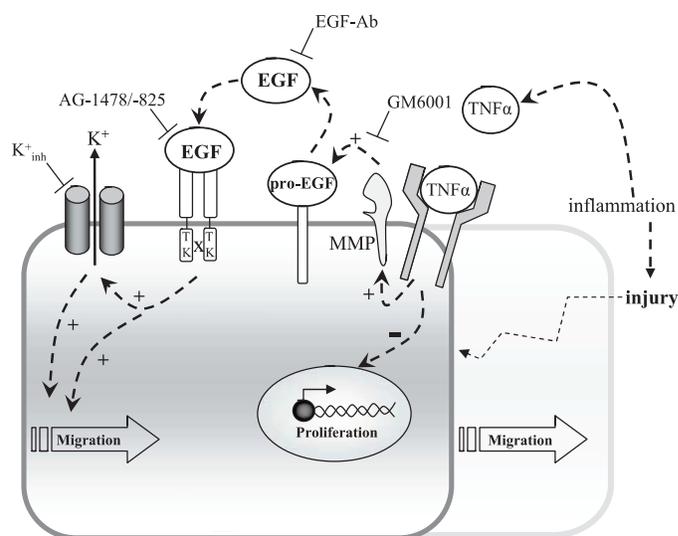


Fig. 9. Schematic model of TNF- α action on bronchial epithelial repair. In this model, we propose that the inflammatory cytokine TNF- α induces secondary MMP-9 and EGF release, followed by EGFR activation, thus stimulating NuLi and CuFi cell migration and wound healing. Note that MMP could also be directly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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

GRANTS

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

REFERENCES

- Arcangeli A, Becchetti A. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 16: 631–639, 2006.
- Argast GM, Campbell JS, Brooling JT, Fausto N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* 279: 34530–34536, 2004.
- Balfour-Lynn IM. Anti-inflammatory approaches to cystic fibrosis airways disease. *Curr Opin Pulm Med* 13: 522–528, 2007.
- Bardou O, Trinh NT, Brochiero E. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L145–L155, 2009.
- Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 66: 912–922, 1998.
- Besnard V, Nabeyrat E, Henrion-Caude A, Chadelat K, Perin L, Le Bouc Y, Clement A. Protective role of retinoic acid from antiproliferative action of TNF-alpha on lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L863–L871, 2002.
- Bleich M, Briel M, Busch AE, Lang HJ, Gerlach U, Gogelein H, Greger R, Kunzelmann K. KVLQT channels are inhibited by the K⁺ channel blocker 293B. *Pflügers Arch* 434: 499–501, 1997.
- Blobel CP, Carpenter G, Freeman M. The role of protease activity in ErbB biology. *Exp Cell Res* 315: 671–682, 2009.
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111–2118, 1995.
- Bove PF, Wesley UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vliet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 138–146, 2007.
- Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM. Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 166: 413–426, 1996.
- Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 32: 1068–1081, 2008.
- Casserly B, Donat W. Stabilization of lung function and clinical symptoms in a patient with cystic fibrosis (CF) after institution of infliximab: a monoclonal antibody that binds tumor necrosis factor alpha. *Lung* 187: 149–152, 2009.
- Chen P, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem* 108: 1233–1243, 2009.
- Chen WN, Woodbury RL, Kathmann LE, Opreko LK, Zangar RC, Wiley HS, Thrall BD. Induced autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor contributes to the response of mammary epithelial cells to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 279: 18488–18496, 2004.
- Chmiel JF, Konstan MW. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 28: 331–346, 2007.
- Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3: 223–231, 2004.
- Cowley EA, Linsdell P. Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* 538: 747–757, 2002.
- Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret MC, Crestani B, Deschenes M, Trouillet JL, Aubier M. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 710–716, 1994.
- Devor DC, Bridges RJ, Pilewski JM. Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C461–C479, 2000.
- Dovey M, Wissemann CL, Roggli VL, Roomans GM, Shelburne JD, Spock A. Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21: 521–534, 1989.
- El Ani D, Zimlichman R. TNFalpha stimulated ATP-sensitive potassium channels and attenuated deoxyglucose and Ca uptake of H9c2 cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* 1010: 716–720, 2003.
- Fayon M. CF-Emerging therapies: Modulation inflammation. *Paediatr Respir Rev* 7, Suppl 1: S170–S174, 2006.
- Fong P, Argent BE, Guggino WB, Gray MA. Characterization of vectorial chloride transport pathways in the human pancreatic duct adenocarcinoma cell line HPAF. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C433–C445, 2003.
- Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, Matthay MA. Interleukin-1 β augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1184–L1190, 2000.
- Grahammer F, Warth R, Barhanin J, Bleich M, Hug MJ. The small conductance K⁺ channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J Biol Chem* 276: 42268–42275, 2001.
- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69–98, 2007.
- Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 211: 340–350, 2007.
- Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 94: 68–76, 2004.
- Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Gaillard D. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol* 124: 69–76, 2001.
- Inglis SK, Brown SG, Constable MJ, McTavish N, Oliver RE, Wilson SM. A Ba²⁺-resistant, acid-sensitive K⁺ conductance in Na⁺-absorbing

- H441 human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1304–L1312, 2007.
32. **Ingram JL, Bonner JC.** EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases. *Curr Mol Med* 6: 409–421, 2006.
 33. **Kataoka H.** EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci* 56: 148–153, 2009.
 34. **Kim JK, Yoo HY, Kim SJ, Hwang YS, Han J, Kim JA, Kim CS, Cho HS.** Effects of sevoflurane on the cAMP-induced short-circuit current in mouse tracheal epithelium and recombinant Cl⁻ (CFTR) and K⁺ (KCNQ1) channels. *Br J Anaesth* 99: 245–251, 2007.
 35. **Koehler DR, Downey GP, Swezey NB, Tanswell AK, Hu J.** Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 377–381, 2004.
 36. **Koff JL, Shao MX, Kim S, Ueki IF, Nadel JA.** Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol* 177: 8693–8700, 2006.
 37. **Kronborg G, Hansen MB, Svenson M, Fomsgaard A, Hoiby N, 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* 15: 292–297, 1993.
 38. **Lavigne MC, Thakker P, Gunn J, Wong A, Miyashiro JS, Wasserman AM, Wei SQ, Pelker JW, Kobayashi M, Eppihimer MJ.** Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 534–546, 2004.
 39. **Legrand C, Polette M, Tournier JM, de Bentzmann S, Huet E, Monteau M, Birembaut P.** uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res* 264: 326–336, 2001.
 40. **Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E.** Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1027–L1037, 2004.
 41. **Lesur O, Arsalane K, Lane D.** Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270: L311–L319, 1996.
 42. **Lock H, Valverde MA.** Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 34849–34852, 2000.
 43. **Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S, Matrougui K.** Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation* 110: 3587–3593, 2004.
 44. **MacVinish LJ, Hickman ME, Mufti DA, Durrington HJ, Cuthbert AW.** Importance of basolateral K⁺ conductance in maintaining Cl⁻ secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol* 510: 237–247, 1998.
 45. **Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K.** Modulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ secretion by basolateral K⁺ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* 53: 608–618, 2003.
 46. **Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A.** Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108: 1303–1314, 1995.
 47. **Niemeyer MI, Cid LP, Barros LF, Sepulveda FV.** Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem* 276: 43166–43174, 2001.
 48. **Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C.** Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3: 726–733, 2006.
 49. **Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA.** Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev* 5, Suppl A: S35–S40, 2004.
 50. **Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C912–C921, 2010.
 51. **Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C.** Cells move when ions and water flow. *Pflügers Arch* 453: 421–432, 2007.
 52. **Shute J, Marshall L, Bodey K, Bush A.** Growth factors in cystic fibrosis—when more is not enough. *Paediatr Respir Rev* 4: 120–127, 2003.
 53. **Sigurdson L, Sen T, Hall L 3rd, Rubinfeld A, Hard R, Gardella J, Bright F, Hicks WL Jr.** Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 197–200, 2003.
 54. **Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM.** High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145: 1016–1022, 1992.
 55. **Takeda N, Sumi Y, Prefontaine D, Al Abri J, Al Heialy N, Al Ramli W, Michoud MC, Martin JG, Hamid Q.** Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clin Exp Allergy* 39: 1018–1026, 2009.
 56. **Trinh NT, Maille E, Prive A, Brochiero E.** Defect in CF bronchial epithelial repair after injury: role of the CFTR channel. *Pediatr Pulmonol Suppl* 33: 254, 2010.
 57. **Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noel J, Brochiero E.** Involvement of K_{ATP} and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L870–L882, 2007.
 58. **Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E.** EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L866–L880, 2008.
 59. **Varela LM, Stangle-Castor NC, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip MM.** TNF α induces NF κ B/p50 in association with the growth and morphogenesis of normal and transformed rat mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 188: 120–131, 2001.
 60. **Vicente R, Coma M, Busquets S, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Felipe A.** The systemic inflammatory response is involved in the regulation of K⁺ channel expression in brain via TNF- α -dependent and -independent pathways. *FEBS Lett* 572: 189–194, 2004.
 61. **Wei Y, Babilonia E, Pedraza PL, Ferreri NR, Wang WH.** Acute application of TNF stimulates apical 70-pS K⁺ channels in the thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F491–F497, 2003.
 62. **Yamaoka T, Yan F, Cao H, Hobbs SS, Dise RS, Tong W, Polk DB.** Transactivation of EGF receptor and ErbB2 protects intestinal epithelial cells from TNF-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11772–11777, 2008.
 63. **Zabner J, Karp P, Seiler M, Phillips SL, Mitchell CJ, Saavedra M, Welsh M, Klingelutz AJ.** Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L844–L854, 2003.
 64. **Zhao Y, He D, Saatian B, Watkins T, Spannake EW, Pyne NJ, Natarajan V.** Regulation of lysophosphatidic acid-induced epidermal growth factor receptor transactivation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells by protein kinase C δ , Lyn kinase, and matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 281: 19501–19511, 2006.
 65. **Zhou L, Yan C, Gieling RG, Kida Y, Garner W, Li W, Han YP.** Tumor necrosis factor- α induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1. *BMC Immunol* 10: 15, 2009.

Chapitre 4 : Discussion et Perspectives

La présence d'inflammation est une composante importante de la pathologie de la Fibrose Kystique et le TNF- α est l'une des cytokines pro-inflammatoires majeures dans l'initiation et la propagation de la réponse inflammatoire présente chez ces patients. Dans cette étude, nous avons premièrement montré, que le TNF- α stimule la réparation de lésions de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique qui est bénéfique pour la régénération de l'épithélium des voies aériennes. Puis, en évaluant l'effet du TNF- α sur la migration et la prolifération cellulaire, deux processus impliqués dans la régénération épithéliale, nous avons pu observer que l'effet positif de cette cytokine sur la réparation était dû à la stimulation de la migration cellulaire et non à celle de la croissance cellulaire, qui est ralentie par la présence de TNF- α . Pour tenter d'expliquer l'effet positif du TNF- α sur la réparation et sur la migration cellulaire, nous avons étudié les mécanismes cellulaires impliqués dans ce phénomène. Ceci nous a permis de démontrer que l'effet positif du TNF- α était dû à l'activation de la MMP-9, à la relâche d'EGF et à la transactivation subséquente du récepteur EGFR ainsi qu'à l'activation des canaux potassiques. De façon à confirmer ces résultats, nous avons aussi montré que l'inhibition des metalloprotéinases, le titrage de l'EGF, l'inhibition d'EGFR et l'inhibition des canaux potassiques empêchaient la stimulation de la réparation par le TNF- α . En conclusion, le TNF- α semble avoir un rôle complexe en participant non seulement aux processus lésionnels, mais en régulant également les processus de réparation via la stimulation de la migration cellulaire par l'activation de la MMP-9, de la voie EGF/EGFR et des canaux K⁺ et le ralentissement de la prolifération.

1. Modèle de plaies mécaniques

Pour étudier l'impact du TNF- α sur la réparation, nous nous sommes servis d'un modèle de plaies mécaniques qui consiste à effectuer des lésions, à l'aide d'un embout de pipette de 10 μ l, sur une monocouche de cellules cultivées sur pétris et de suivre la réparation au cours du temps en prenant une photo, exactement au même

endroit, au temps 0 et au bout de six heures ou de dix-huit heures pour ainsi permettre une réparation d'environ 60% en présence (6h) et en absence d'EGF (18h). Ce modèle, qui est utilisé dans notre laboratoire depuis quelques années déjà (44; 45), est très reproductible et très efficace pour observer la refermeture de lésions par les cellules épithéliales au cours du temps. Comme certains traitements ont seulement des petits effets, les essais de réparation ont été répétés plusieurs fois pour réduire le plus possible la variation entre les différentes expériences et ainsi s'assurer de la reproductibilité de nos résultats. En effectuant des expériences de « time lapse » qui nous permettent de suivre la réparation de nos cellules au cours du temps en vidéo microscopie, nous pouvons voir que les cellules NuLi et CuFi, qui sont respectivement des lignées de cellules épithéliales bronchiques normales et Fibrose Kystique, migrent en direction de l'espace dénudé et arrivent à refermer la lésion. Comme on peut voir dans la **figure 3B** de l'article, les essais de time lapse nous permettent, tout comme les essais de réparation de voir l'impact de différents traitements tels que le TNF- α . De plus, on arrive aussi à voir des cellules qui se divisent, montrant que ce modèle permet aussi la prolifération cellulaire. Ceci a aussi été confirmé par des expériences de croissance cellulaire montrant, dans des monocouches lésées, un nombre de cellules identique à celui mesuré avant les lésions après 24 heures de réparation.

1.1. Limitation du modèle de plaies mécaniques

Même si notre modèle de plaies mécaniques est très efficace pour observer la fermeture de lésion *in vitro*, il n'en reste pas moins que ce modèle ne représente pas tout à fait la réalité que nous observons *in vivo*. En effet, plusieurs aspects tels l'implication des différents processus de réparation (**section 1.1.1**) et l'environnement cellulaire (**section 1.1.2**) ne sont pas complètement respectés.

1.1.1. Limitation du modèle au niveau des processus de réparation

La régénération épithéliale implique plusieurs processus qui se produisent sur une longue période de temps. En effet, il a été montré *in vivo* chez le cobaye et le rat que, suite à une lésion, on note premièrement l'étalement et la migration des cellules pour couvrir l'aire endommagée dans les 12 à 24 premières heures. Ensuite, la prolifération cellulaire est initiée dans les 15 à 24 heures suivant la lésion et continue pour des jours et même des semaines. Finalement, les cellules se redifférencient pour former un épithélium fonctionnel (3). Comme c'est le cas *in vivo*, notre modèle de réparation sur une période allant de 6h à 18h, met en place rapidement un processus de migration suivi d'une prolifération cellulaire. Il peut ainsi sembler surprenant que nos essais de plaies mécaniques démontrent une stimulation de la réparation en présence de TNF- α malgré un effet opposé sur la prolifération (inhibition) et la migration (activation). Nous pourrions penser que la courte durée de nos expériences de réparation masque l'impact du TNF- α sur la prolifération. Cependant, il n'en reste pas moins que, après des traitements de 24 et 48 heures, l'effet du TNF- α est observable sur la croissance cellulaire après les lésions (**figure 3**) alors que l'on peut toujours observer une augmentation de la réparation par le TNF- α dans les essais de réparation (**figure 2**). Alors, il semblerait que l'effet stimulateur du TNF- α sur la migration cellulaire est plus important que son effet sur la croissance cellulaire dans nos expériences.

Toutefois, cette hypothèse ne semble pas exacte puisque des traitements plus longs au TNF- α (de 24 à 48 h) stimulent également la réparation.

D'autre part, comme les expériences de réparation sont effectuées sur des cellules cultivées sur plastiques, ces dernières ne peuvent pas être différenciées. En effet, pour que les cellules puissent être plus différenciées et polarisées, il aurait fallu qu'elles soient cultivées sur filtre à interface air-liquide. Nous mettons présentement en place au laboratoire des essais de lésions mécaniques (avec une micro-perceuse) sur des épithéliums polarisés cultivés sur filtre.

1.1.2. Limitation du modèle au niveau de l'environnement cellulaire

Au niveau de l'épithélium bronchique, on peut observer plusieurs types cellulaires différents qui ne sont pas considérés dans notre modèle de plaies mécaniques tels que, les cellules de Clara, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires et les fibroblastes. Comme plusieurs de ces dernières jouent un rôle important dans les processus de réparation, ceci crée une limitation importante de notre modèle. En effet, les cellules de Clara, cellules progénitrices de l'épithélium des voies aériennes, jouent un rôle important dans le processus de prolifération (1; 3). D'autre part, les fibroblastes sont impliqués dans la régénération épithéliale de plusieurs façons. Tout d'abord, ils participent à la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire, telles que les collagènes de type I et III, l'élastine et la fibronectine (163). La matrice cellulaire ainsi formée pour recouvrir l'espace dénudé de cellules suite à une lésion permet la migration des cellules épithéliales en bordure de la plaie représentant l'un des premiers processus de la régénération épithéliale (82). De plus, les fibroblastes sont impliqués dans la sécrétion de facteurs de croissance, tels que le HGF, le KGF et le FGF-10 favorisant la migration cellulaire (3; 97). De façon plus négative, les fibroblastes sont aussi impliqués dans le développement de fibrose par la surproduction de collagène I et III pouvant engendrer un remodelage des voies aériennes (122; 163). Finalement, comme les voies respiratoires sont en contact continu avec l'air extérieur et donc sujettes à la présence fréquente de pathogènes, les cellules immunitaires sont très nombreuses et participent grandement au processus lésionnel comme au processus de réparation de l'épithélium bronchique. En effet, il a été montré que les cellules immunitaires, plus particulièrement les neutrophiles qui sont très présents dans la pathologie de la Fibrose Kystique, peuvent être stimulées par le TNF- α et peuvent sécréter de l'élastase neutrophilique pouvant endommager l'épithélium pulmonaire (103; 151). Donc, l'effet global du TNF- α sur la réparation des cellules épithéliales bronchiques n'aurait peut-être pas été le même en présence de cellules immunitaires.

1.2. Modèles alternatifs pour étudier la réparation

Il existe maintenant plusieurs autres modèles, *in vitro* et *in vivo*, pour étudier la régénération épithéliale qui permettent de se rapprocher un peu plus de la réalité. Pour commencer, l'étude de ce phénomène sur des cellules épithéliales pulmonaires primaires cultivées sur filtre à interface air-liquide permet d'observer la réparation d'un épithélium pulmonaire différencié ce qui apporte comme avantage d'observer l'implication des différents types cellulaires dans la réparation (164; 165). En effet, il a été montré, dans une étude portant sur la culture de cellules primaires de trachée de hamster, que lorsque ces cellules forment une interface air-liquide, elles se différencient en cellules ciliées, sécrétrices et basales et que, lors de lésion, cet épithélium est capable de se réparer (164; 166). D'autre part, il existe des modèles de co-cultures qui permettent d'étudier l'interaction entre deux types cellulaires différents dans la régénération épithéliale. Par exemple, certains groupes de recherche utilisent des co-cultures de cellules épithéliales bronchiques et de fibroblastes. Dans une de ces études, les auteurs observent que la capacité de prolifération des cellules épithéliales bronchiques en co-culture avec des fibroblastes était plus grande que celles en culture seule. Cette augmentation de la prolifération dans la co-culture était due à la présence de facteurs de croissance sécrétés par les fibroblastes qui agissaient sur la prolifération des cellules épithéliales bronchiques, tels que le HGF, le KGF et le FGF (166). Ceci est donc un bon exemple du rôle important des autres types cellulaires dans la régénération de l'épithélium bronchique. En somme, ces deux modèles pourraient être intéressants pour nos études de régénération épithéliale puisqu'ils permettent d'étudier l'implication des autres types cellulaires.

Pour ce qui est des modèles *in vivo*, il existe différents modèles de lésions et d'animaux. Premièrement, il y a les modèles où l'on effectue des lésions directement dans les trachées d'animaux. L'un de ces modèles consiste à injecter du naphthalène pour permettre la destruction des cellules de Clara. À l'aide de ce modèle, on peut observer la formation de lésions au niveau de l'épithélium des voies aériennes due à l'absence de cellules de Clara (167). Aussi, d'autres chercheurs utilisent des sondes métalliques refroidies à l'azote liquide pour effectuer des lésions au niveau des voies

aériennes (168). Toutefois il n'existe pas encore de modèle animal simple qui développe la pathologie respiratoire FK. En effet, les modèles de souris *CFTR* *-/-* ou avec la mutation $\Delta F508$ ne développent pas de pathologie respiratoire (169). Pour ce qui est du modèle FK de porc, il semblerait développer une pathologie pulmonaire très semblable à celle observée chez les patients FK (169; 170). Cependant l'utilisation de ce modèle, dû à sa taille et à ses caractéristiques, est très compliquée et très coûteuse. Dans un autre ordre d'idée, le modèle de xénogreffe développé dans le laboratoire de Dre Coraux pourrait être une bonne alternative à considérer. Ce modèle consiste à ensemercer des cellules épithéliales de voies respiratoires humaines en culture primaire dans une trachée de rat dénudé de son épithélium, greffée sur une souris « nude » (148). Même si ce modèle n'est pas vraiment un modèle *in vivo*, il permet de suivre toutes les étapes de la régénération épithéliale (incluant la différenciation cellulaire) dans un environnement cellulaire et inflammatoire ressemblant à la réalité (171). Nous sommes présentement en train de développer ce modèle dans notre laboratoire avec l'aide du Dre Coraux.

2. Limitation des expériences de prolifération cellulaire

Pour étudier l'impact du TNF- α sur la prolifération cellulaire, nous avons suivi l'augmentation du nombre de cellules au cours du temps en présence et en absence de TNF- α , chez les NuLi et les CuFi, après 24 heures. Cette méthode nous a permis de déterminer qu'il y avait une moins forte augmentation du nombre de cellules en présence de TNF- α qu'en condition contrôle. Nous avons associé cette moindre augmentation du nombre de cellules au cours du temps à une diminution de prolifération cellulaire. Cependant, certaines études ont montré que le TNF- α est un activateur d'apoptose (106). Alors, la diminution de prolifération cellulaire que nous observons pourrait être due à une augmentation de l'apoptose chez nos cellules. Il aurait donc été intéressant de confirmer cette diminution de prolifération par d'autres techniques connues telles que l'incorporation de Brdu ou de thymidine tritiée.

3. L'inflammation dans la régénération épithéliale

La réponse inflammatoire est impliquée dans les processus lésionnels. En effet, les cytokines pro-inflammatoires, en activant les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, mènent à la sécrétion de protéases impliquées dans le développement de lésions pulmonaires (103). Cependant, le rôle de la réponse inflammatoire sur les processus de réparation n'est pas très bien connu. Dans la pathologie de la Fibrose Kystique, on note la présence d'une multitude de cytokines pro-inflammatoires au niveau des voies respiratoires responsables en grande partie de la pathologie respiratoire reliée à cette maladie. En effet, on peut noter dans les expectorations des patients FK de fortes concentrations d'IL-6, d'IL-8, d'IL-1 β et de TNF- α (142). Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'implication du TNF- α dans la régulation des processus de réparation de l'épithélium bronchique.

Pour commencer, nous avons montré que le TNF- α stimulait la réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique et que cette stimulation était encore plus grande lorsqu'on effectuait des pré-traitements chroniques pendant 24 et 48 heures. Nos résultats démontrent pour la première fois un effet complexe du TNF- α sur les processus de réparation de l'épithélium bronchique non-FK et FK. En effet, pour le même type cellulaire, il a un effet stimulateur sur la migration cellulaire qui ne se reflète pas sur la prolifération deux processus grandement impliqués dans la régénération épithéliale. Cet effet complexe du TNF- α est démontré dans la littérature au niveau d'autres types cellulaires. En effet, le TNF- α peut inhiber la prolifération des cellules alvéolaires de type II ce qui appuie les résultats que nous avons obtenus (107). Cependant, le TNF- α peut aussi stimuler la migration et la prolifération cellulaire des cellules épithéliales mammaires et gastriques (108; 109).

D'après la littérature, des doses de TNF- α allant de 5 à 100 ng/ml sont utilisées pour étudier le rôle de cette cytokine au niveau des processus de réparation (108; 172). Il n'en reste pas moins cependant que la dose de TNF- α que nous avons utilisée pour effectuer notre étude sur l'épithélium bronchique sain et FK, soit 40 ng/ml, est quand même élevée. En effet, chez les patients FK on note plutôt des concentrations inférieures ou égales à 5 ng/ml de TNF- α dans leurs lavages broncho-alvéolaires et

dans leurs expectorations (142; 173). Nous avons testé l'effet de 5 ng/ml de TNF- α sur la réparation des NuLi et des CuFi et nous avons pu observer une augmentation significative de la réparation. Cependant, comme l'effet stimulateur du TNF- α était plus grand à 40 ng/ml nous avons conservé cette concentration.

3.1. Effet du TNF- α sur l'activation des MMPs

Pour tenter d'expliquer l'effet du TNF- α sur la régénération épithéliale, nous avons étudié les mécanismes cellulaires qui pourraient être impliqués. Par des essais de zymographie, nous avons montré que le TNF- α stimulait la relâche et l'activation de la MMP-9 et que cet effet était renversé par l'inhibiteur à spectre large de métalloprotéinase GM6001. De plus, pour confirmer l'implication des MMP sur l'effet stimulateur du TNF- α sur la réparation, nous avons montré que l'inhibition des métalloprotéinases par le GM6001 réduit la stimulation de la réparation par le TNF- α . En fait, en calculant l'augmentation de la réparation par le TNF- α en présence et en absence de GM6001, chez les NuLi et les CuFi, nous pouvons observer que le TNF- α augmente de façon significativement plus importante la vitesse de réparation en absence (augmentation de $5942,5 \pm 1240,9$ et $7249,9 \pm 1440,0$ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ pour les NuLi et les CuFi respectivement) qu'en présence de GM6001 (augmentation de $2300,5 \pm 576,5$ et $1619,8 \pm 534,6$ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ pour les NuLi et les CuFi respectivement, $p < 0,002$). Il aurait aussi été intéressant d'étudier l'impact d'un inhibiteur spécifique de la MMP-9 sur la réparation pour ainsi déterminer l'implication de cette MMP sécrétée suite à la présence de TNF- α sur la réparation.

Il est connu que les métalloprotéinases sont grandement impliquées dans les processus de réparation. En effet, au niveau des poumons la MMP-7 ainsi que la MMP-9, -3, -10 et -11 stimulent la migration cellulaire en clivant les E-cadherines, favorisant le détachement des cellules les unes aux autres, et le remodelage de la matrice extracellulaire permettant aux cellules d'avancer (3; 88). D'autre part, les MMP-2 et -9 sont impliquées dans la diminution de la prolifération de l'épithélium trachéal en inhibant l'attachement de ces cellules au collagène de type I (3; 91).

Comme dans notre étude nous voyons principalement la relâche et l'activation de la MMP-9, l'effet stimulateur que nous observons sur la migration cellulaire et l'effet de diminution que nous voyons sur la croissance cellulaire pourrait s'expliquer en partie par l'action de cette MMP ce qui n'avait jamais été montré au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Il n'en reste pas moins cependant que le GM6001 n'abolit pas complètement l'effet stimulateur du TNF- α sur la réparation. Alors, d'autres protéases qui ne sont pas inhibées par le GM6001 comme la MMP-7, qui est aussi sécrétée suite à la présence de TNF- α et impliquée dans les processus de réparation (174), pourrait aussi être impliquée dans l'effet du TNF- α .

Dans un autre ordre d'idée, les métalloprotéinases telles que les MMP et les ADAM sont aussi impliquées dans la maturation de facteurs de croissance. Pour commencer, des études ont démontré que la MMP-7 ainsi que la MMP-2 et la MMP-9 sont impliquées dans la maturation du HB-EGF permettant l'activation du récepteur EGFR, impliqué dans l'activation des processus de réparation (175-177). Pour ce qui est des ADAMs, plusieurs d'entre elles participent à la maturation de facteurs de croissance. Par exemple, l'ADAM-10 et l'ADAM-17 peuvent induire la maturation des sept ligands d'erbB1, soit l'EGF, le TGF- α , le HB-EGF, l'amphiréguline, l'épiréguline, l'épigène et la betacelluline (178; 179). Alors, l'implication des métalloprotéinases dans la stimulation de la réparation par le TNF- α pourrait être aussi due à la maturation de facteurs de croissance, comme nous l'avons montré par la suite.

3.2. Effet du TNF- α sur la transactivation du récepteur EGFR

Nous avons précédemment montré au laboratoire de Dre Brochiero que la réparation de l'épithélium bronchique est grandement dépendante de l'activation de la voie catalytique du récepteur EGFR (44; 45). Alors, pour tenter d'expliquer l'effet stimulateur du TNF- α sur les processus de réparation, nous avons évalué l'effet du TNF- α sur l'activation de cette voie. Pour commencer, comme nous avons montré que le TNF- α entraînait la relâche et l'activation de la MMP-9 et que nous savons que

cette dernière est impliquée dans la maturation du HB-EGF (177), nous avons évalué la capacité du TNF- α à activer la maturation de l'EGF au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Nous avons pu confirmer cette hypothèse en montrant que le TNF- α entraînait une augmentation de la concentration d'EGF mature sécrété par les NuLi et les CuFi. De façon à confirmer le rôle du EGF sécrété dans la stimulation de la réparation par le TNF- α , nous avons aussi vérifié que la titration de l'EGF sécrété par un anticorps anti-EGF diminuait de façon importante la réparation de base (diminution de 60% chez les NuLi et de 40% chez les CuFi) et renverserait l'effet stimulateur du TNF- α sur la réparation. Alors, ces résultats démontrent que l'effet stimulateur du TNF- α sur la réparation est dû à une maturation de l'EGF qui pourrait se déclencher suite à l'activation de MMP.

Basé sur ces résultats, nous avons ensuite démontré que le TNF- α induisait l'activation du récepteur EGFR (augmentation du niveau de pEGFR). À l'inverse, nous avons aussi démontré que l'inhibition du récepteur EGFR pendant la réparation renversait complètement l'effet stimulateur du TNF- α en plus de réduire de façon significative la réparation de base de l'épithélium bronchique sain et FK.

En somme, ces résultats nous permettent de proposer pour la première fois dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques Fibrose Kystique que l'effet stimulateur du TNF- α sur la réparation puisse être consécutif à l'activation indirecte d'une boucle autocrine entre la sécrétion d'EGF et l'activation du récepteur EGFR. Plusieurs études ont précédemment démontré au niveau d'autres tissus l'activation de cette voie de signalisation en présence de TNF- α (87; 108; 180). Par exemple, au niveau de l'épithélium mammaire, la stimulation de la migration et de la prolifération cellulaire par le TNF- α est due à l'activation du récepteur EGFR (108). De plus, en se basant sur la littérature, il semblerait que la présence de TNF- α entraînerait l'activation de métalloprotéinases (ADAM et MMP) (108; 180) menant à la relâche et à la maturation de facteurs de croissance (175-177) pouvant activer le récepteur EGFR (87). Les résultats que nous avons obtenus semblent être en accord avec ce mécanisme (**figure 18**).

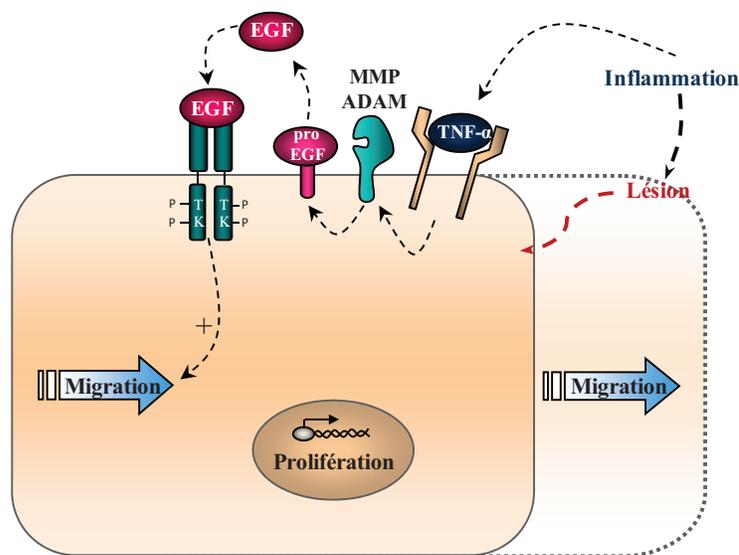


Figure 18: Représentation schématique de l'impact du TNF- α sur l'activation de la voie de signalisation EGF/EGFR. Suite à la présence de TNF- α , on observe l'activation de la MMP-9 et probablement d'autre protéase (ADAM, MMP), la relâche d'EGF ainsi que l'activation du récepteur EGFR favorisant ainsi la migration cellulaire.

Cependant, il aurait été pertinent d'évaluer l'effet d'un inhibiteur de métalloprotéinases tel que le GM6001 sur la relâche d'EGF et la phosphorylation du récepteur EGFR en présence de TNF- α pour ainsi étudier l'implication des métalloprotéinases dans ces deux phénomènes. D'ailleurs, nous avons commencé à étudier l'impact du GM6001 sur la sécrétion d'EGF et il semblerait bien que la sécrétion d'EGF soit réduite en présence de cet inhibiteur. De plus, des inhibiteurs plus spécifiques de différentes MMP et ADAM auraient pu être testés.

3.3. Effet du TNF- α sur l'activation des canaux potassiques

Nous avons montré dans des études précédentes que les canaux potassiques sont grandement impliqués dans la réparation de l'épithélium bronchique et de l'épithélium alvéolaire (44; 45). De plus, ces études ont démontré un couplage entre

l'activation des canaux potassiques et la voie de signalisation EGF/EGFR. Au cours de ma maîtrise, nous avons donc aussi étudié l'impact du TNF- α sur l'activité des canaux potassiques. En présence de TNF- α pendant 24 heures, nous avons pu observer une augmentation des courants potassiques KvLQT1 et K_{ATP} , ce qui nous permet de croire que le TNF- α entraîne l'activation de ces canaux potassiques. D'après la littérature, l'effet du TNF- α sur les canaux potassiques peut être très variable. En effet, le TNF- α stimule le canal Kv1.3, un canal faisant partie de la même famille que le canal KvLQT1 alors qu'il régule à la baisse le canal Kir2.1, de la même famille que le canal Kir6.1 (K_{ATP}) (58; 161). Dans une autre étude par contre, le TNF- α semble stimuler le canal K_{ATP} (162). Toutefois, comme les résultats sur les canaux à rectification entrante (Kir) semblent variables, nous aurions peut-être dû étudier plus finement les mécanismes d'activation de ces canaux. Pour commencer, étant donné que nous avons effectué la mesure des courants de KvLQT1 et K_{ATP} en même temps, il aurait été intéressant de mesurer leur courant séparément pour ainsi voir si le TNF- α avait le même effet sur chacun de ces canaux K^+ . De plus, comme nous voyons une stimulation des courants K^+ au bout de 24h de traitement au TNF- α , nous aurions pu regarder si l'expression génique et protéique de ces canaux augmentait suite à ce traitement.

Nous avons aussi évalué l'impact des canaux potassiques sur la réparation de l'épithélium bronchique. Nous avons observé qu'en présence d'inhibiteurs des canaux potassiques KvLQT1, K_{ATP} et $KCa3.1$, la réparation de l'épithélium bronchique sain et FK est grandement diminuée, ce qui confirme les résultats que nous avons déjà obtenus lors d'un papier précédent (44). Aussi, nous avons montré que l'effet stimulateur du TNF- α sur la réparation est complètement renversé en présence d'inhibiteurs des canaux potassiques. En somme, les résultats que nous avons obtenus sur l'activation des canaux potassiques et sur leur impact sur la réparation, nous permettent d'affirmer que l'effet stimulateur du TNF- α implique, du moins en partie, l'activation des canaux potassiques. De plus, comme nous avons montré précédemment au laboratoire que les canaux potassiques étaient stimulés par la voie EGF/EGFR (44; 45), nous pouvons donc supposer que l'activation des canaux potassiques par le TNF- α pourrait être due à l'activation du récepteur EGFR que nous

observons. Des expériences subséquentes seraient toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En résumé, les résultats que nous avons obtenus nous permettent d'émettre un modèle montrant que la présence de TNF- α entrainerait une activation de metalloprotéinase (plus particulièrement la MMP-9), une relâche d'EGF et l'activation subséquente du récepteur EGFR. Puis, l'activation de ce récepteur, en plus de favoriser la migration cellulaire, entrainerait l'activation des canaux potassiques aussi impliqués dans les processus de réparation. D'autre part, la présence de TNF- α causerait un ralentissement de la prolifération cellulaire soit directement ou via l'activation de la MMP-9 (figure 19).

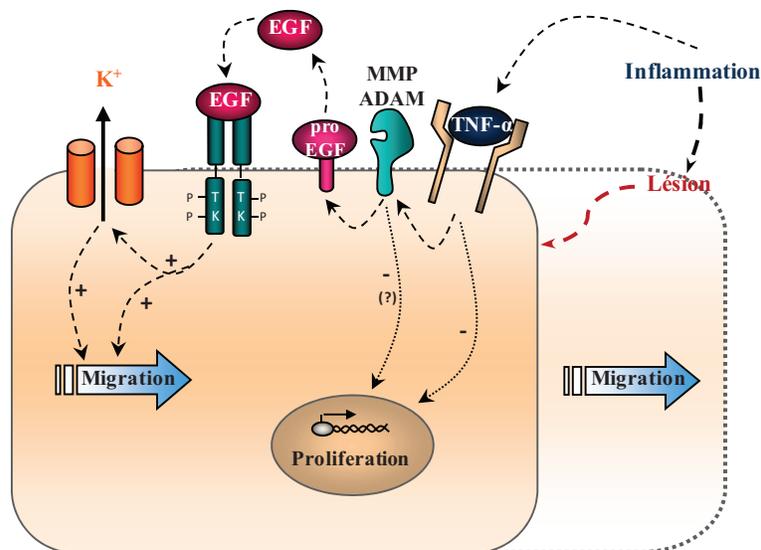


Figure 19: Représentation schématique de l'impact du TNF- α sur la régulation des processus de réparation de l'épithélium sain et Fibrose Kystique. La présence de TNF- α , entraîne l'activation des MMP (plus particulièrement de la MMP-9), la relâche d'EGF et l'activation subséquente du récepteur EGFR favorisant la migration cellulaire et activant les canaux potassiques qui sont aussi connus pour contrôler les processus de réparation. D'autre part, la présence de TNF- α mènerait au ralentissement de la prolifération cellulaire soit directement ou via l'activation des MMP.

3.4. Limitation de l'effet des différents inhibiteurs utilisés dans les essais de réparation

Pour montrer l'importance des métalloprotéinases, de l'EGF, du récepteur EGFR ainsi que des canaux potassiques dans la stimulation de la réparation par le TNF- α , nous avons utilisé différents anticorps et inhibiteurs pour bloquer ces différentes composantes. Cette démarche présente cependant quelques limitations. En effet, les inhibiteurs et les anticorps ne sont pas spécifiques à 100% et pourraient avoir un effet sur d'autres composantes inconnues impliquées dans les mécanismes étudiés. Par exemple, le GM6001, un inhibiteur à spectre large des MMP, inhibe aussi des ADAM, alors la diminution de la réparation en présence et en absence de TNF- α par cet inhibiteur pourrait être due à l'inhibition des MMP et/ou des ADAM. De plus, nous avons utilisé seulement une dose pour chaque type d'inhibiteur ou d'anticorps. Nous aurions pu effectuer, pour chaque produit, des courbes doses-réponses, permettant de vérifier si le IC50 calculé correspond à celui de la cible visée. De plus, nous aurions pu vérifier nos résultats à l'aide de siRNA contre les gènes des différentes composantes que nous avons étudiées. Nous avons toutefois pris soin, pour chaque voie qui a été inhibée par les agents pharmaceutiques dans les essais de réparation, de vérifier préalablement leur activation par les TNF- α à l'aide d'expérience de Ussing (canaux K⁺), de zymographie (MMP) ou de western blot (EGF, EGFR).

4. Retour sur les thérapies anti-inflammatoires utilisées en Fibrose Kystique

Plusieurs études comme la nôtre démontrent des effets bénéfiques de certaines cytokines au niveau de la réparation *in vitro* (3; 99; 160). Par exemple, l'IL-1 β stimule la réparation de l'épithélium alvéolaire (160). Cependant, il ne faut pas oublier que ces études sur la réparation sont réalisées *in vitro* ne représentant ainsi pas tout à fait la réalité. Ces études nous amènent quand même à nous poser des questions sur l'effet bénéfique des thérapies anti-inflammatoires, préconisées chez les patients FK.

Il existe des études cliniques portant sur les thérapies anti-cytokines, mais les résultats de ces études donnent des résultats contradictoires. En effet, dans certaines études on note un effet positif des thérapies anti-inflammatoires portant sur la neutralisation des cytokines chez les patients FK. Par exemple, il a été proposé qu'une thérapie anti-TNF- α utilisée jusqu'à maintenant pour le traitement d'arthrite rhumatoïde pourrait être bénéfique pour les patients souffrant de Fibrose Kystique. En effet, dans cette étude de cas, l'infliximab aurait amélioré la pathologie respiratoire d'un patient FK (181). Cependant, d'autres études ont montré que les thérapies anti-cytokines, visant une cytokine en particulier, ne fonctionnaient pas très bien dû à l'effet compensatoire d'autres voies de signalisation inflammatoires (68). D'autre part, les thérapies anti-inflammatoires visant la diminution de la réponse inflammatoire dans son ensemble amènent d'autres effets néfastes. En fait, certaines se sont montrées bénéfiques, telles que l'utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme l'ibuprofène (68; 151; 152), mais d'autres ont été abandonnées à cause du trop grand nombre d'effets secondaires qu'elles engendraient chez les patients, notamment au niveau de la capacité de défense immunitaire (104; 150).

En me basant sur les résultats que nous avons obtenus dans cette étude et sur les résultats obtenus sur l'implication des autres cytokines dans la régénération épithéliale ainsi que l'effet des thérapies anti-inflammatoires, je crois que des études sur l'implication de la réponse inflammatoire dans la régénération épithéliale chez les patients Fibrose Kystique devraient être menées pour ainsi approfondir les connaissances sur ce processus.

5. Hypothèses du défaut de régénération en Fibrose Kystique

La régénération épithéliale implique l'activation de plusieurs voies de signalisation et de protéines membranaires permettant aux cellules de se déplacer, de proliférer et de se différencier. Bien que les patients FK aient des niveaux plus élevés de facteurs de croissances, nous avons montré, lors de notre étude précédente, un retard de réparation au niveau des cellules FK (CuFi-1) par rapport aux cellules non-FK (NuLi-

1). De plus, nous avons montré que ce retard de réparation était accompagné d'une plus faible réponse de la voie de signalisation EGFR ainsi qu'une plus faible activation et expression des canaux potassiques (44). Lors de mon projet de maîtrise, nous avons décidé de conserver ces deux modèles cellulaires puisqu'ils représentent un modèle de comparaison FK/non-FK bien accepté dans la communauté scientifique et que le but de mon projet était de tenter d'expliquer en partie le retard de réparation que nous avons observé dans ce même modèle. Cependant, il existe plusieurs variantes entre les NuLi et les CuFi qui pourraient biaiser cette différence. En effet, comme les NuLi proviennent d'un homme de 36 ans et les CuFi d'une jeune fille de 14 ans, il existe à la base plusieurs différences géniques reliées à l'âge et au sexe entre les deux types cellulaires qui n'ont aucun lien avec la différence FK et non-FK. Pour nous assurer que la différence de réparation que nous observons était bel et bien due à la différence FK/non-FK, nous avons testé d'autres modèles cellulaires. Pour commencer, des résultats préliminaires effectués au laboratoire nous ont permis de confirmer un retard de réparation au niveau de cellules bronchiques humaines FK en culture primaire. Un défaut de régénération a aussi été montré dans d'autres laboratoires comme celui de Dre Coraux. En fait, son modèle de xénotransgreffe a permis de montrer que les épithéliums nasaux Fibrose Kystique présentaient un défaut de régénération (148). Ces différents résultats nous permettent de s'assurer que la différence de réparation entre les NuLi et les CuFi n'est pas due à une différence de profil génétique entre nos deux types de cellules. Les causes à la base de ce défaut de régénération de l'épithélium pulmonaire FK sont toutefois inconnues. Il existe néanmoins plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce phénomène, dont le défaut même du CFTR (**section 4.1**) et la présence continue d'infection d'inflammation (**section 4.2**).

5.1. Responsabilité du CFTR dans le défaut de régénération de l'épithélium bronchique FK

Il est évident que le défaut de CFTR est la différence de base entre les cellules non-FK et FK. Des études récentes effectuées dans notre laboratoire semblent indiquer un

rôle du canal CFTR dans la réparation épithéliale. En effet, en utilisant deux lignées cellulaires CFBE qui proviennent d'un même patient et dont l'une surexprime du CFTR sauvage (CFBE WT) et l'autre du CFTR avec la mutation $\Delta F508$ (CFBE $\Delta F508$), nous avons pu observer une vitesse de réparation plus lente chez les CFBE $\Delta F508$ que les CFBE WT. De plus, lorsqu'on inhibe la transcription du gène *CFTR* à l'aide d'un siRNA dans des cellules de polypes nasaux provenant de patients non-FK en culture primaire, on observe une diminution de la réparation par rapport aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (149). Dans le même ordre d'idée, il a été montré dans le laboratoire de Dr O'Grady que l'activité du canal CFTR est impliquée dans la capacité de migration des cellules et plus précisément dans la formation de lamellipodes qui permettent aux cellules de s'étendre dans une direction et donc d'avancer (182). En addition avec ce qui a été démontré par le laboratoire de Dr O'Grady, il a aussi été démontré que CFTR pouvait réguler l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase qui est l'une des forces motrices du transport ionique au niveau de la cellule (183). Cette variation de la pompe Na^+/K^+ ATPase pourrait donc influencer d'autres canaux et transporteurs tels que les canaux potassiques et les transporteurs NHE1 impliqués dans la migration cellulaire. Ceci pourrait donc expliquer, du moins en partie, l'implication de CFTR dans la migration cellulaire.

En somme, avec les nouvelles expériences que nous avons effectuées ainsi que celles faites par le laboratoire de Dr O'Grady, il semblerait que le canal CFTR joue bien un rôle dans la régénération épithéliale. L'absence de CFTR fonctionnel dans les cellules FK pourrait donc expliquer en partie le retard de réparation et de régénération de l'épithélium pulmonaire FK. Des études sont présentement en cours au laboratoire pour tenter d'élucider l'implication du CFTR dans les mécanismes de réparation.

5.2. Rôle de l'infection et de l'inflammation chronique dans le défaut de régénération de l'épithélium bronchique FK

Une autre composante importante de la pathologie de la Fibrose Kystique est la présence continue dès le jeune âge d'infection et d'inflammation au niveau de

l'épithélium des voies aériennes. La présence importante de cytokines pro-inflammatoires et d'infections mène au recrutement de cellules immunitaires, telles que les neutrophiles, contribuant au développement de lésions par leur capacité à sécréter des protéases et des ROS (103; 141). En somme, la présence chronique d'infection et de cellules immunitaires est responsable en grande partie de la sévérité des lésions au niveau de l'épithélium des voies aériennes. Cependant, est-ce que l'inflammation et l'infection pourraient également affecter directement la capacité des cellules à se réparer? C'est ce que nous avons tenté d'élucider en partie lors de mon projet de maîtrise traitant de l'impact de l'inflammation sur la régénération de l'épithélium des voies aériennes.

Il a été montré à ce sujet que les cytokines pro-inflammatoires pourraient réguler les processus de régénération épithéliale. Cependant, leur effet, qu'il soit positif ou négatif, est controversé et n'est pas très bien connu (3), c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'impact du TNF- α . Cette étude nous a permis de montrer un effet bénéfique du TNF- α sur la réparation de l'épithélium normal et Fibrose Kystique. Même si cette étude a montré un effet bénéfique du TNF- α sur la réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique, le TNF- α n'est pas la seule cytokine pro-inflammatoire présente chez les patients FK et l'effet global de l'ensemble des cytokines pourrait être différent de celui observé avec le TNF- α seul.

Alors, en continuation avec cette étude, il serait pertinent d'étudier l'impact d'autres cytokines pro-inflammatoires sur les processus de régénération épithéliale et même la combinaison de cytokines pro-inflammatoires pour ainsi mieux comprendre le rôle global de l'inflammation sur ce processus. Dans le même ordre d'idée, pour se rapprocher de la réalité, il serait aussi intéressant d'évaluer l'effet d'expectorations de patients FK sur la régénération épithéliale bronchique. En effet, comme on note la présence de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la présence de facteurs de virulences dans les expectorations des patients FK (142), ceci permettrait de mimer l'environnement physiologique auquel sont soumises les cellules épithéliales bronchiques.

Étant donné que la présence d'infections bactériennes et virales représente aussi un élément important de la pathologie respiratoire (79) de la Fibrose Kystique, il serait aussi intéressant d'étudier l'impact de composantes bactériennes, telles que l'impact de lipopolysaccharides de bactéries, et de filtrats de bactérie sur la régénération épithéliale. Dans des résultats préliminaires, nous avons pu observer que le filtrat de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* entraînait une diminution significative de la réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique. Cette diminution de la réparation était aussi associée à une diminution de la prolifération cellulaire. En continuation avec cette étude, il faudrait vérifier son impact sur la migration cellulaire ainsi que sur la voie de signalisation EGFR et sur les protéines membranaires telles que les différents canaux ioniques (canaux K^+ par exemple), les intégrines et les cadhérines qui sont impliqués dans la réparation. De plus, il serait pertinent d'étudier l'impact d'infections virales telles que celle au RSV puisque cette dernière est fréquente chez les jeunes patients FK, qu'elle entraîne une exacerbation de leur condition pulmonaire (184) et qu'elle facilite les infections bactériennes à *Pseudomonas aeruginosa* (80). Mes résultats préliminaires, menés au laboratoire de Dre Grandvaux, montrent que la réparation des cellules NuLi semble ralentie suite à une infection au RSV. Finalement, comme les infections virales cohabitent avec les infections bactériennes, il serait intéressant d'étudier l'impact des deux composantes ensemble sur la réparation de l'épithélium bronchique.

L'épithélium des voies aériennes des patients FK est incapable de se restaurer adéquatement pour maintenir un épithélium fonctionnel suite aux lésions continues et ceci pourrait être dû au défaut de base de la pathologie ainsi qu'à l'environnement infectieux et inflammatoire. Alors des études plus approfondies sur l'inflammation et les infections chroniques associé à la Fibrose Kystique nous permettraient de connaître de façon plus globale l'impact de l'environnement physiologique auquel fait face l'épithélium bronchique Fibrose Kystique et peut-être permettre un jour le développement de traitements plus adéquats pour ralentir la progression de cette pathologie.

Chapitre 5 : Conclusion

La pathologie de la Fibrose Kystique causée par la mutation du gène *CFTR* mène à la dysfonction du transport des fluides et des ions au niveau de l'épithélium pulmonaire. Ceci entraîne une diminution importante du liquide de surface des voies aériennes menant à une clairance mucociliaire déficiente et à l'accumulation et l'épaississement du mucus. Ce mucus devient un environnement idéal pour le développement d'infections et d'inflammation chroniques participant au développement d'injures et de remodelage pulmonaire et donc à l'insuffisance respiratoire associée à la Fibrose Kystique.

Les résultats obtenus pendant ma maîtrise, portant sur la régulation des processus de réparation de l'épithélium bronchique sain et Fibrose Kystique par le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire présente de façon importante au niveau des voies aériennes des patients FK, ont permis de mieux comprendre la complexité du rôle de cette cytokine dans la régénération épithéliale de l'épithélium bronchique. En effet, par cette étude nous avons montré que le TNF- α , en plus d'être impliqué dans les processus lésionnels, régule de façon complexe les processus de réparation en favorisant la migration tout en ralentissant la prolifération cellulaire. De plus, nous avons montré que l'effet positif du TNF- α sur la réparation semble être dû à l'activation de plusieurs protéines membranaires et voies de signalisation. Premièrement, le TNF- α entraîne l'activation de la MMP-9, qui favorise la migration cellulaire en permettant le remodelage de la matrice extracellulaire et ralentie la prolifération cellulaire en diminuant l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire. Aussi, le TNF- α mène à la relâche d'EGF et à l'activation du récepteur EGFR, tous les deux impliqués dans les processus de réparation, ainsi que dans l'activation des canaux potassiques jouant un rôle dans la régénération épithéliale comme nous l'avons montré dans des études précédentes (44; 45).

En somme, cette étude nous a permis de mieux comprendre la complexité de l'implication de la réponse inflammatoire, plus particulièrement du TNF- α , dans les processus de réparation. Ce projet incite l'ouverture de plusieurs champs d'études sur l'impact des composantes environnementales de l'épithélium bronchique FK. Ceci permettrait le développement de traitements plus adéquats pour cette pathologie.

Bibliographie

1. **Fraser RS.** Histology and Gross Anatomy of the Respiratory Tract. In: Anatomy, edited by Hamid Q, Shannon J and Martin J. Hamilton, Canada: BC Decker Inc., 2005, p. 1-14.
2. **Chilvers MA and O'Callaghan C.** Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 1: 27-34, 2000.
3. **Crosby LM and Waters CM.** Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: L715-L731, 2010.
4. **Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P and 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* 99: 1966-1971, 2002.
5. **Johnson MD.** Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst* 3: 178-186, 2007.
6. **Fehrenbach H.** Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2: 33-46, 2001.
7. **Brochiero E, Dagenais A, Prive A, Berthiaume Y and Grygorczyk R.** Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L382-L392, 2004.

8. **Bardou O, Trinh NT and Brochiero E.** Molecular diversity and function of K^+ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L145-L155, 2009.
9. **Garty H and Palmer LG.** Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77: 359-396, 1997.
10. **Boucher RC.** Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 445: 495-498, 2003.
11. **Boucher RC.** Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 271-281, 1994.
12. **Bangel-Ruland N, Sobczak K, Christmann T, Kentrup D, Langhorst H, Kusche-Vihrog K and Weber WM.** Characterization of the epithelial sodium channel delta-subunit in human nasal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 498-505, 2010.
13. **Haerteis S, Krueger B, Korbmacher C and Rauh R.** The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *J Biol Chem* 284: 29024-29040, 2009.
14. **Abi-Antoun T, Shi S, Tolino LA, Kleyman TR and Carattino MD.** Second transmembrane domain modulates epithelial sodium channel gating in response to shear stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1089-F1095, 2011.
15. **Berdiev BK, Qadri YJ and Benos DJ.** Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst* 5: 123-127, 2009.

16. **Talbot CL, Bosworth DG, Briley EL, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE and Barker PM.** Quantitation and localization of ENaC subunit expression in fetal, newborn, and adult mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 398-406, 1999.
17. **Gaillard D, Hinnrasky J, Coscoy S, Hofman P, Matthay MA, Puchelle E and Barbry P.** Early expression of beta- and gamma-subunits of epithelial sodium channel during human airway development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L177-L184, 2000.
18. **Marunaka Y, Niisato N, O'Brodivich H and Eaton DC.** Regulation of an amiloride-sensitive Na⁺-permeable channel by a beta2-adrenergic agonist, cytosolic Ca²⁺ and Cl⁻ in fetal rat alveolar epithelium. *J Physiol* 515 (Pt 3): 669-683, 1999.
19. **Shi W, Bellusci S and Warburton D.** Lung development and adult lung diseases. *Chest* 132: 651-656, 2007.
20. **Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R and Rossier BC.** Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12: 325-328, 1996.
21. **Berthiaume Y, Lesur O and Dagenais A.** Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* 54: 150-160, 1999.
22. **Ware LB and Matthay MA.** The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349, 2000.

23. **Berthiaume Y and Matthay MA.** Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 350-359, 2007.
24. **Zaika O, Mamenko M, O'Neil RG and Pochynyuk O.** Bradykinin acutely inhibits activity of the epithelial Na⁺ channel in mammalian aldosterone-sensitive distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1105-F1115, 2011.
25. **Pochynyuk O, Bugaj V, Rieg T, Insel PA, Mironova E, Vallon V and Stockand JD.** Paracrine regulation of the epithelial Na⁺ channel in the mammalian collecting duct by purinergic P2Y2 receptor tone. *J Biol Chem* 283: 36599-36607, 2008.
26. **O'Brodovich H, Canessa C, Ueda J, Rafii B, Rossier BC and Edelson J.** Expression of the epithelial Na⁺ channel in the developing rat lung. *Am J Physiol* 265: C491-C496, 1993.
27. **Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, Dagenais A and Berthiaume Y.** Impact of beta-adrenergic agonist on Na⁺ channel and Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 275: L414-L422, 1998.
28. **Tchepichev S, Ueda J, Canessa C, Rossier BC and O'Brodovich H.** Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *Am J Physiol* 269: C805-C812, 1995.
29. **Riordan JR.** CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 77: 701-726, 2008.

30. **Hwang TC and Sheppard DN.** Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol* 587: 2151-2161, 2009.
31. **Cheung JC and Deber CM.** Misfolding of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and disease. *Biochemistry* 47: 1465-1473, 2008.
32. **Mehta A.** CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr Pulmonol* 39: 292-298, 2005.
33. **Guggino WB and Stanton BA.** New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 426-436, 2006.
34. **Baker JM, Hudson RP, Kanelis V, Choy WY, Thibodeau PH, Thomas PJ and Forman-Kay JD.** CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol* 14: 738-745, 2007.
35. **Sheppard DN and Welsh MJ.** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23-S45, 1999.
36. **Carson MR, Travis SM and Welsh MJ.** The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 270: 1711-1717, 1995.
37. **Csanady L and Gadsby DC.** CFTR channel gating: incremental progress in irreversible steps. *J Gen Physiol* 114: 49-53, 1999.

38. **Riordan JR.** Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67: 701-718, 2005.
39. **Muallem D and Vergani P.** Review. ATP hydrolysis-driven gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 247-255, 2009.
40. **Fahy JV and Dickey BF.** Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* 363: 2233-2247, 2010.
41. **Randak CO and Welsh MJ.** Adenylate kinase activity in ABC transporters. *J Biol Chem* 280: 34385-34388, 2005.
42. **Boucher RC.** Human airway ion transport. Part two. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 581-593, 1994.
43. **Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN and Jan LY.** Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237: 749-753, 1987.
44. **Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J and Brochiero E.** EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L866-L880, 2008.
45. **Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noel J and Brochiero E.** Involvement of K_{ATP} and K_vLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L870-L882, 2007.

46. **Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M and Kunzelmann K.** Modulation of Ca^{2+} -activated Cl^- secretion by basolateral K^+ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* 53: 608-618, 2003.
47. **Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R and Kunzelmann K.** Role of KvLQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl^- secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 283-289, 2000.
48. **Grahammer F, Herling AW, Lang HJ, Schmitt-Graff A, Wittekindt OH, Nitschke R, Bleich M, Barhanin J and Warth R.** The cardiac K^+ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* 120: 1363-1371, 2001.
49. **O'Grady SM and Lee SY.** Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689-L700, 2003.
50. **Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P and Brochiero E.** Regulation of ENaC and CFTR expression with K^+ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L1207-L1219, 2006.
51. **Davis KA and Cowley EA.** Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflugers Arch* 451: 631-641, 2006.
52. **Inglis SK, Brown SG, Constable MJ, McTavish N, Olver RE and Wilson SM.** A Ba^{2+} -resistant, acid-sensitive K^+ conductance in Na^+ -absorbing H441

human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1304-L1312, 2007.

53. **Monaghan AS, Baines DL, Kemp PJ and Olver RE.** Inwardly rectifying K⁺ currents of alveolar type II cells isolated from fetal guinea-pig lung: regulation by G protein- and Mg²⁺-dependent pathways. *Pflugers Arch* 433: 294-303, 1997.
54. **Cowley EA and Linsdell P.** Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* 538: 747-757, 2002.
55. **Bernard K, Bogliolo S, Soriani O and 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.
56. **Singh AK, Devor DC, Gerlach AC, Gondor M, Pilewski JM and Bridges RJ.** Stimulation of Cl⁻ secretion by chlorzoxazone. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 778-787, 2000.
57. **Pompermayer K, Amaral FA, Fagundes CT, Vieira AT, Cunha FQ, Teixeira MM and 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.
58. **Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sanchez-Tillo E, Lopez-Iglesias C, Soler C, Solsona C, Celada A and Felipe A.** Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J Biol Chem* 278: 46307-46320, 2003.

59. **Kemp PJ, Lewis A, Hartness ME, Searle GJ, Miller P, O'Kelly I and Peers C.** Airway chemotransduction: from oxygen sensor to cellular effector. *Am J Respir Crit Care Med* 166: S17-S24, 2002.
60. **Kemp PJ, Hartness ME and Peers C.** Oxygen sensing by human recombinant large conductance, calcium-activated potassium channels. Regulation by chronic hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 536: 573-581, 2003.
61. **Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Vega-Saenz ME, Rudy B and Cutz E.** NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K^+ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13182-13187, 1996.
62. **Jovanovic S, Crawford RM, Ranki HJ and Jovanovic A.** Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels sense acute changes in oxygen tension in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 363-372, 2003.
63. **Smith DJ, Gaffney EA and Blake JR.** Modelling mucociliary clearance. *Respir Physiol Neurobiol* 163: 178-188, 2008.
64. **Clunes MT and Boucher RC.** Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech* 4: 63-72, 2007.
65. **Williams BJ, Dehnbostel J and Blackwell TS.** Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases. *Respirology* 15: 1037-1056, 2010.

66. **Kato A and Schleimer RP.** Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 19: 711-720, 2007.
67. **Ryu JH, Kim CH and Yoon JH.** Innate immune responses of the airway epithelium. *Mol Cells* 30: 173-183, 2010.
68. **Koehler DR, Downey GP, Sweezey NB, Tanswell AK and Hu J.** Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 377-381, 2004.
69. **Kumar H, Kawai T and Akira S.** Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 621-625, 2009.
70. **Turvey SE and Broide DH.** Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S24-S32, 2010.
71. **Chaudhuri N and Sabroe I.** Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatr Respir Rev* 9: 236-242, 2008.
72. **Suzuki T, Chow CW and Downey GP.** Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1348-1361, 2008.
73. **Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L and Strieter RM.** Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167: 623-627, 2001.

74. **Montes-Vizuet R, Vega-Miranda A, Valencia-Maqueda E, Negrete-Garcia MC, Velasquez JR and Teran LM.** CC chemokine ligand 1 is released into the airways of atopic asthmatics. *Eur Respir J* 28: 59-67, 2006.
75. **Terada N, Nomura T, Kim WJ, Otsuka Y, Takahashi R, Kishi H, Yamashita T, Sugawara N, Fukuda S, Ikeda-Ito T and Konno A.** Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin Exp Allergy* 31: 1923-1931, 2001.
76. **Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST and Davies DE.** Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 14: 1362-1374, 2000.
77. **Howat WJ, Holgate ST and Lackie PM.** TGF-beta isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L115-L123, 2002.
78. **de Bentzmann S., Roger P and Puchelle E.** Pseudomonas aeruginosa adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J* 9: 2145-2150, 1996.
79. **de Bentzmann S., Plotkowski C and Puchelle E.** Receptors in the Pseudomonas aeruginosa adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 154: S155-S162, 1996.
80. **de Vrankrijker AM, Wolfs TF, Ciofu O, Hoiby N, van der Ent CK, Poulsen SS and Johansen HK.** Respiratory syncytial virus infection facilitates acute colonization of Pseudomonas aeruginosa in mice. *J Med Virol* 81: 2096-2103, 2009.

81. **Coraux C, Roux J, Jolly T and Birembaut P.** Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc Am Thorac Soc* 5: 689-694, 2008.
82. **Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC and Rossi GA.** Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S35-S40, 2004.
83. **Mitchison TJ and Cramer LP.** Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-379, 1996.
84. **Schwab A.** Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F739-F747, 2001.
85. **Mogilner A and Oster G.** Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* 71: 3030-3045, 1996.
86. **White SR, Dorscheid DR, Rabe KF, Wojcik KR and Hamann KJ.** Role of very late adhesion integrins in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers after mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 787-796, 1999.
87. **Shepard HM, Brdlik CM and Schreiber H.** Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest* 118: 3574-3581, 2008.
88. **Gill SE and Parks WC.** Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1334-1347, 2008.

89. **Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, Birembaut P and Tournier JM.** Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol* 146: 517-529, 1999.
90. **Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH and Hogan BL.** Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12771-12775, 2009.
91. **Sigurdson L, Sen T, Hall L, III, Rubenfeld A, Hard R, Gardella J, Bright F and Hicks WL, Jr.** Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 197-200, 2003.
92. **Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P and Tournier JM.** Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 166: 413-426, 1996.
93. **Mucenski ML, Wert SE, Nation JM, Loudy DE, Huelsken J, Birchmeier W, Morrissey EE and Whitsett JA.** beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J Biol Chem* 278: 40231-40238, 2003.
94. **Mucenski ML, Nation JM, Thitoff AR, Besnard V, Xu Y, Wert SE, Harada N, Taketo MM, Stahlman MT and Whitsett JA.** Beta-catenin regulates differentiation of respiratory epithelial cells in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L971-L979, 2005.

95. **Myerburg MM, Latoche JD, McKenna EE, Stabile LP, Siegfried JS, Feghali-Bostwick CA and Pilewski JM.** Hepatocyte growth factor and other fibroblast secretions modulate the phenotype of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1352-L1360, 2007.
96. **Nadel JA and Burgel PR.** The role of epidermal growth factor in mucus production. *Curr Opin Pharmacol* 1: 254-258, 2001.
97. **Shute J, Marshall L, Bodey K and Bush A.** Growth factors in cystic fibrosis - when more is not enough. *Paediatr Respir Rev* 4: 120-127, 2003.
98. **Galiacy S, Planus E, Lepetit H, Fereol S, Laurent V, Ware L, Isabey D, Matthay M, Harf A and d'Ortho MP.** Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro. *Exp Cell Res* 283: 215-229, 2003.
99. **Geiser TK, Kazmierczak BI, Garrity-Ryan LK, Matthay MA and Engel JN.** Pseudomonas aeruginosa ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell Microbiol* 3: 223-236, 2001.
100. **Ahdieh M, Vandebos T and Youakim A.** Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C2029-C2038, 2001.
101. **Boxall C, Holgate ST and 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.
102. **Mukhopadhyay S, Hoidal JR and Mukherjee TK.** Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 7: 125, 2006.

103. **Chmiel JF, Berger M and Konstan MW.** The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 23: 5-27, 2002.
104. **Chmiel JF and Konstan MW.** Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 28: 331-346, 2007.
105. **Moon DO, Kim MO, Kang SH, Choi YH and Kim GY.** Sulforaphane suppresses TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett* 274: 132-142, 2009.
106. **Mitola S, Sorbello V, Ponte E, Copreni E, Mascia C, Bardessono M, Goia M, Biasi F, Conese M, Poli G, Bussolino F and De R, V.** Tumor necrosis factor-alpha in airway secretions from cystic fibrosis patients upregulate endothelial adhesion molecules and induce airway epithelial cell apoptosis: implications for cystic fibrosis lung disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21: 851-865, 2008.
107. **Besnard V, Nabeyrat E, Henrion-Caude A, Chadelat K, Perin L, Le BY and Clement A.** Protective role of retinoic acid from antiproliferative action of TNF-alpha on lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L863-L871, 2002.
108. **Chen WN, Woodbury RL, Kathmann LE, Opresko LK, Zangar RC, Wiley HS and Thrall BD.** Induced autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor contributes to the response of mammary epithelial cells to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 279: 18488-18496, 2004.

109. **Luo JC, Cho CH, Ng KM, Hsiang KW, Lu CL, Chen TS, Chang FY, Lin HC, Perng CL and Lee SD.** Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated gastric epithelial cell migration. *J Chin Med Assoc* 72: 509-514, 2009.
110. **Burgel PR and Nadel JA.** Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 32: 1068-1081, 2008.
111. **Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA and Kuriyan J.** An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125: 1137-1149, 2006.
112. **Yu FS, Yin J, Xu K and Huang J.** Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 81: 229-235, 2010.
113. **Zierler S, Frei E, Grissmer S and Kerschbaum HH.** Chloride influx provokes lamellipodium formation in microglial cells. *Cell Physiol Biochem* 21: 55-62, 2008.
114. **Kim MJ, Cheng G and Agrawal DK.** Cl⁻ channels are expressed in human normal monocytes: a functional role in migration, adhesion and volume change. *Clin Exp Immunol* 138: 453-459, 2004.
115. **Schwab A, Hanley P, Fabian A and Stock C.** Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology (Bethesda)* 23: 212-220, 2008.
116. **Schwab A.** Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci* 16: 29-33, 2001.

117. **Wang Z.** Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch* 448: 274-286, 2004.
118. **Wonderlin WF and Strobl JS.** Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* 154: 91-107, 1996.
119. **Woodfork KA, Wonderlin WF, Peterson VA and Strobl JS.** Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 162: 163-171, 1995.
120. **Wallace WA, Fitch PM, Simpson AJ and Howie SE.** Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point. *Int J Exp Pathol* 88: 103-110, 2007.
121. **Watelet JB, Van ZT, Gjomarkaj M, Canonica GW, Dahlen SE, Fokkens W, Lund VJ, Scadding GK, Mullol J, Papadopoulos N, Bonini S, Kowalski ML, Van CP and Bousquet J.** Tissue remodelling in upper airways: where is the link with lower airway remodelling? *Allergy* 61: 1249-1258, 2006.
122. **Wynn TA.** Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210, 2008.
123. **Bergeron C, Al-Ramli W and Hamid Q.** Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6: 301-305, 2009.
124. **Halwani R, Al-Muhsen S and Hamid Q.** Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 10: 236-245, 2010.

125. **Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y and Elias JA.** Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103: 779-788, 1999.
126. **Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, Tarallo A, Stripp B, Whitsett J and Flavell RA.** Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7821-7825, 1996.
127. **Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK and Kitani A.** IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12: 99-106, 2006.
128. **Rowntree RK and Harris A.** The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 67: 471-485, 2003.
129. **Davies JC.** Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev* 3: 128-134, 2002.
130. **Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL and .** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.
131. **Proesmans M, Vermeulen F and De BK.** What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr* 167: 839-849, 2008.

132. **Choo-Kang LR and Zeitlin PL.** Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defects and opportunities for therapy. *Curr Opin Pulm Med* 6: 521-529, 2000.
133. **Kerem E.** Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatr Pulmonol* 40: 183-196, 2005.
134. **McAuley DF and Elborn JS.** Cystic fibrosis: basic science. *Paediatr Respir Rev* 1: 93-100, 2000.
135. **Borgo G, Cabrini G, Mastella G, Ronchetto P, Devoto M and Romeo G.** Phenotypic intrafamilial heterogeneity in cystic fibrosis. *Clin Genet* 44: 48-49, 1993.
136. **Boucher RC.** Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med* 13: 231-240, 2007.
137. **Thelin WR and Boucher RC.** The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 7: 290-295, 2007.
138. **Dovey M, Wisseman CL, Roggli VL, Roomans GM, Shelburne JD and Spock A.** Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21: 521-534, 1989.
139. **Pedersen SS.** Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *APMIS Suppl* 28: 1-79, 1992.
140. **Dulon S, Leduc D, Cottrell GS, D'Alayer J, Hansen KK, Bunnnett NW, Hollenberg MD, Pidard D and Chignard M.** *Pseudomonas aeruginosa*

elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 411-419, 2005.

141. **Courtney JM, Ennis M and Elborn JS.** Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3: 223-231, 2004.
142. **Kronborg G, Hansen MB, Svenson M, Fomsgaard A, Hoiby N and 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* 15: 292-297, 1993.
143. **Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R and Fick R.** The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 20: 63-70, 1995.
144. **Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A and Phelan PD.** Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* 310: 1571-1572, 1995.
145. **Konstan MW and Berger M.** Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 24: 137-142, 1997.
146. **Luciani A, Villella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, Gavina M, Pulze L, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, D'Apolito M, Guido S, Masliah E, Spencer B, Quaratino S, Raia V, Ballabio A and Maiuri L.** Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 12: 863-875, 2010.

147. **Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS and Davis PB.** CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L383-L395, 2007.
148. **Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E and Coraux C.** Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 211: 340-350, 2007.
149. **Trinh NT, Maille E, Prive A and Brochiero E.** Defect in CF bronchial epithelial repair after injury: role of the CFTR channel. *Pediatr Pulmonol* 254: 2010.
150. **Nichols DP, Konstan MW and Chmiel JF.** Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 35: 135-153, 2008.
151. **Konstan MW and Davis PB.** Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1409-1423, 2002.
152. **Jacquot J, Tabary O, Le RP and Clement A.** Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1703-1715, 2008.
153. **Yousef AA and Jaffe A.** The role of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 11: 108-114, 2010.
154. **Tiddens HA, Donaldson SH, Rosenfeld M and Pare PD.** Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively? *Pediatr Pulmonol* 45: 107-117, 2010.

155. **Sheppard DN.** Cystic fibrosis: CFTR correctors to the rescue. *Chem Biol* 18: 145-147, 2011.
156. **Sloane PA and Rowe SM.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 16: 591-597, 2010.
157. **Reenstra WW, Yurko-Mauro K, Dam A, Raman S and Shorten S.** CFTR chloride channel activation by genistein: the role of serine/threonine protein phosphatases. *Am J Physiol* 271: C650-C657, 1996.
158. **Randak C, Auerswald EA, ssfalg-Machleidt I, Reenstra WW and Machleidt W.** Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein. *Biochem J* 340 (Pt 1): 227-235, 1999.
159. **Mall M and Kunzelmann K.** Correction of the CF defect by curcumin: hopes and disappointments. *Bioessays* 27: 9-13, 2005.
160. **Geiser T, Jarreau PH, Atabai K and Matthay MA.** Interleukin-1beta augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1184-L1190, 2000.
161. **Vicente R, Coma M, Busquets S, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM and Felipe A.** The systemic inflammatory response is involved in the regulation of K⁺ channel expression in brain via TNF-alpha-dependent and -independent pathways. *FEBS Lett* 572: 189-194, 2004.

162. **El-Ani D and Zimlichman R.** TNF α stimulated ATP-sensitive potassium channels and attenuated deoxyglucose and Ca uptake of H9c2 cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 716-720, 2003.
163. **Dunsmore SE and Rannels DE.** Extracellular matrix biology in the lung. *Am J Physiol* 270: L3-27, 1996.
164. **Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM and Coraux C.** Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3: 726-733, 2006.
165. **Rowe RK, Brody SL and Pekosz A.** Differentiated cultures of primary hamster tracheal airway epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40: 303-311, 2004.
166. **Skibinski G, Elborn JS and Ennis M.** Bronchial epithelial cell growth regulation in fibroblast cocultures: the role of hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L69-L76, 2007.
167. **Van Winkle LS, Buckpitt AR, Nishio SJ, Isaac JM and Plopper CG.** Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *Am J Physiol* 269: L800-L818, 1995.
168. **Tournier JM, Maouche K, Coraux C, Zahm JM, Cloez-Tayarani I, Nawrocki-Raby B, Bonnomet A, Burlet H, Lebargy F, Polette M and Birembaut P.** $\alpha_3\alpha_5\beta_2$ -Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells. *Am J Pathol* 168: 55-68, 2006.

169. **O'Sullivan BP and Freedman SD.** Cystic fibrosis. *Lancet* 373: 1891-1904, 2009.
170. **Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, Petroff E, Vermeer DW, Kabel AC, Yan Z, Spate L, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Linville ML, Korte SW, Engelhardt JF, Welsh MJ and Prather RS.** Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest* 118: 1571-1577, 2008.
171. **Coraux C, Hajj R, Lesimple P and Puchelle E.** [Repair and regeneration of the airway epithelium]. *Med Sci (Paris)* 21: 1063-1069, 2005.
172. **Takeda N, Sumi Y, Prefontaine D, Al AJ, Al HN, Al-Ramli W, Michoud MC, Martin JG and Hamid Q.** Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clin Exp Allergy* 39: 1018-1026, 2009.
173. **Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H and Berger M.** Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111-2118, 1995.
174. **Salmela MT, Pender SL, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Macdonald TT and Saarialho-Kere U.** Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand J Gastroenterol* 39: 1095-1104, 2004.
175. **Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A and Fernandez-Patron C.** Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction

through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 94: 68-76, 2004.

176. **Kivisaari AK, Kallajoki M, Ia-aho R, McGrath JA, Bauer JW, Konigova R, Medvez M, Beckert W, Grenman R and Kahari VM.** Matrix metalloproteinase-7 activates heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 163: 726-735, 2010.
177. **Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S and Matrougui K.** Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation* 110: 3587-3593, 2004.
178. **Blobel CP, Carpenter G and Freeman M.** The role of protease activity in ErbB biology. *Exp Cell Res* 315: 671-682, 2009.
179. **Edwards DR, Handsley MM and Pennington CJ.** The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29: 258-289, 2008.
180. **Argast GM, Campbell JS, Brooling JT and Fausto N.** Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* 279: 34530-34536, 2004.
181. **Casserly B and Donat W.** Stabilization of lung function and clinical symptoms in a patient with cystic fibrosis (CF) after institution of infliximab: a monoclonal antibody that binds tumor necrosis factor alpha. *Lung* 187: 149-152, 2009.

182. **Schiller KR, Maniak PJ and O'Grady SM.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C912-C921, 2010.

183. **Ito Y, Mizuno Y, Aoyama M, Kume H and Yamaki K.** CFTR-Mediated anion conductance regulates Na⁺-K⁺-pump activity in Calu-3 human airway cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 230-235, 2000.

184. **Robinson KA, Odelola OA, Saldanha I and McKoy N.** Palivizumab for prophylaxis against respiratory syncytial virus infection in children with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD007743, 2010.

