Rôles du calcium et des transports ioniques de l'épithélium des voies aériennes dans la réponse à l'agression septique par Pseudomonas aeruginosa.

Julien Buyck

▶ **To cite this version:**

Julien Buyck. Rôles du calcium et des transports ioniques de l'épithélium des voies aériennes dans la réponse à l'agression septique par Pseudomonas aeruginosa.. Physiologie [q-bio.TO]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT : . tel-00386909

HAL Id: tel-00386909

https://theses.hal.science/tel-00386909

Submitted on 22 May 2009

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

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

Université du Droit et de la santé – Lille 2
Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Julien BUYCK

Le 18 Décembre 2008

Rôles du calcium et des transports ioniques de l'épithélium des voies aériennes dans la réponse à l'agression septique par *Pseudomonas aeruginosa.*

Composition du jury :

Président :	Professeur Benoît GUERY (Lille)
Rapporteurs :	Professeur Jean-Pierre SAVINEAU (Bordeaux)
	Professeur André DENJEAN (Paris)
Examinateurs :	Docteur Valérie URBACH (Montpellier)
Directeurs de Thèse :	Professeur Régis MATRAN (Lille)
	Docteur Karine FAURE (Lille)

Je dédie cette thèse :

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu et sans qui tout cela n'aurait été possible…

A Sophie, ma compagne de tous les jours, qui a toujours cru en moi et qui a dû me supporter au cours des moments difficiles…

A ma sœur, à ma grand-mère, à ma famille et à mes amis…

Remerciements

- *Je remercie le Professeur Rémi Nevière pour m'avoir aimablement accueilli au sein du laboratoire de Physiologie.*

- *Je remercie très sincèrement le Professeur Régis Matran et le Docteur Karine Faure pour avoir codirigé cette thèse. Merci pour vos conseils et pour m'avoir guidé tout au long de mon doctorat. Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter et de défendre les résultats de mes travaux à de nombreux séminaires nationaux et internationaux.*

- *Je remercie chaleureusement le Professeur Benoit Guéry pour ces précieux échanges scientifiques et ses orientations tout au long de mon travail et pour m'avoir appris tant de choses sur ces sympathiques petits pathogènes.*

- *Merci au Docteur Valérie Urbach pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ensoleillé de Montpellier. Mille mercis pour cette opportunité extraordinaire, pour ta disponibilité, pour ton soutien dans ce travail et ton enthousiasme constant.*

- *Je remercie le Docteur Eric Kipnis, pour ses discussions et remarques toujours pertinentes et aussi pour ses corrections anglophones.*

- *Spéciale dédicace à tous les futurs, actuels et anciens thésards avec qui j'ai eu l'immense plaisir de cohabiter dans ces locaux : Maya, Chanez, Aurore, Charlotte, Natacha, Christophe, Rima, Maud, Florence sans oublier Fanny et David.*

- *Un merci tout spécial à Hélène, ma jumelle d'écriture, avec qui j'ai vécu quasiment en parallèle cette aventure avec ses hauts et ses bas et à chaque fois, on s'est soutenu mutuellement !! Simplement merci pour tous ces moments, cette belle amitié et je te souhaite tout le meilleur pour l'avenir…*

- *Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler au département de Physiologie : Brigitte, Steve, Sidi, Youcef, Xavier, David sans oublier Robert et Jean-Louis qui m'ont aidé techniquement dès mon arrivée au laboratoire. Merci aux gens du 6ème : Pascal, Nathalie, Marie-Do, Didier. Je n'oublie pas non plus de remercier Micheline qui se démène tous les jours pour nous rendre un peu plus agréable ce vieux labo…*

- *Merci aussi à tous les membres de l'équipe de Montpellier. Je pense particulièrement à Rima, Yaël, Azzouz et d'autres que j'oublie forcément. Un merci tout particulier à Valia, partenaire de mon travail montpelliérain. Merci pour ton aide, pour tes accueils chaleureux dans différents endroits du monde et toutes nos conversations enrichissantes.*

- *Merci aussi aux autres équipes chez qui et avec qui j'ai travaillé et en particulier Solenne et le Dr. Philippe Gosset à l'institut Pasteur; merci à Julie Kerr-conte et Sandrine du service commun de culture cellulaire et aussi Harold du service commun d'imagerie cellulaire.*

- *Je remercie Messieurs les Professeurs André Denjean et Jean-Pierre Savineau d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse.*

- *Il me serait difficile de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce parcours tortueux qu'est le doctorat. En espérant n'oublier qui que ce soit, Je souhaiterais tout de même citer : les FSI (Ju, Mehdi, Arnaud et Thierry), Audrey, François et lyse, Clém, Céline et Guigui, Ingrid, Anne-so, Cyrielle, Dam's, David et Véro, Val et Raphaël, Isabelle, Jérém, Ju caron, Maud, Michael, Mimi, Selvete.*

- *Enfin je remercie toutes les personnes qui se sont portées volontaires pour la relecture de ce manuscrit et en particulier Michèle et le Docteur Natie…*

- *Je remercie l'université de Lille 2 et à la région Nord-Pas de Calais pour le soutien financier qu'elles m'ont accordé pour développer ce projet de recherche.*

Ce travail a été réalisé sous la codirection du Professeur Régis MATRAN et du Docteur Karine FAURE, au sein de l'EA 2689, IFR 114 (IMPRT) de la Faculté de Médecine de Lille et en collaboration avec le Dr Valérie URBACH de l'unité INSERM U661 de Montpellier. Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Publications:

J. Buyck, K. Faure, E. Kipnis, B. Decoster, R. Matran, B. Guery. EGTA prevents *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung epithelial cell-death through decreased ExoS translocation. Microbial pathogenesis, en révision, Novembre 2008

David Boutoille, Julien Buyck, Jocelyne Caillon, Gilles Potel, Patrick Plésiat, Benoît Guery, Karine Faure. MexAB-OprM-overproduction and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: assessment *in vitro* and in experimental models of lung infection. Journal of Infectious disease, soumis en Octobre 2008

BUYCK J., VERRIERE V., BENMAHDI R., GUERY B., FAURE K., MATRAN R. and URBACH V. Effects of LPS from *Pseudomonas aeruginosa* on intracellular $Ca^{2+}$and Cl^- secretion in bronchial epithelial cell lines 16HBE14o-. En rédaction

Ce travail a donné lieu aux communications suivantes :

Communications affichées :

BUYCK J., FAURE K., MARECHAL X., GUERY B., MATRAN R.
Is intracellular calcium concentration in lung epithelial cells a signal for Pseudomonas aeruginosa type III secretion system activation? J2R 2007, Octobre 2007, Paris.

BUYCK J., FAURE K., MARECHAL X., GUERY B., MATRAN R.
Is intracellular calcium concentration in lung epithelial cells a signal for *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system activation? European CF young investigator meetings, Aout 2007, Lille.

BUYCK J., FAURE K., MARECHAL X., GUERY B., MATRAN R.
Le signal calcique intracellulaire est-il un signal déterminant dans l'activation du SST3 de *Pseudomonas aeruginosa* ? Congrès des jeunes chercheurs de VLM, Mars 2007, Paris.

BUYCK J., VERRIERE V., BENMAHDI R., GUERY B., URBACH V., MATRAN R.
Effets du LPS de Pseudomonas aeruginosa sur la sécrétion de Cl- et l'entrée de Ca2+ dans les cellules épithéliales respiratoires humaines. J2R, Octobre 2006, Tours.

ZIBOUCHE R., BUYCK J., MATRAN R., BETBEDER D.
Evaluation of The Cytoadhesion-Cytoinvasion of 60 nm Nanoparticles on Human Bronchial Epithelium Cells. J2R, Octobre 2006, Tours.

BUYCK J., VERRIERE V., BENMAHDI R., GUERY B., URBACH V., MATRAN R.
*Effets du LPS de Pseudomonas aeruginosa sur la sécrétion de Cl- et l'entrée de Ca2+ dans les cellules épithéliales respiratoires humaines***.** JAV 2006, Octobre 2006, Lille.

BUYCK J., GUERY B., MATRAN R.
Effets de la bactérie Pseudomonas aeruginosa sur les cellules respiratoire humaine. Doctoriales 2006, Septembre 2006, Lesquin.

BUYCK J., VERRIERE V., BENMAHDI R., MATRAN R., URBACH V.
Effects of LPS from Pseudomonas aeruginosa on Cl- secretion and intracellular Ca2+ in airways epithelial cells. ECFS 2006, Avril 2006, Carvoiero (Portugal).

Communications orales :

BUYCK J., FAURE K., MARECHAL X., GUERY B., MATRAN R.
Regulation of airways epithelial secretion by virulence factors of Pseudomonas aeruginosa. Seminar ERC, RCSI, Juin 2008, Dublin (Irlande).

BUYCK J., FAURE K., MARECHAL X., GUERY B., MATRAN R.
Is intracellular calcium concentration in lung epithelial cells a signal for *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system activation? European CF young investigator meetings, Aout 2007, Lille.

BUYCK J., FAURE K., MARECHAL X., GUERY B., MATRAN R.
Caractérisation de la cinétique de prolifération d'une infection pulmonaire à Pseudomonas aeruginosa par bioluminescence. OPTDIAG, Mai 2007, Paris.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX 1

ABREVIATIONS 3

INTRODUCTION 5

I. Structure et fonctions de l'épithélium des voies aériennes humaines 7

I.A. Structure 7

I.A.1. Description des voies aériennes 7

I.A.2. L'épithélium 8

I.B. Les fonctions de l'épithélium des voies aériennes humaines 11

I.C. Les transports épithéliaux 14

I.C.1. Les canaux ioniques 14

a) Le transport de sodium 14

b) Le transport de chlore 16

c) Le transport de potassium 20

d) Les autres transporteurs épithéliaux 21

I.C.2. Modèle des transports transépithéliaux 22

I.D. Les seconds messagers intracellulaires 25

I.D.1. L'AMPc 25

I.D.2. Le calcium et sa régulation 25

a) Origines du calcium 26

b) Régulation 29

c) Influences sur les transports ioniques 30

I.D.3. Le NO et le pH 31

I.E. Physiopathologies de l'épithélium 32

I.E.1. L'asthme 32

I.E.2 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) 32

I.E.3. La mucoviscidose 33

I.E.4. Les infections respiratoires 35

II. Les infections du système respiratoire par *P. aeruginosa* 36

II.A. Pseudomonas aeruginosa 36
II.A.1. Caractéristiques générales 36
II.A.2. Infections dues à P. aeruginosa en clinique humaine 36
II.B. Physiologie de la virulence de P. aeruginosa 37
II.B.1. Les facteurs associés 37
a) Les pili, le flagelle 37
b) L'alginate 38
c) Les lipopolysaccharides (LPS) 38
II.B.2. Les facteurs secrétés 42
a) Les systèmes de sécrétion 42
b) Les facteurs secrétés 43
II.B.3. Le système de sécrétion de type III 46
a) Description 46
b) Les toxines 47
c) Régulation du SSTT 48
II.B.4. Le Quorum Sensing 53

III. Régulation de la sécrétion de l'épithélium respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa* 55

III.A. Le calcium des cellules épithéliales 55
III.B. Les transports ioniques. 58

PRESENTATION DU TRAVAIL 60

I. Synthèse : contexte de l'étude 61

II. Hypothèses et objectifs de travail 62

MATERIELS ET METHODES 63

I. Modèles expérimentaux. 64

I.A. Souches bactériennes et facteurs de virulence 64
I.A.1. Souches bactériennes 64
I.A.2. Culture bactérienne 64
I.A.3. Modèle infectieux in vitro 65

I.A.4. Lipopolysaccharide 65
I.B. Culture cellulaire ***65***
I.B.1. Lignée 16HBE14o$^-$ 65
I.B.2. Lignée A549 66
II. Microscopie de fluorescence **67**
II.A. Principe ***67***
II.B. La mesure des variations du Ca^{2+} intracellulaire ***67***
II.B.1. Sonde utilisée 67
II.B.2. Protocole 68
II.B.3. Solution et produits utilisés 69
II.B.4. Acquisition et analyse 69
II.C. La mesure de la mortalité cellulaire ***70***
II.C.1. Sondes utilisées 70
II.C.2. Protocole 70
II.C.3. Solution et produits utilisés 70
II.C.4. Acquisition et analyse 71
III. Electrophysiologie : Les chambres d'Ussing **71**
III.A. Principe ***71***
III.B. Matériel ***72***
III.C. Solutions et produits chimiques utilisés ***73***
III.D. Protocole ***74***
IV. Autres techniques **75**
IV.A. Etude des protéines secrétées du système SSTT de P. aeruginosa ***75***
IV.A.1. Isolation de protéines bactériennes secrétées 75
IV.A.2. Dosage des protéines 75
IV.A.3. Migration 75
IV.A.4. Transfert 76
IV.A.5. Immuno-détection 76
IV.B. Test de cytotoxicité ***77***
IV.C. Mesure de l'activation du SSTT ***78***
IV.D. Bactéricidie ***78***

IV.E. Adhésion bactérienne 78

RESULTATS 79

I. L'effet protecteur de l'EGTA sur la mort cellulaire induite par le SSTT de *Pseudomonas aeruginosa*..... 80

II. Effets du LPS de *Pseudomonas aeruginosa* sur le calcium intracellulaire et la sécrétion de chlore des cellules épithéliales bronchiques humaines. 116

II.A. Introduction 116

II.B. Présentation des résultats 117

II.B.1. Effets du LPS sur le calcium intracellulaire 117

a) Origine de l'augmentation de calcium 117

b) Les canaux membranaires impliqués dans l'influx calcique 119

c) Rôle des récepteurs P2Y2 121

II.B.2. Le LPS et les transports ioniques 122

a) Effets du LPS sur le courant de court-circuit 122

b) Implication des ENaCs 123

c) Implication des canaux chlorures 123

d) Effets du calcium sur le transport de chlore 125

II.C. Discussion et conclusion 126

II.C.1. L'effet du LPS sur le $[Ca^{2+}]_I$ 126

II.C.2. Origines de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ 127

II.C.3. Effet du LPS sur le courant de court-circuit 129

DISCUSSION..... 131

I. L'interrelation Hôte / pathogène 132

I.A. P. aeruginosa perturbateur de l'équilibre épithélial..... 133

I.B. Importance de l'adhésion..... 135

II. Le calcium élément majeur dans la réponse épithéliale aux infections 136

II.A. Le calcium régulateur de la barrière épithéliale. 136
II.B. Le calcium cible de P. aeruginosa 137
II.C. Le calcium dans la mucoviscidose 138

III. L'augmentation de la sécrétion de fluides apicale 139

III.A. P. aeruginosa, modulateur de la sécrétion de fluide 139
III.B. A qui profite le maintien d'une sécrétion de fluide ? 140

BIBLIOGRAPHIE 142

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Figure 1 : Représentation schématique de la structure des parois des voies aériennes 8

Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un épithélium bronchique 10

Figure 3 : Représentation schématique de la structure du canal ENaC. 15

Figure 4 : Schéma de la protéine CFTR. 17

Figure 5 : Les transports ioniques dans l'épithélium bronchique humain 24

Figure 6 : Les canaux cationiques non spécifiques de la famille TRP 28

Figure 7 : Représentation schématique des voies de régulation de l'homéostasie calcique 30

Figure 8 : Schéma de la structure du LPS de *Pseudomonas aeruginosa* 40

Figure 9 : Schéma représentant l'organisation du système de sécrétion de type III. 47

Figure 10 : Modèle d'induction du SSTT *in vitro.* 50

MATERIELS ET METHODES

Tableau 1 : Composition du milieu LB. 65

Figure 11 : Principe d'acquisition d'images par microscopie de fluorescence. 68

Figure 12 : Schéma des chambres d'Ussing horizontales. 73

RESUTATS

Figure 1. Origine du calcium impliqué dans l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le LPS de Pseudomonas aeruginosa 118

Figure 2. Effets des inhibiteurs de différents canaux calciques sur l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* 120

Figure 3. Effets de la suramine sur l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* 121

Figure 4. Augmentation du courant de court-circuit (scc) induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* 122

Figure 5. Effets des inhibiteurs de différents canaux sur l'augmentation du courant de court-circuit (scc) induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*..... 124

Figure 6. Effets des inhibiteurs de différents canaux calciques sur l'augmentation du courant de court-circuit (scc) induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* 125

ABREVIATIONS

2-APB	2 aminoethoxydiphenyl diborate
ABC	ATP Binding Cassette
AM	Acetoxyméthyl ester
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASGM1	Asialoganglioside M1
ASL	Airway Surface Liquid (liquide de surface des voies aériennes)
ATP	Adénosine triphosphate
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
Ca^{2+}	Ion Calcium
CaCC	Calcium-activated Chloride Channel
CCNS	Canal Cationique Non Spécifique
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CFU	Colony Forming Unit
Cl^-	Ion chlore
CO_2	Dioxyde de Carbone
DIDS	4,4'-di-isothiocyananatostilbène-2,2'-disulfonic acid
DMSO	Diméthylsulfoxide
DPC	Diphenylamine-2-carboxylic acid
DO	Densité Optique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthyléther) N,N,N',N'-tétra-acétique
ENaC	Epithelial Sodium Channel
G-CSF	Granulocytes Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HBE	Human bronchial epithelial
HBS	Hepes Buffer Saline
HEPES	Acide hydroxyéthyl-pipérazine-éthane-silfonique
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
Isc	Courant de court-circuit
K^+	Ion Potassium
kDa	Kilo Daltons

LB	Milieu Luria Bertani
LDH	Lactate Déhydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
MOI	Multiplicity Of Infection
Na^+	Ion sodium
NBD	Nucleotide Binding domain
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid
NO	Monoxyde d'azote
O_2	Dioxygène
ORCC	Outlet Rectifying Chloride Channel
PBS	Phosphate Buffer Saline
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
Qsp	Quantité suffisante pour
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SITS	4-Acetamido-4′-isothiocyanato-2,2′-stilbenedisulfonic acid
SSTT	Système de sécrétion de type III
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRP	Transient Receptor Potential
UFC	Unité formant une colonie
UTP	Uridine triphosphate

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Ce travail porte sur le rôle du calcium intracellulaire des cellules épithéliales lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa*, et sur les influences des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sur les transports ioniques transépithéliaux.

Un premier chapitre sera consacré à la structure des voies aériennes, et à l'organisation fonctionnelle de l'épithélium respiratoire : la production de mucus et l'hydratation de ce mucus via des transports ioniques, le rôle des seconds messagers intracellulaires comme le calcium et l'AMP cyclique dans ces transports, et les conséquences au niveau physiopathologique lors de dérégulations de ces fonctions.

Dans un deuxième chapitre, seront décrites les particularités du pathogène *P. aeruginosa*, ses conséquences au niveau clinique et les stratégies mises en place pour infecter son hôte.

Enfin, nous traiterons du rôle du calcium intracellulaire et des transports d'ions de l'épithélium dans les infections respiratoires à *P. aeruginosa* et les conséquences au niveau des pathologies respiratoires.

I. Structure et fonctions de l'épithélium des voies aériennes humaines

I.A. Structure

I.A.1. Description des voies aériennes

Les voies aériennes humaines se décomposent en trois étages. Les voies aériennes supérieures sont constituées par les cavités nasales, les sinus, le pharynx et le larynx. Les voies aériennes proximales (ou de conduction) s'étendent de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales et enfin les voies aériennes distales (ou respiratoires) qui comprennent les bronchioles respiratoires et les alvéoles pulmonaires.

Tout au long de l'appareil respiratoire, la paroi des voies aériennes est composée : d'une muqueuse constituée d'un épithélium reposant sur une lame basale, d'un manchon de fibres musculaires lisses et d'une enveloppe de tissu conjonctif pouvant contenir du cartilage.

Les voies aériennes supérieures

Dans les voies aériennes supérieures, le nez a pour rôle de réchauffer et humidifier l'air inspiré. Les turbulences provoquées par les cornets présents dans les cavités nasales contribuent à éliminer les plus grosses particules (5 à 15 µM de diamètre) [1].

Les voies aériennes proximales

Les voies aériennes de conduction s'étendent de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales et ont pour rôle de transporter l'O_2 jusqu'aux alvéoles et d'évacuer le CO_2.

Les bronches sont constituées de fibrocartilage entouré de muscles lisses (Figure 1). L'intérieur des bronches est tapissé d'une muqueuse recouverte elle-même d'un épithélium composé, entre autres, de cellules ciliées permettant l'évacuation des particules inhalées qui sont piégées dans le mucus. Les bronches possèdent des glandes sous-muqueuses dans leur paroi. Puis l'arbre bronchique se ramifie suite à des divisions successives des bronches jusqu'aux bronchioles qui n'ont plus de cartilage.

Les voies aériennes distales

Enfin, les échanges gazeux s'effectuent en aval des bronchioles terminales à partir des bronchioles respiratoires dans lesquelles s'ouvrent les canaux alvéolaires puis les alvéoles. Les voies aériennes distales ne possèdent plus de cartilage ni de glande.

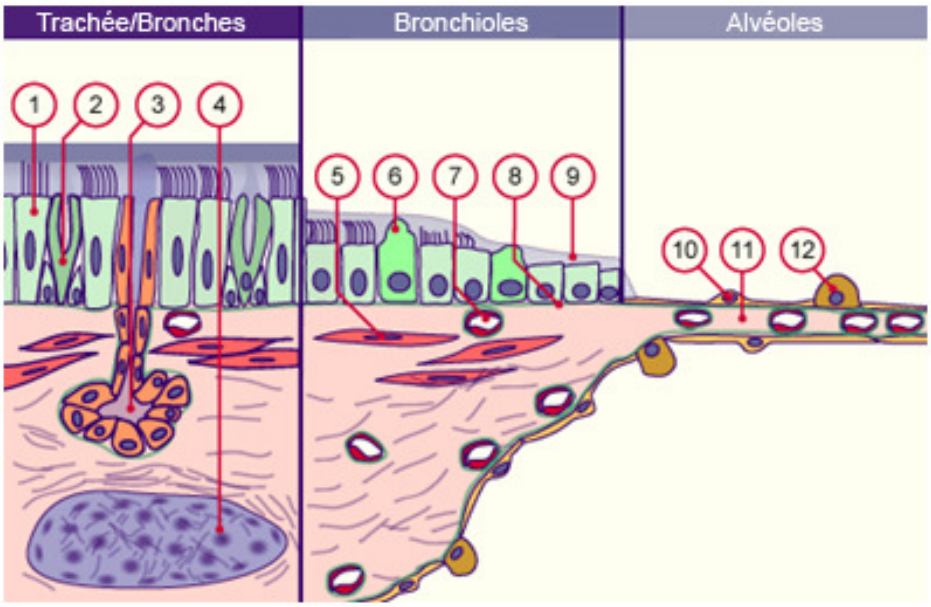

Figure 1 : Représentation schématique de la structure des parois des voies aériennes
1 Cellules ciliées. **2** Cellules caliciformes. **3** Glande. **4** Cartilage. **5** Muscle lisse. **6** Cellules de Clara **7** Capillaires sanguins. **8** Membrane basale. **9** Surfactant. **10** Pneumocytes de type I **11** Septa alvéolaires. **12** Pneumocytes de type II (D'après Fishman [2]).

Les voies aériennes humaines de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales sont tapissées d'un épithélium cilié, qui est lui-même recouvert d'un liquide de surface (ASL : « Airway Surface Liquid ») [3].

I.A.2. L'épithélium

Un épithélium est une structure polarisée, et constituée de cellules jointives reposant sur une lame basale riche en collagène, laminine et fibronectine. L'épithélium recouvre toutes les voies aériennes du nez jusqu'aux alvéoles. Il assure ainsi le rôle de barrière entre le compartiment aérien et le milieu intérieur.

Les cellules épithéliales sont polarisées. Il est distingué une région apicale vers la lumière et une région basale qui est accolée à la lame basale.

L'épithélium n'est pas vascularisé, et l'apport des nutriments se fait alors par l'intermédiaire de la lame basale (ou membrane basale) sur laquelle il repose. Outre son rôle protecteur empêchant l'entrée de pathogènes dans l'organisme, cette barrière n'est pas inerte. L'épithélium des voies aériennes est le siège d'échanges ioniques entre les deux compartiments, il est capable de maintenir des gradients de concentrations chimiques et de transférer sélectivement certaines molécules de part et d'autre. De plus, il est capable de

produire des peptides antibactériens et de stimuler la réponse inflammatoire par la production de cytokines.

L'épithélium trachéal et bronchique

L'épithélium des voies aériennes (trachée / bronches) est dit « pseudostratifié » car toutes les cellules qui sont en contact avec la lame basale n'atteignent pas la lumière (Figure 2).

Les trois types cellulaires les plus fréquemment rencontrés sont : les cellules basales, les cellules ciliées et les cellules à mucus [1,4]. Les cellules basales n'atteignent pas la surface de l'épithélium mais sont en large contact avec la lame basale. Les cellules ciliées ont une forme de cône allongé dont la pointe est en contact avec la lame basale alors que la partie évasée et ciliée donne sur la lumière des voies aériennes, puis s'intercalent des cellules à mucus qui présentent de nombreux granules de sécrétion. De plus, il existe d'autres types cellulaires proportionnellement moins nombreux : des cellules de Clara en surface, en profondeur des cellules des glandes sous-muqueuses, des cellules préciliées et des cellules sécrétantes et neurosécrétantes [4,5]. Les cellules des glandes sécrètent un mucus dans lequel les poussières et les bactéries sont piégées, puis évacuées par les cils au cours du phénomène de clairance mucociliaire [6].

Chez l'Homme, le nombre de glandes diminue régulièrement de la trachée jusqu'aux bronches. L'épithélium s'affine au fur et à mesure que les voies aériennes se divisent, et les cellules basales se raréfient [7].

L'épithélium des bronchioles

L'épithélium bronchiolaire (bronchioles non-respiratoires, terminales et respiratoires) n'est plus « pseudostratifié » mais se présente comme une couche de cellules cuboïdes. Les deux types cellulaires les plus fréquemment observés dans les bronchioles sont : les cellules ciliées et les cellules sécrétantes [4]. Le nombre de cellules sécrétantes diminue avec les divisions des bronchioles et les cellules de Clara augmentent. Au niveau des bronchioles, ces cellules seraient associées à la production d'un surfactant et pourraient faire partie des cellules régénératrices de l'épithélium des voies aériennes des mammifères [8].

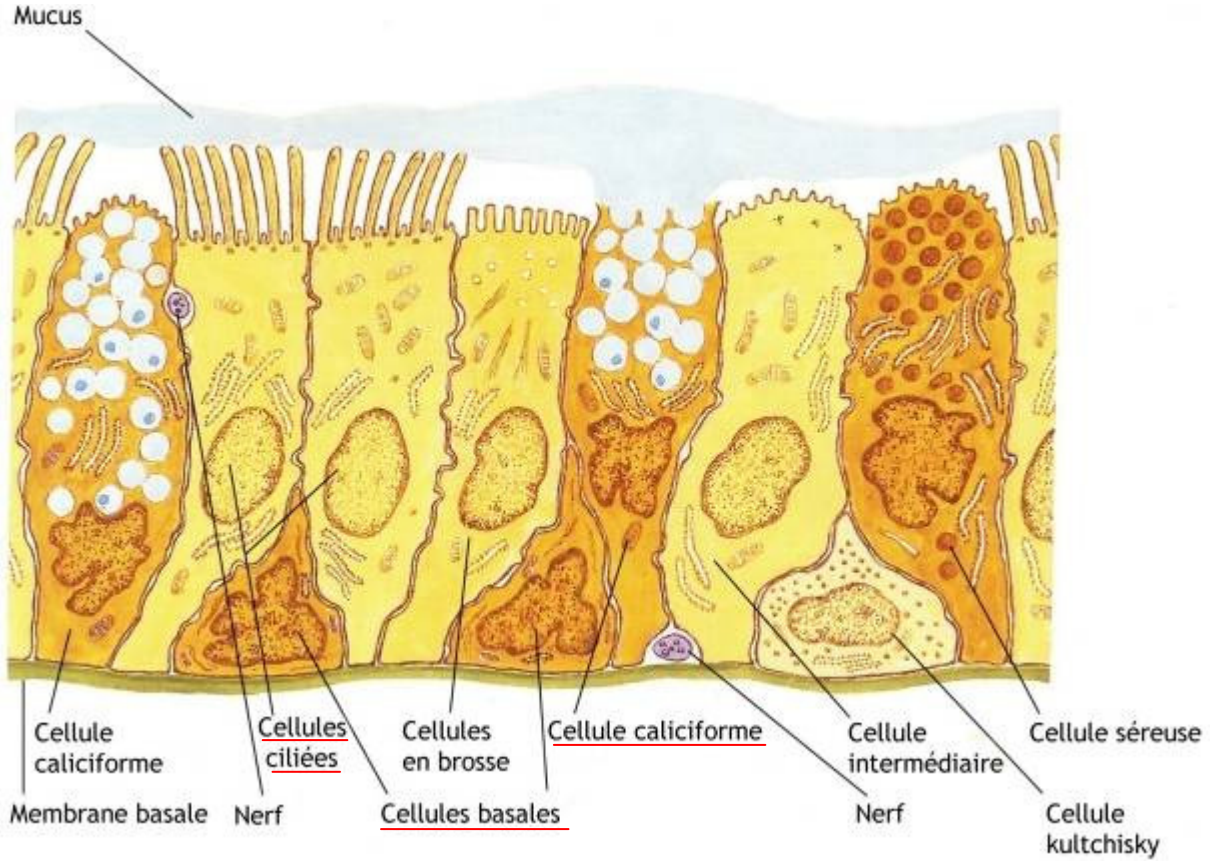

Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un épithélium bronchique

Les cellules ciliées et caliciformes prédominent au niveau bronchique. Les cellules séreuses, en brosse et intermédiaires sont plus parsemées (D'après Frank Netter, *Atlas de pneumologie*, Edition Masson).

L'épithélium alvéolaire

Avec une surface moyenne de 80 m², la fonction principale de l'épithélium alvéolaire est de permettre les échanges gazeux entre l'air et le sang. Dans cet épithélium, les cellules ciliées sont remplacées par des pneumocytes de type I et II.

Les pneumocytes de type I sont des cellules très minces (0,1 µM) qui occupent 95 % de la surface alvéolaire et qui sont responsables des échanges gazeux au niveau alvéolaire. Ils sont étroitement accolés aux capillaires dont ils ne sont séparés que par la membrane basale.

Les pneumocytes de type II sont des cellules cubiques qui sécrètent le surfactant pulmonaire. Ce surfactant fluidifie le mucus et facilite les échanges gazeux en réduisant la tension de surface du mucus pulmonaire dans les alvéoles. Ils peuvent aussi se diviser et avoir un rôle de cellule souche permettant le remplacement des pneumocytes de type I lorsque ceux-ci sont détruits. Tout comme les épithéliums bronchiques, ces cellules possèdent des canaux ioniques qui sont impliqués dans la régulation du transport liquidien alvéolaire à travers l'épithélium alvéolaire.

I.B. Les fonctions de l'épithélium des voies aériennes humaines

L'épithélium est le premier élément de l'appareil respiratoire en contact avec l'environnement extérieur. La principale fonction de l'épithélium des voies aériennes humaines est de constituer une barrière contre les pathogènes, les allergènes et les particules inhalées lors de la respiration. La structure polarisée de l'épithélium permet de réguler l'hydratation du mucus impliquée dans la clairance mucociliaire. L'épithélium est aussi capable d'induire une inflammation ou de produire des agents antibactériens.

Barrière mécanique

La présence de cellules épithéliales limite le passage des particules inhalées dans l'organisme. Ce rôle nécessite une grande cohésion entre les cellules elles-mêmes et aussi avec la lame basale. Cette cohésion est assurée par différents types de jonctions intercellulaires.

Les **jonctions serrées** sont localisées au niveau apical de la membrane plasmique, et entourent les cellules épithéliales [9]. Elles sont formées par un assemblage de différentes protéines transmembranaires, liées au cytosquelette d'actine de la cellule par des protéines adaptatrices. Outre la cohésion des cellules épithéliales, ces jonctions serrées sont fondamentales dans l'établissement de la polarité de l'épithélium, et donc dans sa fonction de barrière sélective. Elles permettent ainsi de développer une résistance électrique de l'épithélium grâce à un cloisonnement semi-étanche des espaces intercellulaires qui permet la diffusion de petites molécules chargées et hydrophiles telles que les ions. Ces jonctions constituent également une barrière physique de diffusion évitant ainsi la pénétration d'éléments comme des bactéries dans la muqueuse respiratoire [10].

En plus de ces jonctions serrées, il existe d'autres jonctions qui participent à la cohésion de l'épithélium.

Les **jonctions adhérentes** sont le second élément du complexe jonctionnel. Elles sont localisées au niveau latéral des cellules, immédiatement après les jonctions serrées. Les jonctions adhérentes sont constituées de protéines appartenant à la superfamille de glycoprotéines transmembranaires appelées les cadhérines [11].

Les **desmosomes** (*macula adherens*) lient les cellules ciliées aux cellules basales adhérentes [12].

Les **hémidesmosomes** permettent l'attachement de la cellule à la lame basale sous-jacente [13].

D'autres types de jonctions dans l'épithélium assurent la communication entre les cellules (jonctions communicantes ou ***Gap junctions***).

L'ensemble de ces complexes jonctionnels participe non seulement à la cohésion de la couche cellulaire épithéliale, mais permet aussi les échanges ioniques actifs entre les membranes apicale et basolatérale. Cette organisation permet un transport vectoriel d'eau et de solutés à travers l'épithélium, ce qui détermine la qualité de la clairance mucociliaire.

La clairance mucociliaire

L'épithélium est recouvert d'un mucus qui piège les particules inhalées, et qui les évacue en dehors des voies aériennes par le battement des cils. Ce phénomène est appelé « clairance mucociliaire ». Une grande partie des particules inhalées est éliminée grâce à ce phénomène, qui limite la quantité de particules pouvant léser l'épithélium et qui réduit la quantité de substances toxiques relarguées par les pathogènes dans le liquide de surface. De plus, le mucus évite la dessiccation des tissus.

L'épithélium bronchique joue un rôle central dans la clairance mucociliaire. De par son rôle dans les transports d'ions et d'eau, il contrôle la composition du mucus en électrolytes et son degré d'hydratation.

Le mucus est produit essentiellement par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses [14,15]. Il est composé de mucines, de glycoprotéines et d'ions en solution dans l'eau [16]. Il forme un film disposé en deux phases :

- La phase sol : liquidienne, fluide, profonde, dans laquelle battent les cils vibratiles ce qui permet le déplacement du mucus. L'origine de ce liquide est due aux mouvements ioniques transépithéliaux (sécrétion de chlore (Cl^-) et absorption de sodium (Na^+)) entraînant des mouvements d'eau.
- La phase gel est plus superficielle et dense, elle contient le mucus sécrété à partir des cellules caliciformes et des glandes de la sous-muqueuse. Le mucus permet de piéger les particules inhalées. Cette couche est discontinue dans les petites voies aériennes, et continue dans les grosses voies aériennes [17].

Le degré d'hydratation influence les propriétés d'écoulement des sécrétions et une modification de la viscosité réduit considérablement l'efficacité du battement. La diminution de la clairance mucociliaire altère ce système de défense, et favorise la persistance des infections. Or, il a été montré qu'en cas d'infection ou d'inflammation, les phénomènes sécrétoires locaux sont exacerbés, conduisant à une hyperviscosité du mucus et limitant les potentialités de défense du tractus respiratoire. De plus, la vitesse des battements ciliaires

est régulée par de nombreux facteurs comme par exemple l'augmentation du calcium extracellulaire ou les nucléotides triphosphates extracellulaires comme l'adénosine triphosphate et l'uridine triphosphate (ATP et UTP) qui augmentent les battements [18].

Les peptides antibactériens

L'épithélium possède d'autres défenses anti-infectieuses : ce sont des peptides antimicrobiens cationiques qui présentent un large spectre d'activité antibactérienne. Ils sont synthétisés par les cellules de l'épithélium, les glandes sous-muqueuses des bronches et les polynucléaires neutrophiles [19]. Ces peptides antimicrobiens présents en permanence dans l'ASL attaquent les bactéries et complètent l'action de la clairance mucociliaire [20]. En effet, le temps de doublement d'une bactérie est d'environ 20 à 30 min alors que le temps d'élimination d'un pathogène par la clairance mucociliaire est de plusieurs heures, cela suggère la présence de molécules antimicrobiennes dans le liquide de surface limitant la croissance bactérienne. Ainsi, il a été montré la présence de lysozyme, de lactoferrine, de SLPI (pour « secretory leukocyte protease inhibitor ») et aussi de peptides antimicrobiens non spécifiques, les « béta-défensines » [21].

Rôle dans l'inflammation

L'épithélium possède aussi à sa surface des récepteurs de la famille des « Toll-Like Receptors » (TLR) qui participent à l'élimination des pathogènes. Les récepteurs TLR2 et TLR4 ont été mis en évidence sur les cellules épithéliales trachéales humaines. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des composés de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif comme *P. aeruginosa* [22]. La fixation des composés bactériens sur les TLR entraîne la production de cytokines immunorégulatrices et proinflammatoires et participe à la production de substances antibactériennes par les cellules épithéliales [23].

Les cellules épithéliales possèdent également des récepteurs aux médiateurs de l'inflammation comme le Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) ou l'interleukine-1β (IL-1β), des cytokines proinflammatoires produites par les macrophages, les monocytes et l'endothélium [24]. L'épithélium est aussi producteur de ces mêmes cytokines ainsi que des eicosanoïdes et des espèces réactives de l'oxygène, qui participent à la réponse immune et inflammatoire [25]. Enfin, la présence de *P. aeruginosa* ou de *Staphylococcus aureus* est capable de stimuler une sécrétion de Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor (GM-CSF) et de Granulocyte Colony Stimulating factor (G-CSF) par l'épithélium qui ont la propriété d'augmenter la survie des polynucléaires neutrophiles [26].

L'épithélium possède donc plusieurs moyens pour protéger le système respiratoire et

l'organisme contre l'inhalation de pathogènes : l'élimination mécanique via la clairance mucociliaire, les interactions entre les cellules épithéliales, les substances antimicrobiennes secrétées dans le liquide de surface, et la capacité à stimuler et à entretenir les réactions immunes et inflammatoires.

I.C. Les transports épithéliaux

I.C.1. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires perméables à un ou plusieurs ions. Ces transports à travers les canaux sont dits « passifs », ils ne consomment pas d'énergie mais suivent le gradient électrochimique de l'ion donné, c'est-à-dire les concentrations ioniques de l'ion considéré de part et d'autre de la membrane. Cependant, il existe aussi des transports « actifs » initiés par des pompes et consommant de l'énergie (ATP), ces transports créent des gradients électrochimiques de part et d'autre de la membrane. Ces transports d'ions sont responsables de l'existence d'un potentiel membranaire et sont impliqués dans les phénomènes de sécrétion ou d'absorption d'eau et d'ions à travers la membrane épithéliale.

A l'état basal, l'épithélium des voies aériennes est dit « absorptif », conséquence d'une entrée de sodium par les canaux sodiques apicaux qui entraîne le passage paracellulaire de chlore et induit une absorption d'eau [27,28].

a) Le transport de sodium

Les canaux sodiques situés dans la membrane apicale laissent entrer le Na^+ selon son gradient électrochimique. Le canal sodique majoritaire est appelé ENaC (pour « Epithelial Na^+ Channel »). Le Na^+ sort de la cellule par la pompe Na^+/K^+ ATPase basolatérale, dont l'activité crée une force électrogénique permettant l'absorption continue de sodium. De plus, ce gradient électrochimique en faveur de l'absorption du sodium est modulé par l'action d'autres transporteurs comme les canaux potassium (K^+) basolatéraux et les canaux Cl^- apicaux.

Le canal ENaC

D'abord décrit dans le rein et les voies urinaires, le canal ENaC a ensuite été identifié dans de nombreux épithéliums et chez de nombreuses espèces.

Au niveau de l'épithélium respiratoire, ENaC est impliqué dans la régulation de l'hydratation du liquide de surface car il laisse entrer le sodium dans la cellule épithéliale. Ce

canal se présente sous la forme d'hétéromères de sous-unités (α,β,γ) selon la stœchiométrie 1α :2β :1γ, et il est hautement sélectif pour le Na^+ [29](Figure 3). L'activité du canal ENaC ne dépend pas du voltage, mais il existe une auto-inhibition induite par le sodium lui-même [30]. Le canal ENaC est inhibé sélectivement par l'amiloride et ses analogues [31], et son activation serait médiée par la protéine kinase A (PKA) [32] alors que l'activation protéine kinase C (PKC) diminue la probabilité d'ouverture du canal [33].

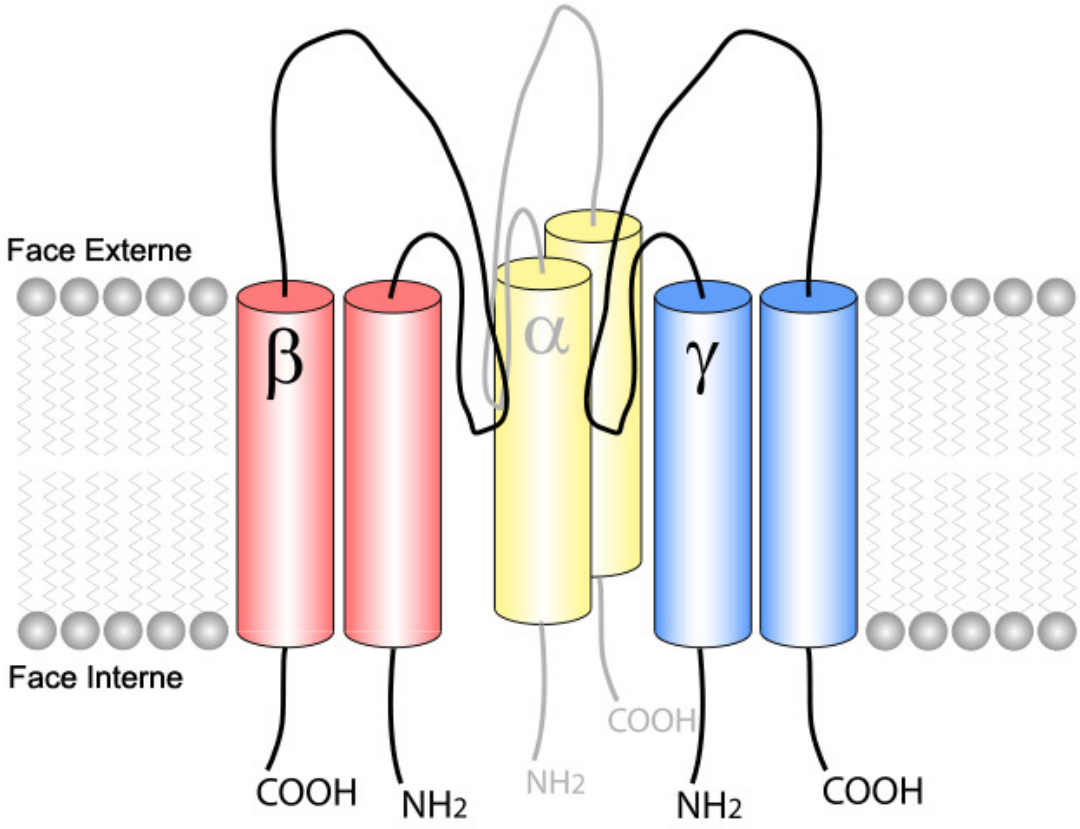

Figure 3 : Représentation schématique de la structure du canal ENaC.
(D'après wikipedia.com, creative commons licence)

Il existe aussi des interactions entre les ENaCs et le canal chlore CFTR qui est également exprimé du côté apical des cellules épithéliales. En effet, l'activation de CFTR limite l'absorption de Na^+ par les ENaC [34]. En revanche, dans le cas de la mucoviscidose, une mutation de la protéine CFTR provoque une augmentation de l'activité des canaux ENaC [35].

Enfin, ENaC peut être régulé par un clivage induit par des sérines protéases [36]. Ces protéases appelées « Channel-Activating Protein » (CAP) ont été retrouvées dans le liquide de surface et activeraient ENaC [37]. De plus, les sous-unités β et γ possèdent des sites de phosphorylation à l'extrémité C-terminale qui sont essentiels dans l'activation d'ENaC par des serine/thréonine protéines kinase comme CK2 [38].

b) Le transport de chlore

Au niveau de l'épithélium, il existe plusieurs types de canaux chlorures du côté apical : le canal CFTR (pour « Cystic Fibrosis conductance Transmembrane Regulator »), activé par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), impliqué dans la mucoviscidose et les canaux activés par le calcium (CaCC). Du côté basolatéral, des canaux chlorures seraient aussi exprimés mais leur structure et leurs rôles sont encore discutés.

Ces canaux chlorures sont impliqués dans le contrôle du volume cellulaire, la régulation du potentiel de membrane, les transports ioniques transépithéliaux, et dans le contrôle du pH des organelles.

Le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

La protéine CFTR est le canal Cl^- majoritairement exprimé dans les tissus épithéliaux comme le colon et le poumon [39], mais elle peut être retrouvée également dans d'autres types cellulaires [40].

Le canal CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Le CFTR est le seul transporteur ABC sélectif pour les ions Cl^- et dont l'activité est régulée par l'AMPc. Le CFTR est composé de deux domaines à 6 segments transmembranaires, deux domaines de liaison aux nucléotides (NBDs : *Nucleotide-binding domains*), et un domaine de régulation situé dans la troisième boucle intracytoplasmique (R domain) qui présente plusieurs sites de phosphorylation (PKA et PKC) (Figure4) [41].

Le CFTR est sélectif pour les anions : le Cl^- est 10 à 20 fois plus perméant que le Na^+ [42]. La perméabilité de CFTR à l'iodure (ion I^-) est moins importante que celle du Cl^-, ce qui le différencie des autres canaux Cl^- épithéliaux [43].

L'activation du canal dépend de phosphorylations du domaine R et de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP sur les domaines d'interactions avec les nucléotides. L'hydrolyse de l'ATP représente l'étape limitant à la fois l'ouverture et la fermeture du canal. Le domaine NBD1 est le site d'hydrolyse de l'ATP couplé à l'ouverture du canal et le domaine NBD2 est le site d'hydrolyse de l'ATP permettant la fermeture du canal [44]. La stimulation de récepteurs membranaires couplés à l'adenylate cyclase, aboutissant à l'activation de la PKA, comme par exemple les récepteurs β2-adrénergique, les récepteurs à l'adénosine ou à la vasopressine [45-47] peut également augmenter l'activité de CFTR.

Au niveau pharmacologique, le CFTR est activé par les xanthines, les inhibiteurs de phosphatases, les isoflavones et les flavones, les benzoxazoles, les benzimidazolones et les

psoralènes ains que par les agonistes de l'adenylate cyclase tels que la forskoline et le 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX) [48].

Le canal CFTR est inhibé de manière non-spécifique par le glybenclamide, et la tolbutamine [49], ou par le Diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC) et l'acide flufénamique [50] ; et plus récemment, de manière plus spécifique par un inhibiteur de la famille des thiazolidinone : le CFTR(inh)-172 [51].

En plus de son rôle dans le transport de Cl^-, la protéine CFTR est également impliquée dans la régulation d'autres canaux comme les ENaCs déjà cités auparavant [52]. Le CFTR agit sur l'activité des ENaCs par une interaction protéine-protéine entre les deux canaux, mais aussi via la sécrétion d'ATP liée à l'activation de CFTR et un rôle direct de l'AMPc [53,54]. Le CFTR contrôle aussi l'activité d'autres canaux Cl^- [55], et des canaux K^+ [56]. Les mécanismes par lesquels la protéine CFTR régule d'autres transporteurs ioniques sont multiples, et impliquent dans certains cas le Ca^{2+} intracellulaire [57].

Les mutations du gène codant pour la protéine CFTR sont à l'origine des différentes formes de la mucoviscidose (ou CF pour « C*ystic Fibrosis* » en anglais) ; la mutation ΔF508 est la plus fréquente et représente une forme sévère de la maladie [58]. L'absence de CFTR fonctionnel dans la membrane plasmique conduit à une hyperabsorption de Na^+ due à la levée du contrôle de CFTR sur l'activité des canaux ENaC [52].

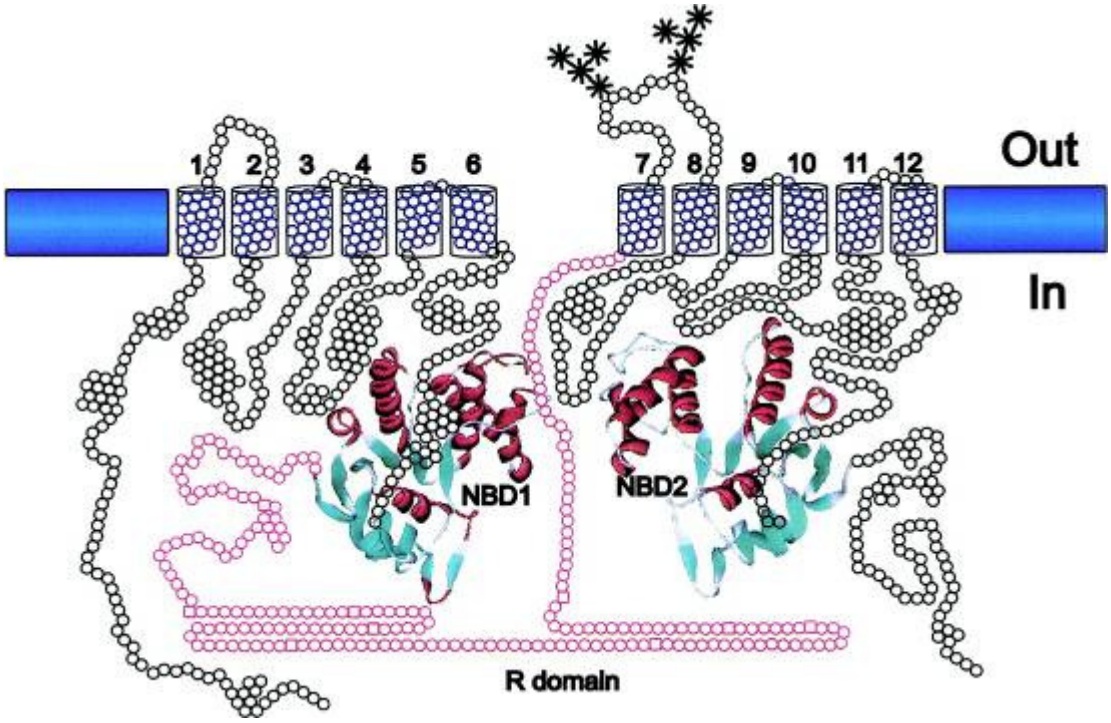

Figure 4 : Schéma de la protéine CFTR.

NBD : Nucleotide-Binding domain ; **R domain :** Domaine de Régulation ; **Out :** extracellulaire ; **In :** Intracellulaire (D'après Hanrahan [41]).

Les canaux Cl⁻ activés par le Ca^{2+} intracellulaire

La présence des canaux chlorures directement activés par le calcium a été rapportée dans les cellules épithéliales trachéales [59], dans l'épithélium nasal [60], dans l'épithélium rénal [61], mais aussi dans les cellules neuronales ou cardiaques ou encore dans les hépatocytes [62,63]. Ces canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} jouent un rôle dans les fonctions de sécrétions d'électrolytes et d'eau par les cellules épithéliales. Il a été montré que le contrôle de l'hydratation du mucus était régulé par des interactions entre le CFTR et les CaCC. Le canal CFTR contrôlerait le niveau basal de la phase gel du mucus alors que les CaCC seraient des régulateurs de la phase liquide [64]. La contribution des CaCC dans la régulation de la phase liquide du mucus pourrait notamment expliquer le manque de conséquences pulmonaires dans les modèles murins de mucoviscidose [65]. C'est pourquoi, l'activation de ces canaux a été proposée comme une thérapie alternative dans la mucoviscidose [66].

Ces canaux CaCC sont relativement moins sélectifs que d'autres canaux ioniques [67]. Ils sont perméables à d'autres anions que le Cl^- mais également aux cations. Néanmoins, leur perméabilité au Na^+ est 10 fois plus faible que celle au Cl^- [68].

Il n'existe pas de bloqueurs très spécifiques de ces canaux, seuls l'acide niflumique (NFA) et l'acide flufénamique seraient efficaces [69]. Les autres bloqueurs des canaux chlores comme le 4,4'-di-isothiocyananatostilbène-2,2'-disulfonic acid (DIDS), le 4-Acetamido-4′-isothiocyanato-2,2′-stilbenedisulfonic acid (SITS), le 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) et le DPC sont moins efficaces [70]. Cependant, du fait du manque de spécificité des inhibiteurs et de la grande diversité de cette famille, l'identité moléculaire des CaCC n'est pas totalement élucidée. Actuellement, quatre gènes sont susceptibles de coder pour des CaCC :

- Le gène codant pour ClC 3 exprimerait un canal activé par la calmoduline kinase II. Mais son rôle est encore discuté car l'utilisation de souris ClCn3-/- montre une absence de conductance « calcium/calmodulin-dependent protein kinase II » (CaMKII) activée mais la conductance chlore activée par le calcium est toujours présente [71].
- La famille des bestrophines serait une nouvelle famille de canaux chlores stimulés par le calcium [72] et exprimées au niveau des cellules épithéliales de la rétine [73].
- Les gènes homologues du locus *Tweety* de la drosophile : *hTTHY2* et *hTTYH3*. Cependant cette identité est encore controversée par la localisation de l'expression du produit des gènes, ou l'absence de régulation par le Ca^{2+} [74].

- Enfin les gènes codants pour les ClCa sont les candidats les plus probables pour les CaCC [75].

Les ClCa ont été initialement clonés à partir de trachées bovines [76], et ils sont exprimés au niveau des épithéliums respiratoires [67,77]. Depuis, plusieurs isoformes des ClCa ont été isolées [78]. Toutes les isoformes sont activées par l'ionomycine ou par une concentration de Ca^{2+} cytosolique de l'ordre du millimolaire. L'activité des canaux ClCa est bloquée par les inhibiteurs des canaux Cl^- comme l'acide niflumique et le DIDS [76,79].

Cependant la nature des protéines ClCa ne se résumerait pas à l'activité d'un simple canal, et certaines de ces propriétés ne correspondent pas aux propriétés des CaCC.

- Tout d'abord il y a des différences entre les courants observés avec les ClCa et les CaCC au niveau de la sensibilité au calcium à la dépolarisation et dans la pharmacologie de ces canaux.
- La région de cette protéine responsable de la formation du canal n'est pas encore identifiée [80].
- Les ClCa ont une grande homologie avec des protéines d'adhésion cellulaire et un autre problème réside dans le fait que la protéine humaine ClCa3 tronquée et ne possédant pas de domaines transmembranaires, est sécrétée dans le milieu extracellulaire [81].
- Enfin, certains types cellulaires qui expriment des CaCC natifs n'expriment pas de protéines ClCa [82].

Les canaux ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel)

L'ORCC est un canal chlorure régulé par l'AMPc qui a d'abord été décrit comme la protéine impliquée dans la régulation de la conductance membranaire, déficiente dans la mucoviscidose [83,84]. Les études d'interactions entre CFTR et d'autres canaux ioniques membranaires montrent que la présence du canal CFTR fonctionnel est indispensable à l'activation du canal ORCC par les PKA [85]. Dans les systèmes de membranes artificielles, CFTR régule le canal ORCC par des interactions membranaires ou cytoplasmiques [57]. Schwiebert et al. proposent également que l'interaction entre le canal CFTR et le canal ORCC dans les cellules épithéliales, soit liée à un mécanisme autocrine/paracrine impliquant l'ATP [86].

Cependant Xia et al. ont montré en patch clamp, sur des cellules Calu-3, que les canaux ORCC sont rarement retrouvés du côté apical des cellules dans les épithéliums à confluence, mais sont abondants dans les cellules non polarisées et peu confluentes [87].

Plus récemment, Szkotak AJ et al. ont confirmé la présence d'ORCC sur la membrane basolatérale de cellules épithéliales respiratoires humaines [88]. Ces canaux ont des rôles encore méconnus, mais ils pourraient agir sur le contrôle du type d'anion secrété : l'ouverture du canal favoriserait la sécrétion de bicarbonate (HCO_3^-) alors que sa fermeture favoriserait la sécrétion de chlore [87]. D'autres études suggèrent que ces canaux pourraient permettre l'absorption de chlore à travers la cellule au lieu de l'absorption paracellulaire couramment décrite [89,90].

Enfin dernièrement, il a été mis en évidence non pas une, mais trois conductances Cl^- différentes au niveau basolatéral. La conductance majoritaire est activée par le voltage, le gonflement cellulaire et est bloquée par le DIDS. Une autre conductance identifiée est activée par l'hyperpolarisation et serait un courant rectifiant entrant ressemblant au courant induit par CLC-2. Enfin, une conductance qui est activée par l'AMPc, insensible au voltage et qui est linéaire, ressemblant au CFTR [90].

c) Le transport de potassium

De nombreux types de canaux potassiques ont été identifiés au niveau des cellules épithéliales. Ils sont situés principalement au niveau de la membrane basolatérale mais ils sont aussi retrouvés sur la face apicale des cellules. Cette famille de canaux est particulièrement vaste et, au niveau des épithéliums respiratoires, leur fonction et leur rôle précis sont encore peu connus. Certains de ces canaux sont impliqués dans la régulation non spécifique du volume cellulaire [91]. D'autres participent au maintien et à la stabilisation du potentiel de membrane nécessaire à la sécrétion transépithéliale de Cl^-, et à la réabsorption de Na^+ [92,93].

Différentes classes des canaux K^+ sont présents dans l'épithélium des voies aériennes :

- les canaux K^+ dépendants du voltage dont certains membres de la famille des Kv, et les KCNQ1 qui sont fortement exprimé dans l'épithélium nasal [94].
- les canaux activés par le Ca^{2+} intracellulaire (KCa), les IKCa (ou sous type SK4) sont exprimés dans la trachée et dans les cellules bronchiques [95,96] et les BK_{Ca} (ou sous type Slo1) ont été retrouvés dans les cellules nasales, bronchiques (16HBE14o-) et alvéolaires (A549) [97,98]. Ces canaux seraient à la fois sensibles au Ca^{2+} et au potentiel [99].
- les canaux K_{ATP} sensibles à l'ATP (constitués en octamères de sous unités K_{ir} et SUR) ont été mis en évidence au niveau de l'épithélium de trachée de rat [100], et les transcrits de K_{ir} 4.2 ont été révélés dans un modèle de cellules épithéliales respiratoires humaines de la lignée Calu-3 [101].

Ces canaux ont été montrés comme nécessaires dans les processus d'absorption de Na^+ et de sécrétion de Cl^- dans l'épithélium alvéolaire [102,103], mais aussi dans l'épithélium bronchique et nasal [104,105].

d) Les autres transporteurs épithéliaux

La pompe Na^+/K^+ ATPase

La pompe Na^+/K^+ ATPase est essentielle au fonctionnement de toutes les cellules, elle consomme environ 20 à 30% de l'ATP produit pour expulser du côté basolatéral trois ions sodium et réabsorber deux ions potassium. Le courant généré par cette pompe participe à la repolarisation de la membrane. Son rôle principal est de maintenir l'homéostasie sodique et potassique intracellulaire, et elle est nécessaire à l'absorption transépithéliale de sodium. L'activité de la pompe est inhibée par des glycosides cardiotoniques comme l'ouabaïne ou la digitaline.

La pompe est un complexe protéique de type P formé au minimum d'un hétérodimère de sous-unités α et β auxquelles vient s'ajouter une protéine de la famille FXYD, régulateur du transport d'ion [106].

Il a été montré une surexpression de cette pompe et du cofacteur FXYD chez les patients atteints de mucoviscidose, ce qui participerait au phénomène d'hyperabsorption de sodium impliqué dans la déshydratation du mucus observée chez ces malades [107].

Le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$

Situé sur la membrane basolatérale, ce cotransporteur permet de faire entrer des ions chlorures dans la cellule malgré un gradient électrochimique défavorable, afin qu'ils soient excrétés au pôle apical [108]. Le cotransport est électroneutre car il transfère à l'intérieur de la cellule un ion sodium et un ion potassium pour deux ions chlorures [109]. Il existe deux isoformes NKCC1 et NKCC2, mais seule NKCC1 est présente dans l'épithélium respiratoire. Le cotransporteur est inhibé spécifiquement par une classe de diurétiques tels que le bumétanide ou le furosémide [110].

NKCC1 est impliqué dans la régulation du volume cellulaire [111], et serait activé indirectement par les seconds messagers tels que l'AMPc et le calcium intracellulaire, ou en réponse à une stimulation par l'UTP apical ou par l'isoprotérénol sur les cellules épithéliales des voies aériennes. Dans les cellules épithéliales des voies aériennes, l'activation de la PKA stimule le cotransporteur [112].

L'échangeur Na^+/H^+

Les cellules épithéliales sont capables de maintenir un pH stable malgré les perturbations induites par les échanges ioniques ou par la production d'acides par son propre métabolisme. L'échangeur Na^+/H^+ (ou NHE) a été mis en évidence dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires [113]. Ce transport est électroneutre (1 H^+ expulsé pour l'entrée d'un Na^+), et il est activé par une production cellulaire de protons [114].

Il existe 9 isoformes de NHE clonées (NHE1-9) à ce jour [115]. L'isoforme NHE-1 est ubiquitaire et elle est exprimée dans le poumon [116]. NHE1 semble être associée à de nombreuses fonctions cellulaires comme la régulation du pH intracellulaire, du volume cellulaire et de la prolifération [117]. Les autres isoformes sont spécifiques d'un type de tissu, et la présence des isoformes NH2 et NH3 a été mise en évidence dans les cellules épithéliales nasales humaines [118].

L'activité de NHE est régulée par différents facteurs comme des hormones, des facteurs de croissance, et le phorbol 12-myristate 13-acétate qui vont conduire à sa phosphorylation [119]. De plus, il existe un site de régulation par le pH du côté intracellulaire de la protéine [120]. Son activité est aussi contrôlée par le Ca^{2+} intracellulaire, en particulier par la liaison du complexe Ca^{2+}-calmoduline qui active le NHE [121]. Enfin, l'activité de NHE est inhibée par l'absence de Na^+ extracellulaire, par l'amiloride et ses dérivés [122]. NHE1 est cependant le plus sensible aux dérivés de l'amiloride [123].

I.C.2. Modèle des transports transépithéliaux

Les différents canaux décrits précédemment sont illustrés dans la Figure 5.

Les premières données sur la différence de potentiel transépithélial (ddp), la résistance transépithéliale (R) et le courant généré par les mouvements des ions à travers l'épithélium (scc pour « short-circuit current » en anglais) ont été possible avec l'avènement des techniques d'électrophysiologies comme la mesure directe de la ddp nasale, trachéale ou bronchique, les mesures de ddp et de scc de tissus excisés ou de culture cellulaire dans les chambres de Ussing et la mesure d'activité de canaux grâce au patch clamp. Ces techniques de mesures *in vivo* et *in vitro* ont révélé, qu'à l'état basal, l'absorption active de sodium représente un transport important des voies aériennes humaines. Cette absorption de Na^+ représente environ les deux-tiers du courant enregistré, et entraîne une absorption passive de Cl^- et d'eau [28,124].

Le sodium pénètre dans la cellule épithéliale bronchique humaine par le canal ENaC du pôle apical, il est évacué de la cellule au niveau du pôle basolatéral par la pompe Na^+/K^+

ATPase, engendrant un flux net transépithélial de Na^+ du compartiment muqueux vers le compartiment séreux [125].

D'autre part, l'activité de pompe Na^+/K^+ ATPase provoque une accumulation de K^+ dans le cytosol, entretenant une différence de potentiel, et créant un gradient électrochimique favorable au transport de K^+ vers l'extérieur de la cellule. Les canaux potassiques, dépendants du voltage et/ou du calcium, contribuent à maintenir la concentration de K^+ et le potentiel de membrane [94].

L'ion Cl^- est entraîné selon son gradient électrochimique essentiellement par des voies paracellulaires pour préserver l'électroneutralité ce qui induit une absorption d'eau [126]. Cependant, dans certains cas, la sécrétion de Cl^- peut s'effectuer selon un gradient électrochimique entretenu par différents transporteurs de Cl^- de la membrane basolatérale, comme le cotransporteur $Na^+/K^+/Cl^-$ et par la présence de nombreux canaux Cl^- de la membrane apicale comme le CFTR ou les CaCC. De plus, l'activité des canaux rectifiés entrants K_{ATP} et du canal KCNQ1 sont impliqués dans la sécrétion de Cl^- [94,105].

L'équilibre entre l'absorption de sodium et la sécrétion de chlore permet de contrôler les mouvements d'eau à travers l'épithélium, et contribue à une bonne hydratation des voies aériennes ainsi qu'à une clairance mucociliaire de qualité [35].

Enfin, il a été montré que le CFTR peut interagir et contrôler d'autres canaux de la membrane apicale, et que son absence modifie totalement l'équilibre des transports d'ions et de fluides [127]. Le CFTR contrôle l'activité de ENaC avec lequel il est co-exprimé [125], et stimule l'activité d'autres canaux chlorures via la libération de l'ATP associé à l'activité de CFTR [128]. Certains canaux potassiques sont également modulés par le CFTR [129].

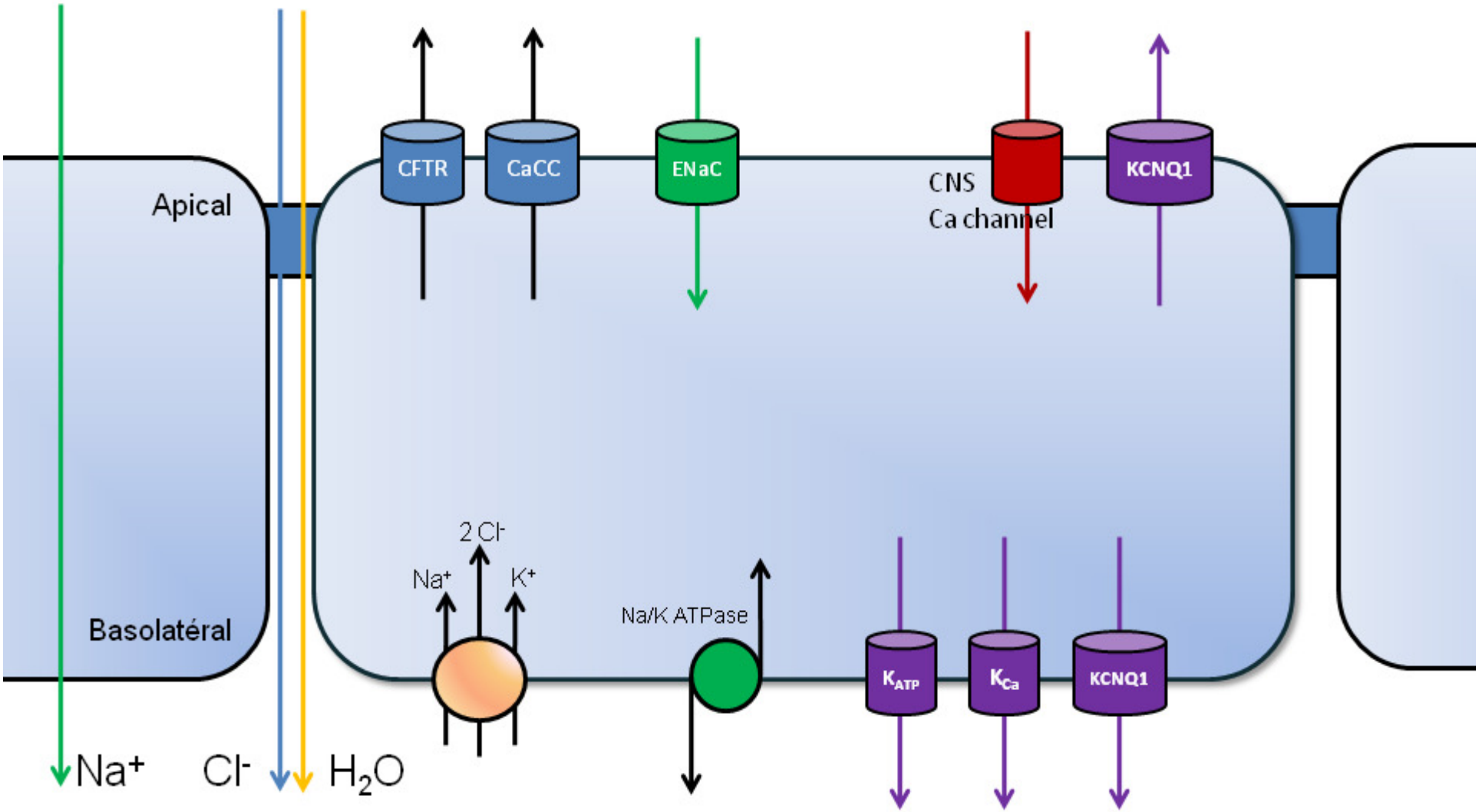

Figure 5 : Les transports ioniques dans l'épithélium bronchique humain

(Adapté de Boucher RC [28,124])

I.D. Les seconds messagers intracellulaires

I.D.1. L'AMPc

L'AMPc est un second messager intracellulaire produit à partir d'ATP, par l'intermédiaire de l'adenylate cyclase. L'adenylate cyclase est elle-même activée par la liaison d'un ligand sur un récepteur transmembranaire à protéines G (RCPG). L'AMPc active à son tour des enzymes comme la PKA, qui phosphoryle des protéines de régulation ou des effecteurs.

Mis à part les effets sur la transcription de certains gènes par l'activation de cette voie, il a été montré un rôle direct de la voie AMPc dans la régulation de certains canaux épithéliaux. Dans l'épithélium respiratoire normal, les canaux ENaC sont inactivés par des agonistes qui augmentent l'AMPc comme la forskoline ou l'isoprotérénol [130,131]. Ces agonistes activent aussi le canal CFTR et induisent une sécrétion de Cl^-. En revanche, d'autres travaux ont montré que l'AMPc pouvait augmenter la probabilité d'ouverture de ces canaux dans les cellules épithéliales pulmonaires, ainsi que l'expression de sous-unités α du canal [132].

Le transport de chlorure transépithélial peut être modulé par des variations du taux d'AMPc intracellulaire [133]. La conductance chlore, activée par l'augmentation du taux d'AMPc étant déficiente dans les épithéliums mucoviscidosiques, l'activation du canal CFTR est généralement associée à cette conductance [134] car il est activé par phosphorylation de son domaine R par la PKA [135].

Dans les cellules épithéliales des voies aériennes, l'activation de la PKA stimule le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$ [111], et certaines conductances au potassium comme le canal KCNQ1 sont activées par l'AMPc [136].

I.D.2. Le calcium et sa régulation

Le calcium est un messager intracellulaire ubiquitaire contrôlant de nombreux processus tels que la dépolarisation, la contraction des muscles lisses ou striés, la sécrétion hormonale, l'activation d'enzymes comme la phospholipase A2 ou diverses protéases, les transports intracellulaires, et l'activation de transports ioniques.

La concentration extracellulaire (1 à 2 mM) de calcium, élevée comparativement à sa concentration intracellulaire (100 nM), est régulée de telle manière qu'elle ne subit que de très faibles variations.

La concentration de calcium intracytoplasmique reste faible, car la cellule possède des moyens de l'expulser à l'extérieur et peut le piéger dans certains organites intracellulaires

comme le réticulum ou les mitochondries. De plus, à l'intérieur du cytoplasme, il existe des protéines susceptibles de le fixer d'une manière passive : la calséquestrine, la calréticuline, la calbindine, la calrétinine et la parvalbumine. La concentration intracytoplasmique de calcium libre ou ionisé (Ca^{2+}) est donc faible, et le gradient électrochimique est en faveur d'une entrée dans le cytosol. Ainsi, la signalisation cellulaire du calcium est liée à une augmentation de sa concentration cytosolique qui peut être caractérisée par son origine, son amplitude, sa durée et sa fréquence.

a) Origines du calcium

Lors d'un signal calcique, l'augmentation de calcium dans la cellule peut avoir deux origines distinctes :

- Le calcium peut provenir du milieu extérieur. Le calcium extracellulaire pénètre alors dans la cellule via des canaux cationiques non spécifiques ou des canaux calciques membranaires.
- Le calcium peut venir du vidage des réserves intracellulaires (le réticulum) par la stimulation du récepteur à l'inositol-1,4,5-phosphate (IP3). Il existe également un autre récepteur, le récepteur à la ryanodine, qui provoque une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules excitables. Ce récepteur ne semble pas présent au niveau de l'épithélium respiratoire [137].

L'entrée de calcium extracellulaire

Il existe de nombreux types de canaux membranaires perméant pour le calcium. Bien qu'ils soient couramment décrits au niveau des cellules excitables comme les neurones ou les cellules musculaires, les canaux calciques exprimés au niveau des cellules épithéliales sont encore peu connus. Ces canaux sont répartis en plusieurs groupes sur la base de leurs mécanismes d'activation.

Les **VOC** (voltage-operated channel) sont des canaux voltage-dépendants qui s'ouvrent lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique. Ces canaux sont principalement retrouvés dans les cellules excitables comme les neurones ou les cellules musculaires. Les VOC ont été classés à l'origine selon leurs propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques avec un type à bas potentiel, le canal T qui possède une ouverture transitoire, et cinq types de canaux s'ouvrant à un potentiel plus élevé, les canaux L, N, P, Q et R. Une étude récente a révélé la présence de canaux de type L ($Ca_v1.3$) en faible quantité sur la membrane apicale d'épithélium pulmonaire de rat ainsi que des canaux de type R ($Ca_v2.3$) dans des cellules de Clara [138].

Un deuxième type est activé par la liaison à différents agonistes (ATP, sérotonine, acétylcholine…) et ces canaux sont appelés **ROC** (pour « Receptor-Operated Channel »). Ils sont présents dans les neurones et les cellules sécrétrices.

Il existe aussi des canaux activés par la déformation de la cellule. Ces canaux ont été observés dans les cellules épithéliales de trachée, où la déformation d'une cellule provoque une augmentation de calcium qui est transmise aux cellules voisines, provoquant la synchronisation des battements ciliaires sensibles au calcium. Un tel mécanisme pourrait être impliqué dans la clairance mucociliaire des voies respiratoires [139].

Enfin, les canaux **SOC** (pour « Store-Operated Channel ») sont activés en réponse à une déplétion calcique des stocks intracellulaires. Ce couplage entre le vidage du réticulum et l'activation des canaux membranaires se ferait, soit par interaction directe, soit par un facteur diffusible [140].

Dans l'épithélium respiratoire, la présence ainsi que le rôle des canaux SOC ne sont pas encore élucidés, mais la présence de canaux de la famille **TRP** (pour « *Transient receptor Potential* ») a été montrée. Les canaux TRP appartiennent à une vaste famille de 33 canaux cationiques non spécifiques, répartis en 7 sous-familles et laissant entrer principalement du calcium ou du magnésium (Figure 6). Ces canaux TRP sont activés et régulés par une grande variété de stimuli, et pourraient appartenir aux ROC et aux SOC. Au niveau épithélial, plusieurs sous-familles ont été décrites : les **TRPC** (canonical) ont été retrouvés dans une lignée d'épithélium des voies aériennes CF et non CF (TRPC1 et TRPC6), ainsi que dans la lignée A549 avec TRPC 1, 3, 6 et 7 [141] ; TRPC3 a été retrouvé dans la lignée BEAS 2B et TRPC4 dans l'épithélium bronchial humain [142]. La lignée A549 exprimerait aussi des TRPM7 [141]. Enfin, les cellules épithéliales exprimeraient aussi des canaux de la famille des **TRPV**, dont TRPV4 qui a été récemment décrit dans une lignée d'épithélium bronchique humain [143], et TRPV 3, 4, 5 et 6 qui ont été identifiés dans l'épiderme [144], dans l'endothélium pulmonaire [145], et au niveau de l'épithélium rénal [146] et intestinal [147].

Cependant, ces canaux TRP sont des canaux cationiques non spécifiques, et seuls les TRPV5 (ou ECaC) et TRPV6 (ou CaT1) seraient hautement sélectifs pour le calcium avec un ratio de perméabilité Ca^{2+}/Na^{+} supérieur à 100 [148]. Ces canaux ont été décrits dans les épithéliums transportant du calcium et jouent un rôle dans l'absorption au niveau du rein et de l'intestin [149]. Bien que leur présence soit fortement soupçonnée, ces canaux n'ont, à ce jour, toujours pas été décrits dans l'épithélium respiratoire.

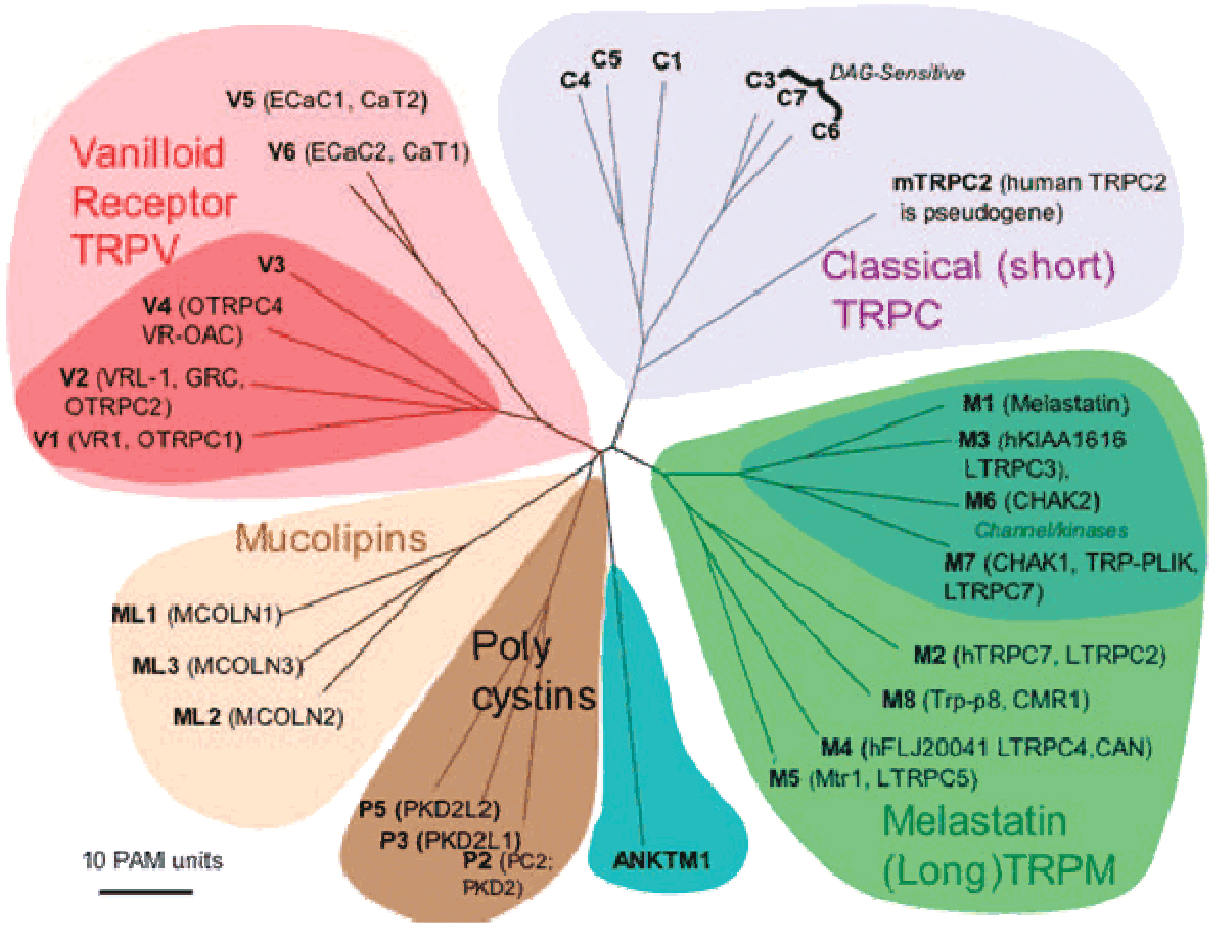

Figure 6 : Les canaux cationiques non spécifiques de la famille TRP
(Hoenderop [150])

Enfin, Bahra et al. ont mis en évidence un courant calcique basolatéral activé par l'ATP sur des cellules épithéliales des voies aériennes humaines. Ce courant calcique ne correspond pas aux caractéristiques des TRP, et la structure est encore inconnue [151].

La mobilisation des réserves intracellulaires

Le relargage du calcium des stocks intracellulaires est stimulé par un second messager intracellulaire, l'IP3. L'IP3 est produit par l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire, le phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP2), par l'action des phospholipases C (PLC). Les PLC sont activées par deux types de récepteurs membranaires : les RCPG et les récepteurs à tyrosine kinase (TYRK).

L'IP3 peut diffuser dans le cytoplasme et se fixer à des récepteurs spécifiques (IP3R) situés sur la membrane du réticulum endoplasmique. La fixation de l'IP3 à son récepteur provoque l'ouverture du pore, et la libération du calcium contenu dans les réserves. D'autre part, l'activité de ce récepteur est sensible au calcium. L'augmentation de la concentration du calcium cytosolique empêche la liaison de l'IP3 au récepteur ce qui limite l'ouverture du pore.

Ce phénomène serait à l'origine du mécanisme d'oscillations du calcium décrit dans de nombreuses cellules.

b) Régulation

Le calcium est indispensable au fonctionnement de la cellule et à sa réplication mais une augmentation trop importante et trop longue peut conduire à des phénomènes d'apoptose. C'est pourquoi le calcium est finement régulé.

Il existe plusieurs mécanismes pour diminuer la concentration du Ca^{2+} cytosolique :

- les pompes à Ca^{2+} membranaires qui transportent le Ca^{2+} intracellulaire à l'extérieur de la cellule,
- les pompes à Ca^{2+} de type SERCA sur la membrane du réticulum endoplasmique,
- les « *calcium binding protein* » comme la calmoduline qui peuvent lier le calcium libre,
- les échangeurs Na^{+}/Ca^{2+} de la membrane plasmique.

Les pompes de la membrane

Les pompes à calcium (Ca^{2+}-ATPase) de la membrane plasmique (ou PMCA pour plasma membrane calcium ATPase ») assurent le pompage des ions Ca^{2+} du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Elles nécessitent de l'énergie pour transporter le Ca^{2+} contre son gradient électrochimique. Il existe quatre isoformes (PMCA 1 à 4) qui sont codées par des gènes distincts. La PMCA est activée par la calmoduline en présence d'ions Ca^{2+}. En absence de calcium, un domaine de l'extrémité C-terminale de la PMCA est considéré comme auto-inhibiteur, la liaison de calmoduline lève cette inhibition, d'où une augmentation de la sortie de calcium (pour revue [152]).

L'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} a été découvert à la fin des années 60. Il assure la sortie d'un ion Ca^{2+} contre l'entrée de trois ions Na^{+}. La vitesse d'échange dépend donc de la concentration de ces ions de part et d'autre de la membrane [153].

Les pompes du réticulum endoplasmique

Les pompes Ca^{2+}-ATPase du réticulum endoplasmique (SERCA) ont été découvertes à l'origine au niveau de la membrane sarcoplasmique de cellules musculaires striées. Elles appartiennent à la famille des ATPases de type P, et elles hydrolysent une molécule d'ATP pour le transport de deux ions Ca^{2+}.

La protéine SERCA de 110 kDa est codée par une famille de trois gènes ATP2A1-3 et il en existe 10 isoformes. La protéine SERCA a une structure asymétrique et comprend trois domaines : le domaine cytoplasmique qui représente 70% de la protéine, un domaine

transmembranaire à la structure complexe comprenant 10 hélices α dont certaines sont impliquées dans la fixation du Ca^{2+}, et un court domaine se situant au niveau de la lumière du réticulum. Le domaine transmembranaire forme également un canal dans lequel transite le Ca^{2+} intracellulaire.

La thapsigargine est un inhibiteur spécifique des pompes SERCA qui provoque une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par vidage du réticulum endoplasmique (pour revue [154]).

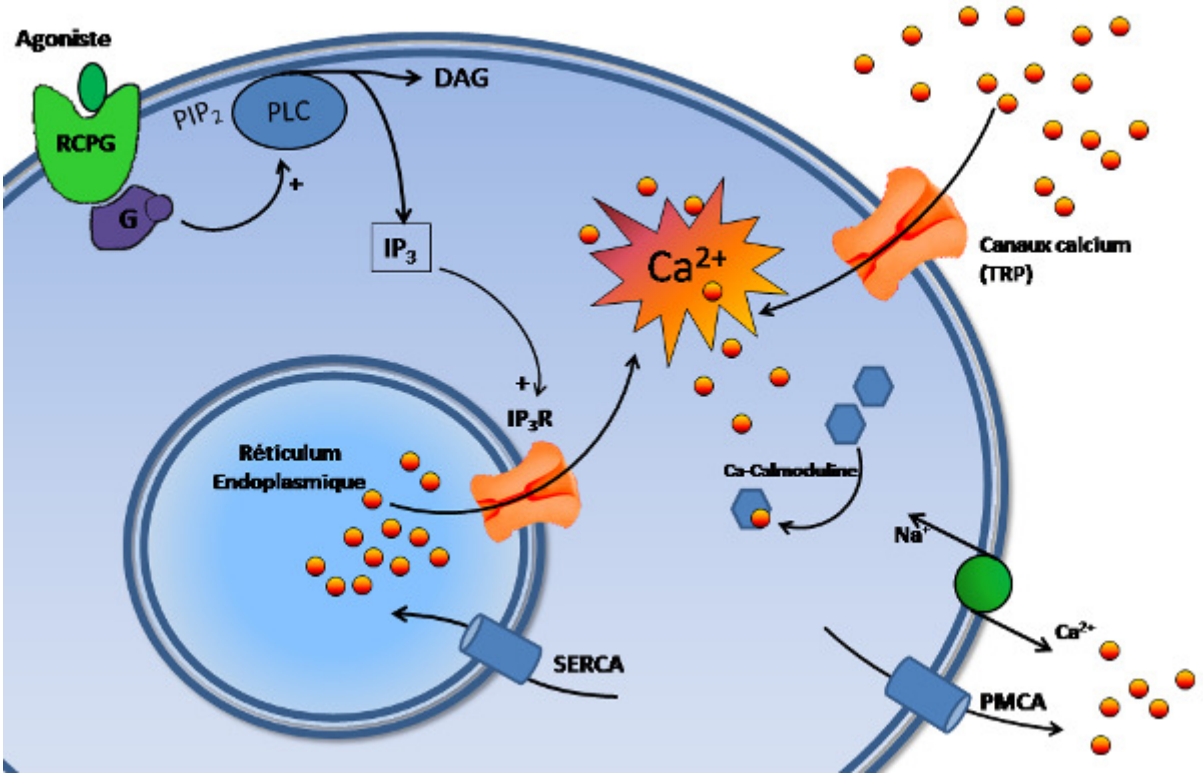

Figure 7 : Représentation schématique des voies de régulation de l'homéostasie calcique

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G , **G** : Protéine G, **PIP_2** : phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate, **PLC** : phospholipases C,**DAG** : Diacyl Glycérol, **IP_3** : Inositol-1,4,5-phosphate, **IP_3R** : Récepteur à l'IP_3, **SERCA** : Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases, **PMCA** : plasma membrane calcium ATPases, **TRP** : Transient Receptor Potential.

c) Influences sur les transports ioniques

Outre ces nombreux rôles sur l'organisation du cytosquelette et l'établissement des jonctions serrées, l'activation de l'expression génique et de la phosphorylation de certaines protéines, il a été clairement démontré que le Ca^{2+} intracellulaire a un rôle fondamental dans la régulation des transports ioniques transépithéliaux [66,105]. En effet, l'augmentation du calcium intracellulaire peut diminuer le transport de Na^+ [155], stimuler certains canaux K^+ [96] et activer une sécrétion de Cl^- apicale [78]. De plus, les canaux Cl^- activés par le Ca^{2+}

intracellulaire ont été proposés comme étant des voies alternatives à la sécrétion de Cl^-, quand la protéine CFTR n'est pas fonctionnelle [66].

I.D.3. Le NO et le pH

En plus des rôles principaux sur les transports épithéliaux du calcium et de l'AMPc, d'autres médiateurs sont susceptibles d'influencer ces transports.

Le monoxyde d'azote (ou **NO**) est produit de manière constitutive dans les cellules de trachées de mammifères [156]. Mis à part son rôle dans le déroulement des réactions inflammatoires, le NO peut moduler les transports ioniques transépithéliaux au niveau du rein et du tractus digestif [157,158]. Chez l'animal, au niveau des cellules épithéliales pulmonaires, le NO interviendrait dans la sécrétion de Cl^- induite par les tachykinines au niveau de la trachée [159]. De plus, Elmar et al. ont observé une diminution de l'absorption de Na^+ ainsi qu'une stimulation de la sécrétion de Cl^- dans l'épithélium nasal murin [160]. Ces effets du NO sur les transports de Na^+ et Cl^- semblent passer par la modulation de la concentration intracellulaire en Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc) [161]. Le NO pourrait être impliqué également dans la régulation de la vitesse des battements ciliaires et dans la sécrétion de mucines [162]. Chez l'Homme, l'ENaC est inhibé par le NO sur la lignée A549 [163]. Le NO induit aussi une augmentation de la sécrétion d'anions [164].

Le **pH** est le reflet de la concentration de protons (ions H^+) dans une solution. Il existe une différence de valeur entre le pH extra et intracellulaire. Il est connu que le pH peut varier transitoirement par la modification de transports ioniques, ou par l'action des facteurs de croissance. De plus, le métabolisme cellulaire produit en permanence des composés acides qui doivent être éliminés par la cellule. Le pH est régulé par différents transporteurs et systèmes tampons mis en place par la cellule. Il existe notamment au niveau des membranes des cellules épithéliales des voies aériennes, des échangeurs Cl^-/HCO_3^- et Na^+/H^+, des pompes H^+-ATPases, et des canaux à H^+ [165-167].

Le pH joue un rôle sur l'activité de nombreux transporteurs membranaires. Au niveau de la peau de grenouille, les ENaC sont inhibés par une acidification intracellulaire. C'est la sous-unité α des ENaC qui semble être impliquée dans cette sensibilité [168]. Les K_{ATP} sont également sensibles au pH [92]. Le canal CFTR, est lui aussi régulé par le pH [169]. Les canaux CaCC présentent une forte sensibilité au pH, et sont inhibés par une alcalinisation [170].

Le pH module également la fréquence des battements des cils de l'épithélium

respiratoire. Une alcalinisation produit une augmentation de la fréquence de battements ciliaires, alors qu'une acidification conduira à sa diminution. Ce mécanisme de régulation semble directement lié au changement de pH, sans faire intervenir des voies de phosphorylation ou des voies dépendantes du Ca^{2+}. Les variations du pH sont donc à même de contrôler la vitesse de déplacement du mucus et donc de moduler la clairance mucociliaire [171].

I.E. Physiopathologies de l'épithélium

Les altérations de l'épithélium observées dans certaines pathologies montrent l'importance fonctionnelle de cette structure. Ainsi, la cohésion et la fonctionnalité de l'épithélium des voies respiratoires peuvent être fragilisées par certains éléments pathogènes contenus dans le mucus, ou par une réaction inflammatoire accrue. Il est souvent observé une surproduction de cytokines par l'épithélium et une modification des transports ioniques induisant le plus souvent une hypersécrétion de mucus.

I.E.1. L'asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire qui affecte les bronches. L'asthme est caractérisé par une inflammation chronique de l'épithélium qui fait l'objet d'une fragilisation structurale allant jusqu'à la desquamation [172], et par une bronchoconstriction et une hypersécrétion de mucus qui contribue à l'obstruction des voies aériennes [173]. Dans l'asthme, il existe une surexpression des ARNm de hClCa qui semble corrélée à l'augmentation de la sécrétion d'IL-9 et de mucus [77]. Plus récemment, une augmentation des CaCC a été confirmée [174]. Il est également observé dans cette pathologie une diminution du nombre de cellules ciliées et de cellules caliciformes [175-177].

I.E.2 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive (ou BPCO) est un groupe de maladies chroniques systémiques d'origine respiratoire atteignant les bronches. Il s'agit principalement de la bronchite chronique et de l'emphysème. La cause principale de ces maladies est le tabagisme. La BPCO se caractérise également par une inflammation chronique, une augmentation de la sécrétion de mucus et une destruction progressive des alvéoles. Tout

comme dans l'asthme, les fonctions épithéliales sont mises en jeu. Il a été montré, par exemple, une augmentation des CaCC [178,179] ainsi qu'une augmentation des sous-unités α et γ des ENaC [180].

I.E.3. La mucoviscidose

La mucoviscidose est caractérisée par la mutation du gène codant pour la protéine CFTR. Cela provoque un déficit de sécrétion de Cl^- qui se traduit par une déshydratation du mucus, ce qui altère la fonction de clairance mucociliaire, favorisant ainsi l'infection bactérienne et l'inflammation chronique des voies aériennes [181,182].

Les transports ioniques dans les cellules mucoviscidosiques

Le canal CFTR a d'abord été défini comme régulateur de la conductance membranaire avant qu'il ne soit décrit comme canal chlorure [56].

Il est décrit dans cette maladie une hyperabsorption du Na^+ par la levée de l'inhibition qu'exerce CFTR sur les ENaC [183]. Cette hyperabsorption de Na^+ est d'autant plus importante que la sécrétion active de chlore est défectueuse, et ne peut pas être stimulée par les agents qui augmentent la concentration cellulaire d'AMPc. Par conséquent, dans les voies aériennes mucoviscidosiques, la quantité de liquide périciliaire est diminuée à cause de cette hyperabsorption de Na^+ et d'eau à l'état basal et à cause du défaut de sécrétion de chlore en réponse aux béta-adrénergiques [54]. Il a été également montré une corrélation entre la protéine CFTR et le canal ClCa. Le niveau d'expression et d'activation des ClCa moduleraient le phénotype CF [184,185]. En effet, des souris *knock-out* pour le gène CFTR ont une expression réduite du niveau d'ARNm de l'isoforme mClCa3 [186]. D'autres études ont montré que le CFTR régule l'activité du canal ClCa mais le mécanisme est encore controversé. La compréhension des mécanismes d'expression et d'activation des canaux ClCa pourraient constituer des voies alternatives à la sécrétion de Cl^- dans la mucoviscidose.

Le calcium

La protéine CFTR pourrait avoir un rôle dans le transport d'ATP vers la lumière des voies respiratoires, ce qui produirait la stimulation de récepteurs purinergiques apicaux et une mobilisation des réserves calciques [187]. Chez les sujets CF, la mobilisation du calcium intracellulaire par l'activation de la voie des récepteurs purinergiques est exacerbée [188,189]. Le signal calcique augmente en réponse à un stimulus ce qui a pour rôle d'augmenter la réaction inflammatoire ou certains transports [188,189]. D'autre part, la

rétention de la protéine CFTR dans le réticulum provoque un stress, qui perturbe la capture du calcium dans le réticulum ; l'entrée de calcium extracellulaire peut être augmentée en réponse à l'hyperpolarisation de la membrane des cellules CF [190]. Cette perturbation du signal calcique est aussi impliquée dans une augmentation de la réponse inflammatoire [191].

L'inflammation

Dans la mucoviscidose, il existe une réponse inflammatoire anormale caractérisée principalement par une hypersécrétion de cytokines proinflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-8), et une nette diminution de la sécrétion de cytokines antiinflammatoires, notamment de l'IL-10 [192,193]. Ce déséquilibre aboutit à un afflux et à une suractivation des polynucléaires neutrophiles dans la lumière des voies aériennes.

Plusieurs travaux indiquent que la réponse inflammatoire exacerbée observée dans la mucoviscidose est constitutive des cellules [194]. Il semble bien qu'un phénomène endogène mettant en jeu, indépendamment de tout stimulus infectieux, des anomalies intrinsèques de la protéine CFTR dans les cellules épithéliales respiratoires pourrait intervenir dans l'initiation de l'inflammation.

Cependant d'autres données indiquent que cette inflammation est une cause des infections chroniques observées chez les patients CF. En effet, les pathogènes comme *P. aeruginosa* induisent une production de ces médiateurs de l'inflammation par les cellules épithéliales [195]. C'est donc l'infection qui initierait et maintiendrait l'inflammation dans le poumon CF [196,197].

Quoi qu'il en soit, ces dérégulations de la réponse inflammatoire dans la mucoviscidose contribuent à l'augmentation de la synthèse de mucus et à son hyperviscosité ainsi qu'à la déstructuration du tissu pulmonaire en dégradant les protéines structurales telles que l'élastine, le collagène et les protéoglycanes. Cette dégradation de l'épithélium favorise l'adhésion bactérienne et l'installation d'une infection chronique aboutissant finalement la destruction du parenchyme.

Les infections

Plusieurs pathogènes sont capables d'infecter le poumon CF. Les pathogènes majeurs qui infectent les voies aériennes de façon chronique chez les patients CF sont : *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* et *P. aeruginosa*. Les deux premiers arrivent très tôt dans les voies aériennes [198] tandis que *P. aeruginosa* les colonise plus tardivement [199]. Cependant, l'arrivée de *P. aeruginosa* chez ces patients est directement associée à une dégradation

pulmonaire, cause principale de la morbi-mortalité. L'environnement inflammatoire combiné à l'action de bactéries comme *P. aeruginosa* conduit à la rupture du système de jonctions intercellulaires et favorise d'autant plus l'infection [200].

I.E.4. Les infections respiratoires

Outre les infections chroniques des patients mucoviscidosiques, *P. aeruginosa* est un pathogène majeur dans les infections acquises en milieu hospitalier. De nombreux travaux ont montré le rôle de chacun des facteurs de virulence sur l'épithélium respiratoire.

Les caractéristiques et les stratégies mises en place par ce pathogène lors de l'infection sont détaillées dans le chapitre suivant.

II. Les infections du système respiratoire par *P. aeruginosa*

II.A. Pseudomonas aeruginosa

II.A.1. Caractéristiques générales

P. aeruginosa est un bacille à Gram-négatif, mobile, capable de se multiplier dans un intervalle de température très large (+ 4°C à + 42°C). Ce pathogène présente un métabolisme oxydatif, mais peut aussi utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons en croissance anaérobie ce qui lui permet de croître dans des environnements très divers. Il est présent dans le sol, l'eau, les végétaux et les matières organiques en décomposition.

P. aeruginosa possède un des plus grands génomes bactériens connus, 6.3 Mbases codant 5570 cadres de lecture. Le séquençage de la souche PAO1 en 2000 a permis de montrer qu'un nombre considérable de gènes sont impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques [201]. Cela lui confère une grande capacité d'adaptation dans de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments. Par sa versatilité, *P. aeruginosa* peut être retrouvé naturellement sous forme planctonique, mobile ou dans un biofilm attaché à un substrat.

II.A.2. Infections dues à *P. aeruginosa* en clinique humaine

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes : Hommes, animaux, plantes, insectes. En clinique humaine, les pathologies induites par une infection à *P. aeruginosa* peuvent avoir des formes diverses : infections oculaires, urinaires, pulmonaires, neuro-méningées, des plaies chez les grands brûlés et des plaies opératoires, parfois accompagnées de bactériémies. Il représente une des causes principales d'infections respiratoires liées aux soins chez les patients aux défenses immunitaires altérées (cancer, chimiothérapie, ventilation mécanique, SIDA…) [202,203]. Les complications induites (œdème pulmonaire, choc septique, défaillance multi-viscérale) engendrent 50 à 70% de mortalité et cela en dépit des traitements complexes et coûteux mis en œuvre [203]. La colonisation par *P. aeruginosa* est une étape marquante de la dégradation de la fonction pulmonaire chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Les exacerbations aiguës liées à *P. aeruginosa* sont des causes majeures de mortalité et de morbidité chez ces sujets [199,204].

De plus, *P. aeruginosa* est une bactérie difficile à éradiquer car elle présente de nombreuses résistances naturelles aux antibiotiques mais aussi parce qu'elle s'adapte rapidement aux agressions médicamenteuses. Les mécanismes de cette résistance acquise

aux antibiotiques sont multiples, de type enzymatique ou par efflux majoritairement. De plus, le biofilm élaboré par la bactérie forme une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens grâce à une matrice composée de polysaccharides complexes dans laquelle s'insèrent les bactéries.

II.B. Physiologie de la virulence de P. aeruginosa

Lors de l'invasion initiale du poumon, *P. aeruginosa* exprime de nombreux facteurs de virulence pour neutraliser les défenses immunitaires innées de l'hôte. Deux classes de facteurs de virulence sont distinguées : ceux associés à la bactérie qui sont impliqués principalement dans l'adhérence et la motilité (lipopolysaccharide, pili de type IV, flagelle, alginate) ; et les facteurs secrétés intervenant principalement dans la dissémination de la bactérie et la perturbation ou la destruction des défenses de l'hôte (les toxines du système de sécrétion de type III (SSTT), les protéases, les phénazines, l'exotoxine A, les rhamnolipides, les phospholipases).

II.B.1. Les facteurs associés

a) Les pili, le flagelle

P. aeruginosa possède un seul **flagelle** polaire lui conférant la capacité de se déplacer dans des milieux liquides et semi-solides [205]. Cette structure participe aussi à l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires, et à la formation du biofilm *in vitro* [206].

Le flagelle est aussi impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. En effet, il a été montré dans un modèle de pneumonie chez la souris que des mutants dépourvus de flagelle ont une virulence atténuée [207,208]. Des études *in vitro* montrent également que le flagelle peut stimuler la réponse inflammatoire des cellules épithéliales en activant la production d'IL-8 via les récepteurs asialoGM1 et TLR2 et TLR5 [209], ou d'IL-6 de TNF-α [210] par les cellules épithéliales nasales [211].

Le **pilus de type IV** est la principale adhésine de *P. aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales via des glycolipides, tels que les asialogangliosides M1 (ASGM1) [212]. Mais il joue également un rôle dans l'adhésion aux surfaces abiotiques [213]. Tout comme le flagelle, les pili de type IV sont impliqués dans la mobilité [214] et dans la formation initiale du biofilm [206]. Les pili sont aussi importants dans la virulence de *P. aeruginosa* : dans un modèle de pneumonie murine, les souches de *P. aeruginosa* avec pili sont plus virulentes que les souches mutantes dépourvues de pili [215,216]. Le pilus de type

IV a un rôle dans l'activation de la réponse inflammatoire puisqu'*in vitro* la piline est capable d'activer la production d'IL-8 des cellules épithéliales [195].

Les pili et le flagelle sont fortement immunogènes et des travaux ont montré qu'ils pouvaient être des cibles potentielles pour un développement de vaccins [217].

b) L'alginate

Outre la forme planctonique, *P. aeruginosa* est capable de se développer au sein d'un biofilm. Dans ce mode de croissance les bactéries adhèrent à une surface et sécrètent une matrice d'exopolysaccharides comme l'alginate, dans laquelle elles sont insérées. Cette forme de développement est retrouvée dans les infections chroniques observées chez les patients CF. La formation de ce biofilm est complexe et dépend de signaux environnementaux et aussi du quorum sensing [218].

L'alginate permet non seulement l'augmentation de l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales mais joue aussi un rôle de barrière. Les bactéries présentent alors une résistance accrue aux défenses immunitaires et aux traitements antibiotiques [219,220].

c) Les lipopolysaccharides (LPS)

Constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, le LPS est principalement impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus de l'hôte.

Structure

Sur le plan structural, les lipopolysaccharides (LPS) sont constitués d'un lipide complexe (le lipide A) auquel est attachée une partie polysaccharidique (Figure 8) [221] :

- **Le lipide A** est une région hydrophobe qui permet l'ancrage de la molécule de LPS dans la membrane bactérienne externe. Il correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram-négatif qui n'est libérée de manière massive qu'après la lyse de la bactérie. Le lipide A est reconnu par les récepteurs TLR de l'hôte qui sont responsables de l'initiation de la réponse inflammatoire.
- **Le noyau** (ou **core**) oligosaccharidique, au centre, est une région hydrophile qui fait le lien entre le lipide A et l'antigène O.
- La fraction polysaccharidique constitue **l'antigène O** et elle est responsable de la spécificité antigénique. *P. aeruginosa* produit deux formes d'antigène O, la bande A

(antigène commun) et la bande B (antigène variable). Ces deux formes diffèrent par la composition de leurs répétitions polysaccharidiques.

Le LPS a été décrit sous deux phénotypes et une vingtaine de sérotypes. Le phénotype dit « rugueux » (ou rough), qui ne possède pas d'antigène O, et le phénotype « lisse » (ou smooth) dont l'antigène O est attaché à la structure lipide A / noyau oligosaccharidique. Il a été démontré sur un modèle animal que ce phénotype était plus virulent que le phénotype « rugueux » [222]. D'autre part, *in vitro*, une souche de *P. aeruginosa* déficiente en antigène O est détruite par le sérum humain alors que la souche sauvage possédant un LPS de phénotype lisse est résistante [221,223].

Dans la mucoviscidose, l'infection à *P. aeruginosa* devient chronique, et le pathogène passe alors d'une forme dite « non mucoïde » à une forme « mucoïde ». La composition du LPS change aussi. En effet, une diminution de l'expression ou la perte de l'expression de la bande B de l'antigène O est observée lors de l'émergence du phénotype mucoïde. Ainsi les souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose expriment au début de l'infection un LPS « lisse », puis avec le passage de l'infection à l'état chronique, elles n'expriment peu voire pas d'antigène O du LPS. Ces souches sont donc non sérotypables [221,224,225].

Des vaccins dirigés contre l'antigène O ont montré une réelle efficacité contre les infections causées par les souches de phénotype lisse de *P. aeruginosa*. Cependant, la grande variabilité de l'antigène O limite l'efficacité de ces vaccins [226].

Le LPS est couramment utilisé dans les modèles expérimentaux de choc septique car son injection reproduit l'ensemble des signes cliniques et biologiques observés au cours de ce syndrome.

P. aeruginosa est l'un des trois bacilles à Gram-négatif les plus fréquemment responsables de sepsis [221]. Le lipide A du LPS est responsable de l'initiation de la réaction inflammatoire, notamment du recrutement et de l'activation des cellules immunes, aboutissant, lorsque la stimulation est excessive, au choc septique et, dans les cas les plus sévères, au décès. Le lipide A de *P. aeruginosa* est généralement moins toxique que celui des entérobactéries [227]. Cependant, des études plus récentes ont montré une grande variabilité du lipide A, et la toxicité du LPS dépend du degré d'acétylation du lipide A [228]. La souche PAK mise en culture dans un milieu dépourvu de magnésium induit une production de LPS hexa-acétylé et augmente la stimulation des cellules [229].

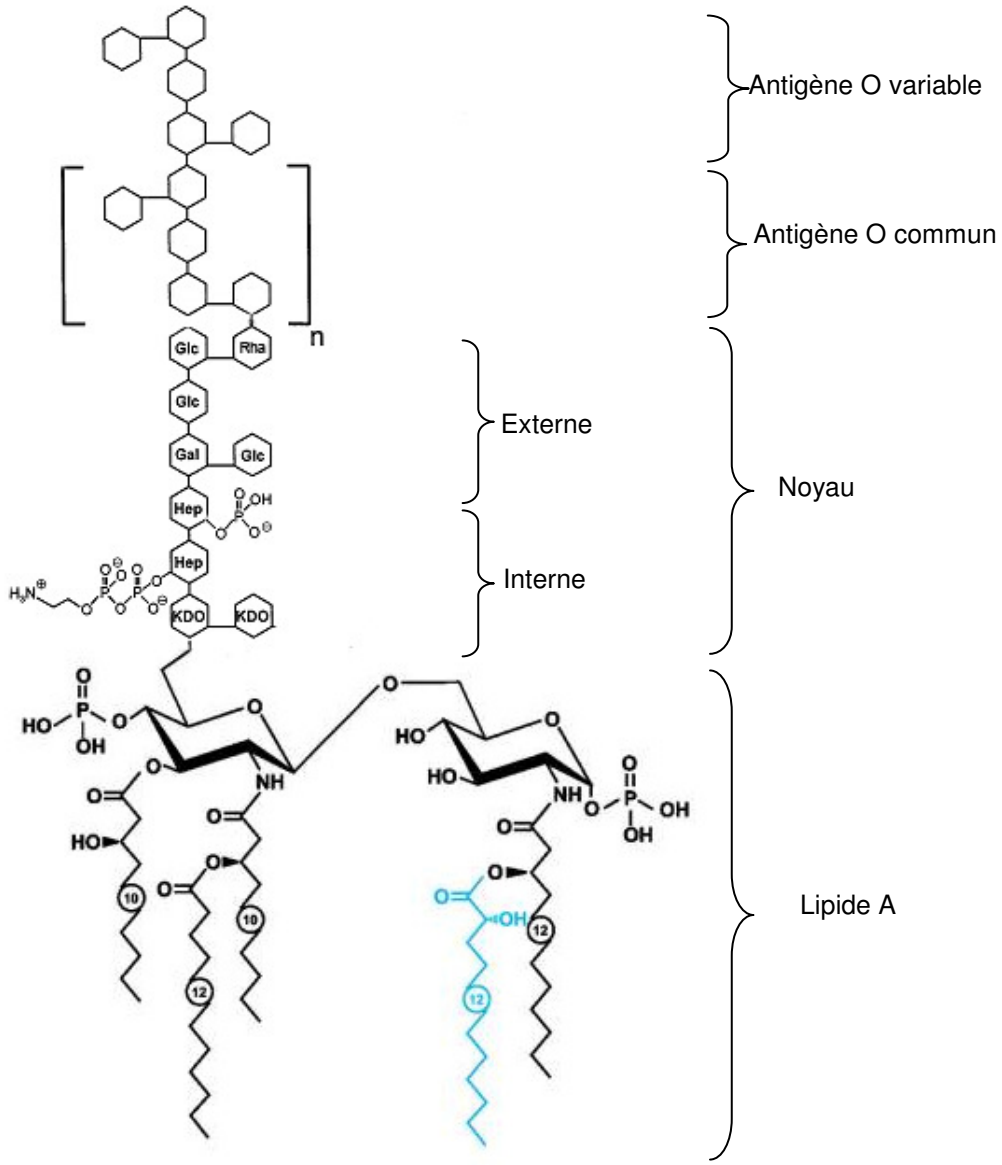

Figure 8 : Schéma de la structure du LPS de *P. aeruginosa*
(D'après Pier [230])

Les récepteurs du LPS

- TLR

Les **TLR** appartiennent à la famille des PRR (Pattern-Recognition Receptors). Ce sont des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes, appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et impliqués dans la réponse immunitaire innée. Chez les mammifères, il existe 10 TLR différents qui sont exprimés sur la plupart des cellules immunes et certains sont présents à la surface des cellules épithéliales [231].

Un des mieux étudiés est celui qui reconnaît le lipide A du LPS : le TLR4. Le TLR4

permet l'induction de la réponse de l'hôte mais initie en même temps les pathologies induites par le LPS [232,233]. La reconnaissance du LPS par le TLR4 est complexe, et nécessite l'intervention de plusieurs protéines. La LPS binding protein (LBP) qui libère le LPS de la membrane bactérienne, et permet sa présentation au récepteur CD14 pour former un complexe LPS-CD14. Ce complexe peut alors interagir du côté extracellulaire avec le TLR4 en présence du cofacteur MD-2. La transduction du signal par le TLR4 conduit à la sécrétion de cytokines (TNF, IL-1, IL-6, Platelet Activating Factor : PAF, …) *via* la translocation du facteur nucléaire NFκB (pour « Nuclear Factor κB »).

D'autres TLR ont été identifiés au niveau des cellules épithéliales respiratoires humaines normales et CF [234,235]. Il a été montré en particulier la présence de TLR2 et TLR4 impliqués dans la reconnaissance du LPS et des pili [236], et celle de TLR2 et TLR5 impliqués dans la reconnaissance du flagelle. Des expériences d'immunohistochimie ont également révélé une différence de distribution des TLR, il semble que TLR2 soit présent dans la membrane apicale des cellules épithéliales bronchiques, alors que TLR4 serait basolatéral [234].

- Asialoganglioside M1 (ASGM1)

P. aeruginosa peut reconnaître des glycolipides et en particulier la séquence GalNAcβ1-4Gal contenue dans les ASGM1 [237]. Les ASGM1 sont présents, entre autre, sur les cellules épithéliales. Ce sont des récepteurs pour le flagelle, les pili et le LPS [212,216,238]. Cependant, ils n'ont pas de domaine transmembranaire ni intracellulaire, et sont ainsi incapables d'induire un signal intracytoplasmique. Ils interagissent donc probablement avec d'autres récepteurs présents sur la membrane cellulaire.

Le rôle de ces récepteurs est encore peu connu. Ils pourraient être impliqués dans l'adhésion de la bactérie aux cellules [239,240]. Cependant, leur rôle semble mineur dans le cas de souches cliniques de *P. aeruginosa* [241]. Plus récemment, il a été montré que les ASGM1 pouvaient interagir avec le TLR5 et le TLR2 lors d'une stimulation par la flagelline [209]. Cette interaction induit une production de cytokines de type IL-8 et des mucines MUC-2 par activation d'une voie dépendante du calcium intracellulaire [238,242]. Cependant, à ce jour, aucun rôle n'a été montré avec le LPS.

- CFTR

Plusieurs hypothèses ont été mises en avant pour expliquer l'hypersusceptibilité des patients atteints de mucoviscidose aux infections à *P. aeruginosa*. Parmi elles, l'absence de protéines CFTR fonctionnelles aurait un rôle dans le défaut d'élimination de *P. aeruginosa* au niveau des poumons.

En effet, le LPS de la membrane externe de *P. aeruginosa* est directement reconnu par

la cellule épithéliale et détermine la capacité des cellules à internaliser la bactérie [243]. Ce processus est absent dans les cellules ne possédant pas de CFTR [244]. La protéine CFTR a alors été identifiée comme étant le récepteur provoquant cette internalisation [245]. Cette propriété de CFTR a été confirmée ensuite par des études sur des souris CF [246].

CFTR est capable de se lier à l'antigène O et d'extraire le LPS de la membrane de *P. aeruginosa*, ce qui provoque l'internalisation du LPS et de la bactérie elle-même. Cette internalisation déclenche la translocation du facteur NFκB et l'initiation de la réponse immunitaire [247]. Ce phénomène participerait à l'élimination du pathogène et expliquerait la persistance de ces infections dans la mucoviscidose puisque des souches cliniques mucoïdes exprimant pas ou peu d'antigène O, et surexprimant de l'alginate perdent leur capacité à se lier au CFTR [246,248]. Cependant cette hypothèse est encore controversée. D'autres études montrent que l'internalisation de *P. aeruginosa* n'est pas dépendante du CFTR [249]. Le rôle de CFTR en tant que récepteur pour le LPS reste donc encore à éclaircir.

II.B.2. Les facteurs secrétés

En plus des facteurs associés à la membrane bactérienne, *P. aeruginosa* produit une batterie de facteurs de virulence. Ils peuvent être secrétés dans le milieu environnant ou directement dans des cellules eucaryotes sous certaines conditions. Pour se faire, différents systèmes existent.

a) Les systèmes de sécrétion

La sécrétion des facteurs de virulence s'effectue grâce à différents mécanismes qui permettent le transport actif de protéines à travers les membranes bactériennes [250]. *P. aeruginosa* possède cinq voies principales de sécrétion :

- Le système de sécrétion de **type I** permet le transport de protéines directement du cytoplasme vers le milieu extérieur. Il est constitué de trois complexes protéiques.
- Le système de sécrétion de **type II** s'effectue en deux étapes. La première consiste en un transport des protéines à travers la membrane interne dans l'espace périplasmique, puis la seconde étape correspond à l'export à travers la membrane externe. Ce système permet notamment la sécrétion d'élastases (LasA, LasB) et de l'exotoxine A.
- Le système de sécrétion de **type III** sera détaillé ci-après.

- Le système de sécrétion de **type IV** n'a pas été mis en évidence chez *P. aeruginosa.*
- Le système de sécrétion de **type V**, aussi appelé autotransporteur, permet le transport protéique à travers la membrane interne via le complexe Sec, puis les protéines réalisent elles-mêmes le pore nécessaire à leur passage à travers la membrane externe.
- Le système de sécrétion de **type VI** a été identifié très récemment, ce système indépendant du complexe Sec est encore très peu connu [251,252].

b) Les facteurs secrétés

(1) Protéases

Les élastases **Las A** et **Las B** produites par *P. aeruginosa* sont sécrétées par le système de sécrétion de type II. Leur action dégrade l'élastine nécessaire à la contraction et l'extension du tissu pulmonaire.

LasB est une métalloprotéinase à zinc qui dégrade l'élastine, mais aussi la fibrine et le collagène [253]. LasB est capable de moduler la réponse immunitaire en inactivant les immunoglobulines, IgA et IgG [254,255].

LasA est une sérine protéase qui agit en synergie avec LasB pour dégrader l'élastine. Elle crée de petites coupures dans l'élastine, la rendant sensible à la dégradation par d'autres protéases [256].

In vivo, des souches ne possédant pas d'élastase sont moins virulentes que les souches sauvages [257]. L'élastase de *P. aeruginosa* peut perturber les fonctions épithéliales par la rupture des jonctions serrées [258,259], et par la dégradation des protéines du surfactant (SP-A et SP-D) [260].

P. aeruginosa synthétise une sérine protéase régulée de manière différente des autres protéases : la **protéase IV**. La protéase IV est un facteur de virulence majeur dans un modèle de kératite [261]. Cette enzyme dégrade le fibrinogène, le plasminogène, les composants du complément et les IgG [262]. Au niveau pulmonaire, la protéase IV est impliquée dans la dégradation des protéines du surfactant [263].

La **protéase alcaline** peut être sécrétée par le système de sécrétion de type I. Cette métalloprotéase peut lyser la fibrine, le fibrinogène et la laminine [253,264], les composants du complément [255], l'interféron-γ [265] et le TNF-α [266].

Enfin, très récemment, une nouvelle protéase a été identifiée (**LepA**). Elle serait capable d'activer une réponse inflammatoire par la translocation du facteur NFκB [267]. En revanche,

son rôle dans la virulence n'a pas encore été déterminé.

(2) Phospholipases

P. aeruginosa sécrète trois types de **phospholipases de type C** : une phospholipase C (PLC) non-hémolytique la plcN, une phospholipase hémolytique la plcH [268] et une phospholipase appelée plcB [269].

La plcH hydrolyse la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, des composants de la membrane cellulaire des cellules eucaryotes. En revanche, elle possède également une activité sphingomyéline synthétase [270]. Son rôle dans la virulence est montré dans un modèle d'infection de souris brûlées. Les souches de *P. aeruginosa* mutantes déficientes en plcH sont moins virulentes que les souches sauvages [271].

De plus, l'inoculation intranasale et intrapéritonéale de phospholipases C de *P. aeruginosa* à des souris peut induire une réponse inflammatoire par l'augmentation de la production de cytokines proinflammatoires [272]. Les PLC de *P. aeruginosa* induisent aussi une toxicité directe sur les cellules épithéliales de rein et de foie [273].

(3) Exotoxine A

L'exotoxine A est secrétée par le système de sécrétion de type II, et est capable de perturber la synthèse protéique par l'ADP-ribosylation d'eEF2 (eukaryotic elongation factor 2) [274]. *In vivo*, l'exotoxine A provoque une inflammation pulmonaire chez la souris [272], une modification de l'absorption de fluide chez le rat [275]. Dans une étude *in vitro*, elle diminue l'expression des jonctions serrées de l'épithélium [258]. Elle peut également induire l'apoptose des mastocytes humains en activant les voies caspases 3 et 8 [276].

(4) Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants produits par *P. aeruginosa*. Ils sont composés de rhamnose et d'acide β-hydroxydécanoïque [277]. Ces composés sont amphiphiles et possèdent un pouvoir détergent. Ils peuvent ainsi solubiliser les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend plus accessibles aux phospholipases bactériennes. Les rhamnolipides sont capables d'inhiber l'absorption de sodium [278] et de détériorer la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire humain en altérant les jonctions serrées [200]. Ils ont aussi un rôle dans le maintien de l'architecture des biofilms [279] et seraient impliqués dans la mobilité des bactéries [205].

(5) Pyocyanine

La pyocyanine (N-méthyl-1-hydroxyphenazine) est un pigment qui donne la couleur bleu-verte caractéristique de *P. aeruginosa*. La pyocyanine peut facilement pénétrer les

membranes biologiques, et plusieurs études ont montré des effets directs sur les cellules humaines comme l'inhibition des battements ciliaires [280] et la perturbation de l'homéostasie calcique [281]. De plus, il a été montré que la pyocyanine peut inactiver l'inhibiteur de protéases α1 ou encore augmenter la libération d'IL-8 par les cellules épithéliales des voies aériennes [282].

Le rôle de la pyocyanine dans la virulence a été montré *in vivo* dans un modèle de souris brûlées ou de pneumonie aiguë [283].

(6) Sidérophores

Les sidérophores sont des composés secrétés par les bactéries fonctionnant comme de puissants chélateurs de fer, le solubilisant et le transportant à travers les membranes bactériennes. *P. aeruginosa* possède et produit deux sidérophores : la **pyoverdine** [284] et la **pyocheline** [285].

Les souches mutantes qui ne produisent pas de pyoverdine sont moins virulentes que les souches de *P. aeruginosa* sauvages. A l'inverse, l'ajout de pyoverdine purifiée peut restaurer la virulence de ces souches mutantes [286]. La pyocheline contribue également à la virulence de *P. aeruginosa* [287].

(7) Lectines

P. aeruginosa est capable de produire deux lectines solubles **LecA** (ou PA-IL) et **LecB** (ou PA-IIL) spécifiques respectivement pour le galactose et le fucose.

LecA est impliquée dans l'adhérence de *P. aeruginosa* sur les cellules épithéliales, mais elle est aussi capable d'augmenter la perméabilité des cellules aux autres toxines telles l'exotoxine A et l'élastase [288]. De plus, LecA est directement cytotoxique pour les cellules épithéliales respiratoires et inhibe leur croissance [289]. LecA semble être impliquée aussi dans la formation et la stabilisation du biofilm [290].

LecB est capable d'inhiber les battements ciliaires des cellules pulmonaires *in vitro* [291]. Il a été mis en évidence récemment que des souches mutantes ne produisant pas de LecB étaient inaptes à former un biofilm [292].

De plus, des travaux récents de notre laboratoire ont permis de montrer que l'expression des deux lectines est directement associée à la sévérité de l'agression pulmonaire sur un modèle d'infection aiguë chez la souris. En effet, lorsque *P. aeruginosa* est mutée sur l'une des deux lectines, ou si une des deux lectines est inhibée par un inhibiteur glycosique spécifique, la lésion pulmonaire et la translocation pulmonaire sont diminuées, et la clairance bactérienne est augmentée [293].

II.B.3. Le système de sécrétion de type III

a) Description

Le SSTT est présent chez de nombreux bacilles à Gram-négatif [294]. Il forme une seringue, par l'assemblage d'une vingtaine de protéines, ce qui permet l'injection directe de toxines dans la cellule hôte (Figure 9).

Le SSTT est composé de deux structures :

- L'appareil de sécrétion, qui est un complexe protéique enchâssé dans les membranes bactériennes, et qui permet la sécrétion des effecteurs de la bactérie sans passer par le périplasme.
- L'appareil de translocation, qui forme « l'aiguille » de la seringue, est un complexe protéique extrabactérien en contact avec l'appareil de sécrétion et pouvant s'insérer dans la membrane de la cellule hôte, permettant l'injection directe des toxines dans le cytoplasme de la cellule.

Le système de sécrétion de type III a un rôle majeur dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. En effet, la plupart des souches cliniques ou environnementales de *P. aeruginosa* expriment les gènes du SSTT, et l'expression du SSTT est directement associée à la sévérité de l'infection [295]. Il a été montré en clinique que le taux de mortalité était six fois plus important chez les patients infectés par une souche de *P. aeruginosa* exprimant le SSTT [296].

Le SSTT joue un rôle prépondérant dans la phase initiale de la colonisation et probablement dans la progression de l'infection [297,298]. En revanche, seulement 12% des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose, et infectés de manière chronique, possèdent un SSTT fonctionnel [297]. Cette proportion diminue encore au cours de l'infection.

Le SSTT induit une mort cellulaire des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages), et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Sur les cellules épithéliales, le SSTT provoque le dysfonctionnement puis la mort cellulaire par une déstructuration du cytosquelette, en détruisant les membranes et en perturbant les cascades de transduction des signaux [299].

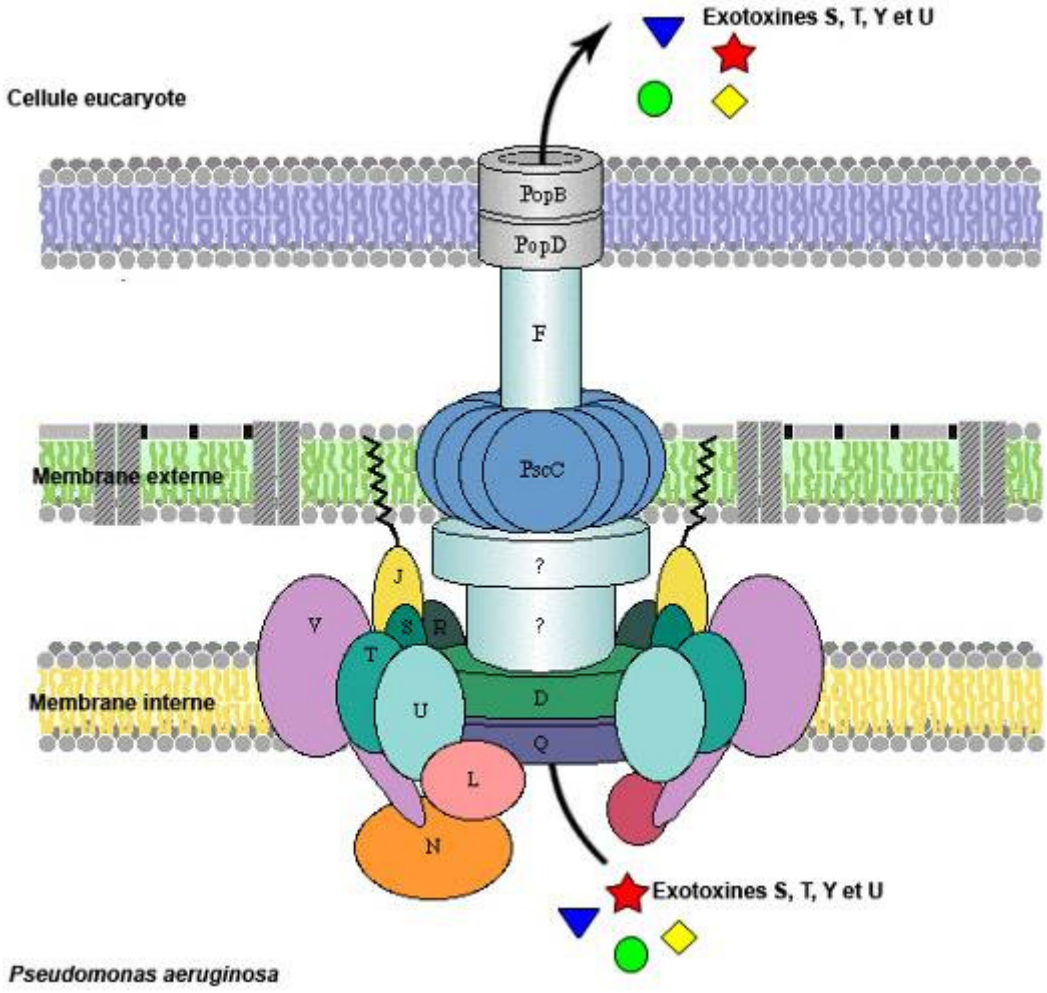

Figure 9 : Schéma représentant l'organisation du système de sécrétion de type III.
N : ATPase cytoplasmique fournissant l'énergie nécessaire à la sécrétion, **PscC** et **F :** protéines formant l'appareil de sécrétion, **PopB** et **PopD :** forment le pore de translocation. (D'après Frank [300])

b) Les toxines

Il existe quatre exotoxines sécrétées par le SSTT chez *P. aeruginosa* : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. Cependant, toutes les souches ne possèdent pas toutes les toxines. Feltman et al. ont montré que la prévalence de chaque toxine est différente selon l'origine des souches. Ainsi, ils ont montré qu'ExoT est retrouvée dans toutes les souches incluant des souches cliniques et environnementales, alors qu'ExoY est retrouvée dans 89% des souches et ExoS dans 72% des souches. La toxine ExoU, quant à elle, n'est retrouvée que dans 28% des souches en moyenne, mais avec de fortes variations selon l'origine des souches [301]. De plus, il semble que les toxines ExoS et ExoU s'excluent mutuellement.

Les toxines **ExoT** (53kDa) et **ExoS** (49kDa) sont deux protéines avec 76% d'homologies mais exprimées par deux gènes distincts sous contrôle du promoteur ExsA [302]. Ce sont des protéines bifonctionnelles qui possèdent une activité GAP sur la partie N-terminale spécifique de la famille Rho [303,304], et une activité ADP ribosyltransférase à l'extrémité C-

terminale avec des substrats différents : les protéines de la famille Ras pour ExoS et CrkI/II pour ExoT [305,306]. Cependant, l'activité d'ExoT est largement inférieure à celle d'ExoS (0.2%) [307]. L'activité ADP ribosyltransférase d'ExoS et d'ExoT conduit à la mort cellulaire ou au remodelage du cytosquelette d'actine, induisant ainsi une inhibition de la phagocytose des bactéries ou un changement de morphologie des cellules [307-309].

En plus de son activité intracellulaire, ExoS serait aussi sécrétée dans le milieu et pourrait modifier l'apolipoprotéine A1 et le fragment Fc des immunoglobulines, ou encore fonctionner comme une adhésine en se fixant à des glycosphingolipides [310]. Il a été montré que la partie C-terminale d'ExoS activait le TLR2 et la partie N-terminale le TLR4 [175,311].

ExoY est une adenylate cyclase. Son activité nécessite un ou des facteurs eucaryotes inconnus. Cette toxine induit un « arrondissement » des cellules CHO, et une augmentation de la concentration en AMPc. Elle serait également capable de former des pores membranaires [312]. Cependant, ExoY aurait seulement un rôle mineur dans la cytotoxicité de *P. aeruginosa* lors d'une infection pulmonaire aiguë [313].

ExoU est l'effecteur le plus cytotoxique injecté par le SSTT. Cette toxine possède une activité phospholipase de type A2 capable d'induire l'hydrolyse directe des phospholipides de la membrane des cellules hôtes [314]. Cependant, ExoU nécessite la présence d'un cofacteur eucaryote. *In vivo*, la production d'ExoU est associée à une agression pulmonaire rapide et sévère et possède un rôle déterminant dans le développement du choc septique [315,316]. Kurahashi et al. ont montré qu'ExoU est responsable de la décompartimentalisation de la réponse inflammatoire [317].

c) Régulation du SSTT

La diversité des rôles du SSTT, et des environnements dans lesquels il s'exprime, met en évidence l'importance qu'il joue dans les mécanismes de virulence de *P. aeruginosa* et laisse supposer un haut niveau de régulation.

En effet, l'ensemble des gènes constituant le SSTT est sous le contrôle d'un facteur transcriptionnel, ExsA, qui coordonne l'expression des gènes de l'appareil de sécrétion, mais aussi les gènes des toxines de façon directe ou indirecte. Les souches mutées pour ce gène *exsA* sont beaucoup moins virulentes dans des modèles d'infection pulmonaire [318] et ont une cytotoxicité réduite sur les cellules eucaryotes [319].

De plus, des études suggèrent qu'il existe deux états possibles du SSTT, un état non inductible, observé sur des souches issues d'infection chronique à *P. aeruginosa* dans lequel les souches perdent leur capacité à activer leur SSTT [297,301], et un état inductible qui est

activable par des signaux *in vitro* ou *in vivo* qui permettent l'injection ou la sécrétion des toxines du SSTT.

(1) Les signaux d'activation

Même en absence de signaux d'activation, il existe une faible expression des gènes du SSTT, permettant la formation d'un pool de toxines préformées, mais non sécrétées. Cependant, il a été montré que le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa* peut être activé par deux signaux environnementaux principaux. *In vivo*, le SSTT nécessite un contact direct entre la bactérie et la cellule hôte pour délivrer les toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte [320]. D'autre part, le SSTT peut être activé *in vitro* par une faible concentration de calcium dans le milieu environnant par addition d'un chélateur [300,321].

La présence de sérum dans le milieu extracellulaire semble aussi être un facteur agissant sur l'activation du SSTT [320]. En effet, Kim et al. ont mis en évidence que des protéines du sérum comme l'albumine ou la caséine pouvaient activer la sécrétion du SSTT. Ces protéines seraient reconnues par la bactérie, et en combinaison avec la faible concentration de calcium du milieu environnant, cela induirait l'injection des toxines du SSTT [322].

Malgré la nécessité clairement établie de ces différents signaux d'activation du SSTT, le mécanisme d'induction, par contact cellulaire, et la signification physiologique du signal « déplétion calcique » restent encore à éclaircir. De plus, il existe plusieurs voies d'activation du SSTT que nous détaillerons dans le chapitre suivant. La déplétion calcique et le contact avec la cellule hôte utiliseraient deux voies différentes du contrôle de l'expression du SSTT de *P. aeruginosa* [323].

Enfin le SSTT peut être aussi modulé par d'autres signaux. Ainsi il a été montré des rôles du cuivre, du choc osmotique et du métabolisme, ainsi qu'une autorégulation de la sécrétion des toxines par les toxines elles-mêmes.

(2) Régulateurs

Il existe deux classes de régulateurs : ceux codés au niveau des opérons du SSTT, contrôlés par ExsA et ceux indépendants d'ExsA.

Régulation ExsA dépendante

Chez *P. aeruginosa*, trois protéines ExsD, ExsC et ExsE forment une cascade qui régule l'activité transcriptionnelle d'ExsA (Figure 10). La protéine ExsE, au sommet de cette cascade, couple la transcription des gènes du SSTT avec l'activation de la sécrétion.

En absence d'activation, le canal de sécrétion est fermé, ExsE est fixée à ExsC laissant ExsD jouer un rôle d'inhibiteur en se fixant sur ExsA.

Lors de la présence des signaux d'activation, par exemple la déplétion calcique, ExsE est sécrétée, ExsC libérée se fixe sur ExsD et libère ExsA ce qui induit la transcription des gènes du SSTT.

Cette activation de la transcription du SSTT sous la dépendance d'ExsA est dépendante du contact avec la cellule hôte ou de la déplétion calcique. Cependant même si ces phénomènes ont été bien décrits, les mécanismes d'induction du contact cellulaire, la relevance de la déplétion calcique comme signal physiologique ainsi que les événements permettant la sécrétion d'ExsE lors de l'activation sont encore inconnus.

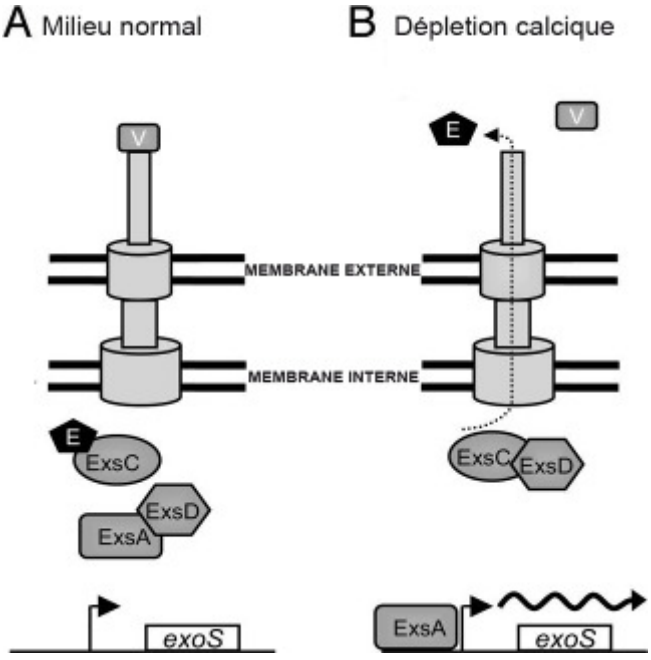

Figure 10 : Modèle d'induction du SSTT *in vitro.*

A. En présence de calcium dans le milieu le canal de sécrétion est fermé, ExsE séquestre ExsC, le SSTT n'est pas activé. **B.** Avec la déplétion calcique, le canal s'ouvre et ExsE est secrété. ExsC séquestre ExsD permettant la libération d'ExsA et l'expression du SSTT. (D'après Rietsch [324]).

Régulation ExsA indépendante

➢ Les régulateurs globaux

- **Vfr/AMPc :** *P. aeruginosa* possède deux adenylates cyclase : CyaA et CyaB. Des études récentes ont montré que la déplétion calcique augmente l'AMPc intracellulaire en activant CyaA et CyaB [325]. L'augmentation d'AMPc peut alors activer l'expression de certains gènes de *P. aeruginosa* par sa liaison avec le régulateur Vfr. Vfr a d'abord été décrit comme un régulateur global du quorum sensing (détaillé dans le chapitre II.B.4), de la production d'exotoxine A et des pili de type IV ainsi que du système de sécrétion de type II [326-328]. Cependant, la voie AMPc / Vfr est capable de réguler l'expression de près de 200

gènes dont ceux du SSTT [325]. Une délétion de *vfr* ou des deux adenylates cyclase rend la bactérie incapable de sécréter de l'ExoS lors d'une déplétion calcique. De plus, la CyaB possède un segment transmembranaire, et pourrait être impliquée dans l'activation du SSTT lors du contact avec la cellule eucaryote. Cependant, la façon dont Vfr active les gênes du SSTT est encore inconnue.

- D'autres systèmes de régulation globale semblent impliqués dans la régulation du SSTT : **RetS** et **LadS**. Il a été montré que des mutants RetS ont une cytotoxicité diminuée alors que des mutants LadS sont hypercytotoxiques [329].

➢ Rôle du métabolisme

De nombreuses études montrent que l'expression des gènes du SSTT serait aussi influencée par l'osmolarité et différents signaux métaboliques.

- En effet, il a été montré que la transcription des gènes du SSTT est augmentée lors d'une élévation de la concentration extracellulaire en sel et cette réaction est couplée à une élévation de la concentration en AMPc [330,331].

- Des mutants n'ayant plus de pyruvate dehydrogenase ou de régulateur de transport de glucose ne sont plus capables d'exprimer des gènes du SSTT lors d'une déplétion calcique [332].

- Les pompes d'efflux MexCD-OprJ et Mex-OprN, qui permettent l'efflux des antibiotiques diminuent l'expression d'*exsA* lorsqu'elles sont hyperexprimées [333].

- La surexpression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme de l'histidine comme *hutT* diminue l'expression les gènes du SSTT [334].

- Une augmentation de cuivre réprime l'induction du SSTT par le système **CopR-CopS** qui contrôle l'expression de PtrA, un anti-activateur d'ExsA [335].

➢ Rôle du quorum sensing

Des mutants n'exprimant plus le système Rhl du quorum sensing (détaillé dans le chapitre II.B.4) montrent une surexpression des gènes du SSTT ainsi qu'une sécrétion d'ExoS précoce lors de la phase de croissance exponentielle [336]. De la même manière, la répression du facteur sigma de réponse au stress et à la densité cellulaire induit une surexpression d'ExoS [337].

- Le phénotype mucoïde

Lorsque les infections à *P. aeruginosa* deviennent chroniques, les bactéries se développent en biofilm en produisant une matrice à base d'alginate dans laquelle elles sont insérées. La plupart des souches isolées de patients CF ne sont plus capables d'exprimer le SSTT lors d'une déplétion calcique [338]. Hogardt et al. ont montré qu'ExoS était réprimée lors d'une croissance en biofilm [337]. Le gène *algR*, un régulateur de la synthèse d'alginate, est impliqué dans la répression du SSTT, puisque sa surexpression inhibe l'expression des gènes du SSTT [339].

Régulation post-transcriptionnelle

- Les chaperonnes

Certaines protéines du SSTT, une fois produites, sont stockées dans le cytoplasme bactérien avant leur sécrétion ce qui nécessite l'existence des protéines chaperonnes. Bien qu'elles soient encore peu connues, ces chaperonnes ont pour rôle la protection des protéines auxquelles elles se fixent. Elles auraient aussi un rôle dans la sécrétion des protéines, et même dans la régulation transcriptionnelle du SSTT [340].

Chez *P. aeruginosa,* il a été décrit plusieurs protéines chaperonnes : Orf1 (ou SpcS) est importante pour la sécrétion d'ExoS en maintenant la protéine sous une conformation « sécrétion compétente » [341], SpcU serait une chaperonne spécifique pour ExoU [342]. Des chaperonnes seraient aussi nécessaires aux protéines formant la seringue. Il a été montré que PcrH pouvait limiter la protéolyse de PopD et aider à l'insertion de PopD dans la membrane des cellules eucaryotes [343] tandis que Pcr2 pourrait être associée à PopN [344].

- Autorégulation par les toxines

Récemment, un phénomène d'autorégulation de la sécrétion des toxines a été mis en évidence. En effet, ExoS limite l'activation de la translocation des toxines du SSTT dans des cellules préalablement intoxiquées par la toxine elle-même. Ce phénomène de feedback négatif dépendrait des activités enzymatiques d'ExoS [345].

II.B.4. Le Quorum Sensing

Initialement décrit chez des bactéries marines bioluminescentes appelées *Vibrio fischeri*, le « quorum sensing » permet de coordonner certains comportements ou actions entre bactéries de la même espèce, et cela en fonction de la densité de leur population. *P. aeruginosa* contrôle la production de la plupart de ses facteurs de virulence extracellulaires via ce mécanisme [256].

Le système repose sur la production de petites molécules « signal » appelées autoinducteurs synthétisées par la bactérie. Les autoinducteurs sont des N-acyl homosérine lactones (AHL) qui peuvent facilement traverser les membranes bactériennes. Lorsque que la densité bactérienne est faible, l'autoinducteur produit est dilué dans le milieu et sa concentration intra-bactérienne est faible. Avec l'augmentation de la densité bactérienne, la concentration extracellulaire et intracellulaire en autoinducteurs augmente. Lorsque le taux d'AHL atteint un niveau seuil, ils peuvent se lier à un activateur transcriptionnel. Le complexe ainsi formé déclenche l'activation de la transcription de différents gènes cibles tels que les gènes de virulence, ou les gènes responsables de la synthèse de l'autoinducteur. Cette activation est alors déclenchée de manière synchrone dans toute la population bactérienne [346].

Chez *P. aeruginosa*, deux principaux systèmes de quorum sensing ont été découverts, le système *las* et le système *rhl*. Tous deux contrôlent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la virulence.

Les gènes activés par le système *las* comprennent notamment les gènes codants pour les élastases LasA et LasB (*lasA et lasB*), la protéase alcaline (*aprA*), l'exotoxine A (*toxA*), pour des protéines de la machinerie de sécrétion de type II Xcp (*xcrP* et *xcrR*). Ce système active aussi le deuxième système de régulation qui est le système *Rhl*.

Le système *rhl*, est capable d'activer de nombreux gènes cibles comprenant : l'opéron *rhlAB* qui est nécessaire à la production des rhamnolipides, il active également l'expression d'une série de gènes qui codent pour l'élastase (*lasB*), la protéase alcaline (*aprA*), la pyocyanine (*pyc*), et pour des protéines impliquées dans la machinerie de sécrétion Xcp (*XcpR* et *XcpP*). De plus, il a été montré que l'expression du système de sécrétion de type III pourrait être régulée négativement par le système *rhl* [336]. Ces deux systèmes s'autocontrôlent et plusieurs facteurs régulent ces deux systèmes de quorum sensing chez *P. aeruginosa* [337].

Il a été montré dans de nombreux modèles animaux que les souches mutantes déficientes pour le quorum sensing sont moins pathogènes que les souches sauvages [347,348]. Ce système contribue pleinement à la pathogénicité de *P. aeruginosa* en régulant

l'expression des facteurs de virulence, mais aussi en induisant l'inflammation. En effet, la stimulation des cellules pulmonaires humaines par un des autoinducteurs induit la production d'IL-8 [349,350], et l'injection de 3-oxo-C12-HSL chez la souris stimule la production de cytokines proinflammatoires et de chémokines [351]. Le quorum sensing a aussi un effet direct sur la structure de l'épithélium. La 3-oxo-C12-HSL réduit l'expression et la distribution des protéines formant les jonctions serrées *in vitro* [352].

III. Régulation de la sécrétion de l'épithélium respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons décrit précédemment les caractéristiques et fonctions de l'épithélium des voies aériennes puis nous avons décrit le pathogène *P. aeruginosa* et ses différents facteurs de virulence mis en jeu lors de l'infection.

Ces différents facteurs de virulence peuvent perturber le fonctionnement des cellules épithéliales. En effet, *P. aeruginosa* est capable de moduler la réponse inflammatoire ainsi que l'immunité innée de l'hôte en activant certains gènes dépendant du facteur NFκB. *P. aeruginosa* peut aussi augmenter l'expression des mucines, détruire les jonctions serrées par modification du cytosquelette des cellules épithéliales, moduler la respiration cellulaire, perturber le fonctionnement des mitochondries, déréguler les transports transépithéliaux d'ions et de molécules par perturbation des voies de signalisation intracellulaires.

Parmi ces nombreuses perturbations induites par *P. aeruginosa*, les rôles du calcium et des transports ioniques, bien que couramment décrits, sont encore mal compris. Dans cette dernière partie nous détaillerons les travaux relatifs aux modifications de ces deux paramètres par *P. aeruginosa*.

III.A. Le calcium des cellules épithéliales

Le calcium intracellulaire est un élément clé du fonctionnement des cellules épithéliales des voies aériennes. Les changements de concentration du calcium intracellulaire ($[Ca]_i$) régulent de nombreuses fonctions comme la sécrétion de mucus [353,354], la sécrétion de surfactant [355], la fréquence des battements ciliaires [356] ou encore les transports d'ions [357].

Les facteurs de virulence modifient le calcium intracellulaire

Plusieurs travaux ont montré le rôle de *P. aeruginosa* sur la perturbation de l'homéostasie calcique. La stimulation des récepteurs **ASGM1** par *P. aeruginosa* peut induire une augmentation de $[Ca]_i$ par une stimulation du relargage des stocks intracellulaires de calcium. Cependant, ils n'est pas montré de rôle du LPS dans cet effet, un autre composant membranaire est alors soupçonné [358].

Les ASGM1, prépondérant dans cette réponse, sont capables de se lier à divers composés de la membrane des bactéries comme le LPS, la flagelline ou les pili.

Il a d'ailleurs été clairement démontré que la **flagelline** appliquée du côté apical pouvait stimuler une augmentation de concentration calcique intracellulaire ($[Ca]_i$) [209]. McNamara et al. montrent que cet effet ne serait pas dû à une stimulation directe par une l'interaction ASGM1 / flagelline. En revanche, cette liaison induit un relargage d'ATP qui activerait la voie de l'IP3 permettant le relargage des stocks intracellulaire de calcium [238]. Cependant dans une autre étude, l'effet de la flagelline du côté apical sur le $[Ca]_i$ n'est pas détectable ; en revanche, un effet du côté basolatéral est observé [359]. Pourtant les stimulations induites par la flagelline (Inhibition des ENaC, stimulation de la production d'IL-8 et de mucines) sont toutes inhibées par un chélateur calcique intracellulaire, indiquant que les effets induit par la flagelline sont provoquées par une augmentation de calcium intracellulaire. Récemment, Fu et al. concluent que l'induction du signal calcique n'est pas nécessaire pour que la flagelline induise une production d'IL-8 au niveau des cellules épithéliales ; cependant ce signal calcique augmente l'activation de la réponse immune provoquée par *P. aeruginosa* [360].

L'étude de Ratner et al. ne montre pas d'effets du **LPS** de *P. aeruginosa*. Pourtant, d'une part, il a été clairement établi que les récepteurs ASGM1 pouvaient également être des récepteurs pour le LPS [212]. D'autre part, chez le rat, le LPS d'*Escherichia coli* augmente le $[Ca]_i$ par une entrée extracellulaire de calcium sur des pneumocytes de type II [361], ou des cellules du pancréas [362]. Un rôle du LPS de *P. aeruginosa* sur le calcium intracellulaire ne serait donc pas à exclure.

D'autres facteurs de virulence sont capables de modifier le calcium intracellulaire. Ainsi, des concentrations élevées de **pyocyanine** entraînent une augmentation de $[Ca]_i$. En revanche, de plus faibles concentrations ont un effet inhibiteur sur l'augmentation de calcium provoquée par des agonistes [281]. Une autre étude a montré qu'une addition de *P. aeruginosa* du côté basolatéral augmente le $[Ca]_i$ par un relargage des stocks intracellulaires et une ouverture des canaux basolatéraux. Cet effet dépend des **pili de type IV,** car les mutants n'ayant plus de pili perdent la capacité à stimuler l'augmentation de calcium. Par ailleurs, des souches n'exprimant pas la toxine **ExoU** du SSTT ne sont plus capables de stimuler une telle réponse, les autres toxines du SSTT n'étant pas impliquées [363].

SSTT et calcium

Chez de nombreuses espèces bactériennes, le SSTT est activable par une déplétion calcique du milieu environnant. Cela a été bien décrit chez *Yersinia spp*. et chez *P. aeruginosa* [364,365]. Cependant, son mode d'action ainsi que la signification physiologique de ce signal restent encore mal compris. De plus, le calcium intracellulaire des cellules eucaryotes pourrait être lui aussi un facteur modifiant et modifié par le SSTT.

Nous avons vu précédemment que le contact de *P. aeruginosa* avec la face basolatérale des cellules épithéliales induisait un relargage du calcium du réticulum endoplasmique. Cette augmentation du calcium serait due à la toxine ExoU, et les souches non cytotoxiques ne produiraient pas cet effet [363]. Ce résultat a été confirmé récemment [360]. Au contraire, l'étude de Ratner et al. avait montré un effet sur le calcium avec la souche PAO1 qui est peu cytotoxique et ne produit pas d'ExoU [358]. De ce fait, les effets des toxines du SSTT sur le calcium intracellulaire sont encore controversés. Considérant que le calcium intracellulaire pouvait être un signal activateur du SSTT, tout comme le signal calcique extracellulaire, une étude récente de Cisz et al. montre que le $[Ca]_i$ des cellules eucaryotes n'est pas capable d'influencer la sécrétion des toxines du SSTT [345]. Bien que le calcium intracellulaire soit modifié par certaines toxines du SSTT, ce signal ne semble pas jouer sur l'activation du SSTT.

Le calcium dans la mucoviscidose

Dans la mucoviscidose, les infections à *P. aeruginosa* deviennent persistantes dans les voies aériennes [182]. Il a été clairement montré que l'homéostasie calcique était perturbée chez les patients CF. Ainsi, il existe dans les cellules épithéliales CF une plus forte stimulation du relargage calcique par le réticulum endoplasmique, sans pour autant que le niveau de base de $[Ca]_i$ soit différent [189,190]. Il a été proposé que la stimulation accrue de la production des médiateurs de l'inflammation observée dans les cellules CF soit due à une voie d'activation du NFκB passant par l'augmentation de $[Ca]_i$; cette même voie qui est stimulée par *P. aeruginosa* elle-même. Ainsi, dans les cellules épithéliales CF, il existerait une boucle de stimulation de l'inflammation passant par une augmentation de la mobilisation du calcium intracellulaire. Cette stimulation de l'inflammation est alors initiée par l'infection chronique des voies aériennes et entretenue par cette l'infection chronique et par les médiateurs de l'inflammation eux-mêmes. Pourtant, cette hypothèse est aujourd'hui discutée puisque ces modifications de l'homéostasie calcique des cellules épithéliales CF n'existeraient pas à long terme [189]. Une autre étude récente montre que le signal calcique des cellules épithéliales n'est pas affecté par le phénotype CF [366]. La stimulation accrue de l'inflammation des cellules épithéliales CF serait alors due au défaut de sécrétion de chlore et de bicarbonate réduisant le volume de l'ASL et modifiant sa composition. Ces modifications de l'ASL seraient alors favorables à l'infection chronique à *P. aeruginosa*. Dans ce cas, l'augmentation de $[Ca]_i$ induite par *P. aeruginosa* n'est pas nécessaire mais contribue à l'exacerbation de la réponse inflammatoire broncho-pulmonaire chez le sujet atteint de mucoviscidose.

Malgré cela, en altérant l'homéostasie calcique, *P. aeruginosa* peut interférer avec de nombreux mécanismes de défense de l'hôte et ainsi contribuer à la physiopathologie de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

Parmi ces mécanismes régulés par le calcium, les transports d'ions et de fluide, éléments majeurs dans la fonction pulmonaire, peuvent être influencés par *P. aeruginosa*.

III.B. Les transports ioniques.

Les facteurs de virulence modifient les transports transépithéliaux

Dès 1986, Stutts et al. ont mis en évidence qu'un facteur produit par *P. aeruginosa* était capable de modifier le courant de court-circuit en diminuant l'absorption active de sodium et la conductance de chlore [367]. Plus tard, il a été montré que *P. aeruginosa* altère les transports de fluide en inhibant les ENaCs et les canaux potassiques basolatéraux. Cela nécessite une interaction directe entre la bactérie et les cellules épithéliales [368]. Cette étude montre que les facteurs de virulence tels que le LPS, l'exotoxine A et les rhamnolipides ne sont pas impliqués.

Néanmoins, d'autres études ont montré une implication de certains de ces facteurs dans la modification des transports d'ions. A faible concentration, Les **rhamnolipides** auraient un effet inhibiteur sur le courant de court-circuit. Cela serait dû à une inhibition du courant ENaC [278]. Il a été démontré aussi que la **flagelline** de *P. aeruginosa* peut inhiber le transport de sodium [359] ou activer des transports de chlore [369]. Enfin, dans un modèle *in vivo*, l'**Exotoxine A** stimule l'absorption de l'épithélium pulmonaire par une action partielle sur les ENaCs [275].

Bien qu'à ce jour aucun rôle du **LPS** de *P. aeruginosa* n'ait été démontré, il est bien décrit avec le LPS d'autres espèces bactériennes. Par exemple, chez *Klebsiella pneumoniae*, le LPS inhibe l'absorption de sodium sur un modèle de cellules épithéliales trachéales canines [370]. Il a aussi été décrit dans d'autres modèles que le LPS pouvait diminuer l'activité des Na^+/K^+ ATPase [371] ou encore moduler les NHE3 basolatéraux [372].

Les transports ioniques dans la mucoviscidose et les infections par P. aeruginosa

Dans la mucoviscidose, il existe une infection chronique des voies aériennes par *P. aeruginosa*. Cette persistance de l'infection peut s'expliquer en partie par le défaut de sécrétion de chlore des cellules épithéliales, consécutive à la mutation du transporteur de chlore CFTR.

La mutation du transporteur de chlore CFTR produit un **assèchement du mucus**. En

effet, le défaut de sécrétion de chlore couplé à l'absorption accrue de Na^+ produit une diminution du volume du liquide de surface, ainsi la clairance mucociliaire est perturbée. Le mucus devient uniforme et visqueux et le battement des cils n'est plus assez efficace pour évacuer le mucus. Ainsi, les bactéries restent dans le système respiratoire et adhérent à l'épithélium bronchique [373]. L'inflammation et l'infection persistantes pourraient encore aggraver la qualité du mucus en modifiant la production et la structure des protéines qu'il contient [374-376].

Une des hypothèses évoquée par Pier et al., pour expliquer l'hypersusceptibilité des patients mucoviscidosiques pour les infections à *P. aeruginosa* est que la protéine **CFTR** interviendrait comme **récepteur spécifique** de *P. aeruginosa* et faciliterait ainsi son internalisation. Ce mécanisme est bénéfique pour le sujet, dans la mesure où il contribue à l'élimination des bactéries des poumons par desquamation des cellules qui ont incorporé les bactéries. Ce mécanisme aboutit à une activation du facteur NFκB, et à l'induction de l'apoptose cellulaire. Les anomalies de la protéine CFTR observées dans la mucoviscidose, diminueraient l'internalisation de la bactérie [247,377].

Bien que leur rôle soit controversé dans la mucoviscidose, l'inactivation des **peptides antimicrobiens** présents dans le mucus pourrait participer à l'infection accrue par *P. aeruginosa.* Le défaut de transport des ions Cl^- par la protéine CFTR anormale entraînerait une augmentation de la concentration en NaCl dans le liquide de surface bronchique chez les patients CF [378,379]. Cette concentration élevée diminuerait l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens et favoriserait la prolifération de *P. aeruginosa* [380,381]. Cependant, d'autres études sont discordantes et ne rapportent pas d'augmentation de la concentration en NaCl chez les patients atteints de mucoviscidose [382]. La diminution de l'action des peptides antibactériens pourrait être liée à la forte déshydratation de la surface des muqueuses [383]. De plus, ils seraient plus rapidement dégradés par des cystéine-protéases chez les patients CF que chez les sujets sains [384].

D'autres phénomènes peuvent aussi expliquer l'hypersusceptibilité pour *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose. Certains récepteurs, comme les ASGM1, impliqués dans l'adhésion et la signalisation de *P. aeruginosa* sont plus abondants dans les épithéliums lésés [385]. De plus, les neutrophiles impliqués dans la réponse immunitaires aux infections présentent de nombreuses anomalies. En effet, le changement de concentration en ion chlore diminuerait l'activité bactéricide de la myélopéroxydase des neutrophiles [386,387]. Le mécanisme de mort cellulaire programmée des neutrophiles ayant phagocyté *P. aeruginosa* ou *B. cepacia* serait également altéré chez les patients atteints de mucoviscidose [388].

PRESENTATION DU TRAVAIL

I. Synthèse : contexte de l'étude

Le système respiratoire est constamment en contact avec des pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons. Pour induire une infection, la plupart de ces pathogènes doivent franchir une barrière de cellules épithéliales qui s'oppose à leur pénétration dans le milieu intérieur. Cet épithélium est également le siège d'échanges entre le milieu intérieur et les voies aériennes ce qui permet par exemple, le transport d'eau et d'ions, la régulation de l'hydratation du mucus, la sécrétion de certains métabolites et d'enzymes membranaires. L'épithélium n'est donc pas une barrière statique contre l'environnement extérieur mais plutôt un lieu d'interactions complexes et dynamiques avec les pathogènes [389,390]. Ces interactions induisent des perturbations de la structure et des fonctions de l'épithélium en détruisant les jonctions serrées, en induisant une réponse inflammatoire et en altérant de nombreuses fonctions cellulaires.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les mécanismes d'actions de *P. aeruginosa* reposent sur les facteurs de virulence de la bactérie, notamment le système de sécrétion de type III ou sur les composants membranaires comme les lipopolysaccharides.

Les exotoxines du **SSTT** de *P. aeruginosa* peuvent modifier les composants intracellulaires des cellules hôtes. L'activation du SSTT est dépendante du contact entre la bactérie et les cellules eucaryotes ainsi que de la déplétion calcique du milieu environnant induite par des chélateurs comme l'EGTA (Acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthyléther) N,N,N',N'-tétra-acétique). Le rôle du signal calcique dans l'activation du SSTT est encore peu compris, et la signification physiologique de ce signal est inconnue. De plus, l'utilisation de chélateurs calciques induit aussi des modifications de la structure des membranes externes des bactéries à Gram-négatifs entraînant une hypersusceptibilité de ces bactéries aux antibiotiques [391]. Ainsi, l'influence des chélateurs sur la cytotoxicité de *P. aeruginosa* est inconnue.

D'autre part, à ce jour, aucun rôle du **LPS** chez *P. aeruginosa* n'a été démontré sur les transports épithéliaux et le calcium intracellulaire. En revanche, il est bien décrit chez d'autres espèces. Le LPS de *Klebsiella pneumoniae* inhibe l'absorption de sodium sur un modèle de cellules épithéliales trachéales canines [370]. Il a aussi été décrit dans d'autres modèles que le LPS pouvait diminuer l'activité des Na^+/K^+ ATPase [371] ou encore moduler les NHE3 basolatéraux [372]. Le rôle du LPS de *P. aeruginosa* sur les transports épithéliaux est donc fortement probable.

II. Hypothèses et objectifs de travail

Pour la première étude, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle :

L'EGTA peut modifier la mortalité des cellules épithéliales respiratoires humaines induite par l'activation du système de sécrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les objectifs de cette étude étaient de :

- rechercher les éventuels effets de l'EGTA sur la mortalité cellulaire induite par le SSTT de *P. aeruginosa*,
- déterminer les mécanismes par lesquels l'EGTA exerce ces effets.

Dans une seconde étude, nous avons émis l'hypothèse que :

Le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* stimule des signaux intracellulaires comme l'augmentation de calcium qui seraient susceptibles de stimuler les courants ioniques épithéliaux.

Nous avions pour objectifs de :

- rechercher les effets du LPS de *P. aeruginosa* sur le Ca^{2+} intracellulaire des cellules épithéliales bronchiques humaines,
- évaluer les éventuels effets du LPS de *P. aeruginosa* sur les courants ioniques,
- déterminer les voies de signalisation impliquées dans cette réponse.

MATERIELS ET METHODES

I. Modèles expérimentaux.

I.A. Souches bactériennes et facteurs de virulence

I.A.1. Souches bactériennes

Différentes souches de *P. aeruginosa* ont été utilisées :

- La souche CHA est une souche issue d'un patient atteint de mucoviscidose, elle possède un SSTT fonctionnel et exprime les toxines ExoS, ExoT et ExoY [392].
- La souche CHA-D1 (CHA*exsA ::Gm*^{R}) est le mutant isogénique de CHA dont le gène *exsA*, encodant le facteur de transcription ExsA nécessaire pour la synthèse des exotoxines du SSTT, est inactivé. Elle n'est pas capable d'activer le SSTT [319].
- Nous avons également utilisé de la souche CHA (*pC ::lux*) rendue bioluminescente lors de l'activation transcriptionnelle du SSTT par fusion du promoteur de l'opéron *exsCEBA* et de l'opéron *luxCDABE* intégré au site *attB* [393].
- Enfin, la souche PA103 est une souche de laboratoire exprimant un SSTT avec les toxines ExoT, ExoU et ExoY [394].

Les souches CHA, CHA-D1 et CHA (pC *::lux*) proviennent du laboratoire du Pr. B. Polack (GREPI, MENRT EA2938, Grenoble, FRANCE).

I.A.2. Culture bactérienne

Les différentes souches de *P. aeruginosa* sont maintenues congelées à -80 °C dans 10% (v/v) glycérol.

Les bactéries sont décongelées et cultivées à 37°C toute une nuit sous agitation dans du milieu Luria Bertani (LB, BD biosciences, Le Pont de Claix, France).

Le lendemain, les cultures sont centrifugées à 1,000 *g* pendant 10 min, le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 5 ml de phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), l'opération est répétée deux fois.

Le culot bactérien est ensuite resuspendu et dilué pour atteindre 10^9 CFU/ml, la mesure de dilution est évaluée par spectrophotométrie (DO_{600} = 0.55).

Tableau 1 : Composition du milieu LB.

Extrait de levure	5 g
Bactotryptone	10 g
NaCl	10 g
H2O qsp	1l
pH	7,0

La concentration bactérienne est ensuite évaluée par comptage des colonies après dilution en série et étalement sur boîtes de Pétri incubées pendant une nuit à 37°C.

I.A.3. Modèle infectieux *in vitro*

Après deux jours de culture, les cellules A549 sont à 80% de confluence et sont infectées par les différentes souches à raison de 100 bactéries pour une cellule soit à une multiplicité d'infection de 100 (MOI 100) jusqu'à un temps de 5 heures. L'infection des cellules se faisait directement dans du milieu de culture frais ne contenant ni antibiotiques ni sérum de veau fœtal.

I.A.4. Lipopolysaccharide

Le LPS utilisé est du lipopolysaccharide de *P. aeruginosa* Sérotype 10 lyophilisé (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le LPS était reconstitué directement dans du milieu Krebs à la concentration de 3 mg/ml pour une utilisation finale à 30 µg/ml.

I.B. Culture cellulaire

Etant donné la difficulté d'obtention de tissus natifs et de leur mise en culture, chaque étude a été développée à partir de lignées cellulaires immortalisées : des cellules épithéliales bronchiques humaines (16HBE14o-), et des pneumocytes de type II issu de carcinome pulmonaire (A549).

I.B.1. Lignée 16HBE14o$^-$

Nous utilisons une lignée immortalisée d'épithélium bronchique humain : 16HBE14o-, qui a conservé les capacités de transports ioniques de l'épithélium natif et qui est capable de former des jonctions serrées. Cette lignée reste un modèle idéal pour étudier les transports épithéliaux des voies aériennes [395,396]. Les cellules 16HBE14o- proviennent du

laboratoire du Dr. Grüenert (California Pacific Medical Center Research Institute, San Francisco, USA).

Les cellules sont cultivées en flasques stériles de 75 cm^2 (BD Falcon), dans du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Media : $CaCl_2$ 256 mg/l, KCl 400 mg/l, $MgSO_4$ 200 mg/l, NaCl 5800 mg/l $NaHCO_3$ 2200 mg/l NaH_2PO_4 140 mg/l, Glucose 1000 mg/l, HEPES 5957,40 mg/l, rouge de phénol 10 mg/l, Arginine 126,40 mg/l, Cystéine 24 mg/l, Histidine 42 mg/l, isoleucine 52,40 mg/l, leucine 52,40 mg/l, lysine 73 mg/l, méthionine 15 mg/l, phénylalanine 33 mg/l ; Biowittaker, Cambrex biosciences, Verviers, Belgique), complété avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine et incubées à 37°C et 5% de CO_2. Les boîtes sont recouvertes par une solution de collagène-fibronectine, nécessaire à une bonne adhésion des cellules à leur support, à la formation de jonctions serrées et à leur polarisation.

Lorsque les cellules sont confluentes, les cellules sont décollées de leur support par un traitement avec une solution de trypsine faiblement concentrée (PET : 72% Hepes Buffer Saline (HBS), 10% Polyvinypyrrolidone, 10% HBS contenant 0,2% EGTA, 8% de trypsine à 0,25% contenant 0,02 % EDTA) pendant 10 minutes dans le but de préserver la capacité des cellules à établir les jonctions serrées.

Pour mesurer les variations Ca^{2+} intracellulaire, les cellules sont remises en culture sur des boîtes de Pétri à fond de verre (*cover glass dishes*, WPI). Les cellules sont ensemencées à 10 000 cellules par boîtes. Les boîtes sont ensuite mises en culture pendant deux jours avant la manipulation. Dans ces conditions, les récepteurs membranaires éventuellement dégradés par la trypsine sont restaurés et les monocouches sont en légère sous-confluence (80%), afin de favoriser la pénétration de la sonde fluorescente.

Pour mesurer les transports transépithéliaux, les cellules sont ensemencées sur filtre semi-perméable (*snapwell, costar*) préalablement recouvert de la solution fibronectine - collagène à une densité de 250 000 cellules par filtre. La mesure de l'évolution de la résistance transépithéliale se fait quotidiennement. L'épithélium doit présenter une résistance électrique supérieure à 800 Ohm/cm^2 afin que les courants soient mesurés en chambre d'Ussing.

I.B.2. Lignée A549

Nous avons également utilisé une lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549). Ces cellules sont des pneumocytes de type II différenciés.

Les cellules sont maintenues en culture en flasques stériles de 75 ml dans du DMEM-GlutaMAX™ (Dulbecco's Minimum Essential Media : $CaCl_2$ 200 mg/l, KCl 400 mg/l, $MgSO_4$ 97.67 mg/l, NaCl 6400 mg/l $NaHCO_3$ 3700 mg/l NaH_2PO_4 125 mg/l, Glucose 4500 mg/l, $FeNO_3$ 0,1 mg/l, rouge de phénol 15 mg/l, Arginine 84 mg/l, Cystéine 48 mg/l, Histidine 42 mg/l, isoleucine 105 mg/l, leucine 105 mg/l, lysine 146 mg/l, méthionine 30 mg/l, phénylalanine 66 mg/l, sérine 42 mg/l, thréonine 95 mg/l, tryptophane 16 mg/l, tyrosine 104 mg/l, valine 94 mg/l; Invitrogen, Cergy Pontoise, France), complémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et 1% de pénicilline / streptomycine à 37°C avec 5% CO_2 jusqu'à constitution d'une monocouche confluente.

Pour les expérimentations, les cellules sont décollées par de la trypsine et mises en culture dans des boîtes de culture ou en plaques multipuits dans le même milieu. Le nombre de cellules est évalué par comptage sur cellule de Malassez.

II. Microscopie de fluorescence

II.A. Principe

La microscopie de fluorescence permet d'observer des objets fluorescents ou rendus fluorescents à l'aide de sondes spécifiques appelées fluorochromes. Cette technique se base sur la propriété de ces fluorochromes à émettre de la lumière (émission) suite à l'absorption d'un photon (excitation). La microscopie de fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. L'excitation des fluorochromes se fait par une lampe à Xénon (Osram, Germany) dont la longueur d'onde d'excitation est sélectionnée soit à travers un monochromateur optoscan (*Cairn Research Ltd*) soit par des filtres. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri puis incubées avec un fluorochrome avant d'être placées sur la platine du microscope. La fluorescence émise après excitation du fluorochrome est ensuite filtrée puis l'image transmise est détectée par une vidéo caméra CCD (Coolsnap Fx; Roper Scientific, Evry, France) couplée au microscope de fluorescence (Nikon Eclipse E800, Champigny sur Marne, France) (Figure 11).

II.B. La mesure des variations du Ca^{2+} intracellulaire

II.B.1. Sonde utilisée

Le Fura-2 est une sonde à double longueur d'onde d'excitation (340 nm et 380 nm) et à simple longueur d'onde d'émission (510 nm). Cette sonde sensible au Ca^{2+} permet

d'effectuer un enregistrement ratiométrique (340/380 nm) de l'intensité de fluorescence émise (510 nm). Nous utilisons la forme acetoxymethyl ester (AM) du Fura-2 qui peut diffuser à travers les membranes cellulaires. Une fois dans la cellule, les esters sont clivés par les estérases intracellulaires et le Fura-2 redevient imperméant.

II.B.2. Protocole

Pour la mesure du taux de calcium intracellulaire, les cellules étaient cultivées dans des boîtes de Pétri à fond de verre traitées avec une solution de fibronectine / collagène. Avant les expérimentations, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS puis sont chargées avec le Fura-2 AM (5 $\mu g.ml^{-1}$) (Molecular Probes, Invitrogen) reconstitué dans du DMSO (Sigma) pour une concentration finale à 5 mM. Le chargement des cellules par la sonde dure 45 minutes, dans l'obscurité et à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées deux fois dans une solution de Hepes-buffered Krebs-Henseleit (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Hepes 10 mM, Tris-HCl 10 mM, glucose 10 mM, pH 7.4, 280-290 $mosmol.l^{-1}$).

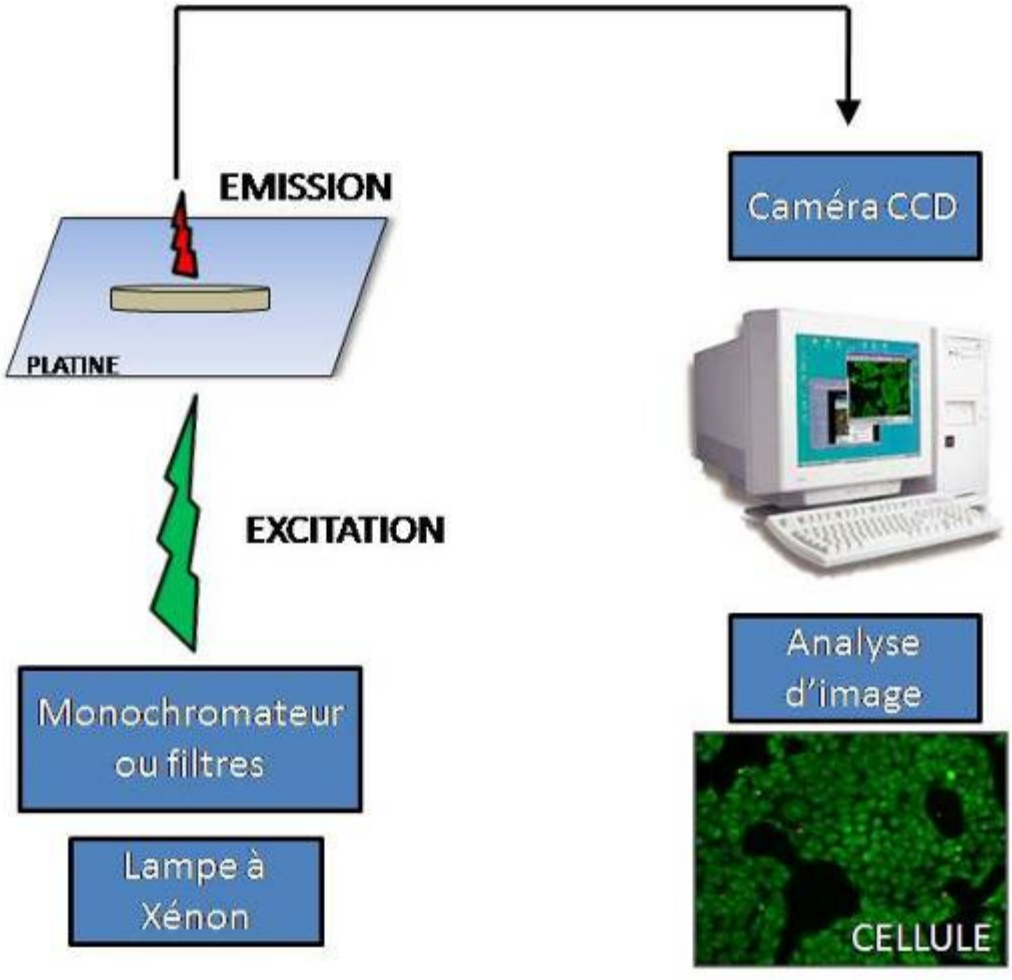

Figure 11 : Principe d'acquisition d'images par microscopie de fluorescence.

II.B.3. Solution et produits utilisés

Afin de déterminer les voies calciques mises en jeu dans la réponse au LPS, nous avons utilisé plusieurs méthodes :

- Manipulation en solution Krebs (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Hepes 10 mM, Tris-HCl 10 mM, glucose 10 mM, pH 7.4, 290 mosmol l^{-1})
- Manipulation en solution Krebs pauvre en calcium (140 mM NaCl, 5 mM KCL, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, pH 7,4, 290 mOsM)
- Manipulation en présence de **thapsigargine** (1 µM) : inhibiteur des pompes SERCA qui servent à la recapture du calcium cytosolique dans le réticulum.

De plus, pour permettre d'éclaircir l'implication des différents canaux calciques dans le signal, nous avons utilisé des inhibiteurs de ces canaux :

- **2-APB** : Inhibiteur de la voie de mobilisation calcique dépendant de l'IP3 [397], également inhibiteur des canaux de la famille TRPC [398], et potentiellement activateur des canaux de la famille TRPV [399].
- **Econazole** : Inhibe les courants des canaux calciques épithéliaux du rein ECaC1 (TRPV5) et certains TRPC [400].
- **Lanthanum** et **Gadolinium** : Inhibiteurs non spécifiques des canaux cationiques non spécifiques et des canaux calciques de type L et T [401]
- **Ruthenium Red** : Bloqueur des canaux du réticulum sarcoplasmique RyR mais aussi TRPV1 et 5 [400,402,403].
- **SKF 96365** : Bloque les SOCs et ROCs et plus particulièrement les canaux TRPC [404].
- **Verapamil** : Bloqueur des canaux calciques voltage dépendant de type L.

Tous ces inhibiteurs provenaient de chez Sigma.

II.B.4. Acquisition et analyse

Le logiciel Metafluor Imaging System (*Universal Imaging Corporation*) est utilisé pour contrôler les paramètres d'illumination de la préparation, réaliser l'acquisition et l'analyse d'images. Le logiciel nous permet de contrôler en temps réel le déroulement de la manipulation, la mise au point et l'état de la préparation. Il permet de sélectionner des régions d'intérêt à analyser dans le champ du microscope. L'ensemble des images acquises

est enregistré sur le disque dur puis stocké sur DVD afin d'en permettre l'analyse ultérieure. Les valeurs numériques sont transférées et analysées à l'aide du logiciel EXCEL. Pour l'étude statistique nous choisissons 20 régions d'intérêt correspondant à 20 cellules distinctes. Les données sont comparées entre elles en fonction des conditions expérimentales. Un test de Student est effectué, pour évaluer la significativité des résultats à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software INC., San Diego, USA). La vitesse d'acquisition des images pour la mesure des variations de Ca^{2+} intracellulaire est d'une image ratiométrique par seconde.

II.C. La mesure de la mortalité cellulaire

II.C.1. Sondes utilisées

Pour étudier la survie des cellules, nous utilisons la technique de microscopie de fluorescence avec le kit LIVE/DEAD® Cell Viability/cytotoxicity (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Ce kit est composé de deux sondes : la sonde calcein AM pénètre dans les cellules avec une membrane cellulaire intacte et est hydrolysée en un produit fluorescent vert, tandis que la sonde ethidium homodimer-1 qui a une fluorescence rouge à une grande affinité pour les acides nucléiques et pénètre seulement quand les cellules ont des membranes déstabilisées.

II.C.2. Protocole

Les cellules A549 sont cultivées en boîtes de Pétri comme décrit précédemment. Une fois les cellules confluentes, les cellules sont rincées deux fois dans du milieu DMEM ne contenant pas d'antibiotiques et de sérum de veau. Les cellules sont incubées avec 2 µl d'ethidium homodimer-1 et 1 µl de 1:10 de calcein AM dans 1 ml de milieu pendant 45 min dans le noir à 37°C. Les cellules sont ensuite placées sous un microscope de fluorescence (Nikon Eclipse E800) équipé d'une caméra CCD (Coolsnap Fx; Roper Scientific, Evry, France).

II.C.3. Solution et produits utilisés

Afin d'étudier l'influence du calcium sur la virulence de *P. aeruginosa,* nous avons utilisé du DMEM additionné de chélateur calcique.

- DMEM-GlutaMAX™
- DMEM-GlutaMAX™ + 5 mM EGTA

- DMEM-GlutaMAX™ + 5 mM EGTA + 20 mM $MgCl_2$
- DMEM sans calcium (Dulbecco's Minimum Essential Media : KCl 400 mg/l, $MgSO_4$ 97.67 mg/l, NaCl 6400 mg/l, $NaHCO_3$ 3700 mg/l, NaH_2PO_4 125 mg/l, Glucose 4500 mg/l, $FeNO_3$ 0,1 mg/l, rouge de phénol 15 mg/l, Arginine 84 mg/l, Cystéine 63 mg/l, Histidine 42 mg/l, isoleucine 105 mg/l, leucine 105 mg/l, lysine 146 mg/l, méthionine 30 mg/l, phénylalanine 66 mg/l, sérine 42 mg/l, thréonine 95 mg/l, tryptophane 16 mg/l, tyrosine 104 mg/l, valine 94 mg/l)
- DMEM sans calcium + 5 mM EGTA

Les milieux de culture DMEM provenaient d'Invitrogen. L'EGTA et le $MgCl_2$ provenaient de chez Sigma.

II.C.4. Acquisition et analyse

Pour faire l'acquisition des images toutes les heures pendant 5 heures, nous utilisons le logiciel Metamorph (Universal Imaging, Downinton, PA). A chaque temps, 2 images sont prises à un grossissement x10, la fluorescence verte correspondant à la calcein AM (λ_{exc} : 480 nm ; λ_{em} : 500 nm) et la fluorescence rouge correspondant à l'ethidium homodimer-1 (λ_{exc} : 490 nm ; λ_{em} : 635 nm). Au temps 0, la culture de *P. aeruginosa* est ajoutée pour 1% du volume final.

La mortalité cellulaire est ensuite déterminée par simple comptage des cellules vertes et rouges sur 5 champs optiques par boites et par temps ce qui correspond à environ 1000 cellules. Nous calculons ainsi un pourcentage de mort cellulaire en utilisant la formule suivante :

$$\text{Mort cellulaire (\%)} = \frac{N_{\text{cellules rouges}}}{N_{\text{cellules vertes}} + N_{\text{cellules rouges}}} \times 100$$

III. Electrophysiologie : Les chambres d'Ussing

III.A. Principe

Cette technique a été mise au point en 1951 par Ussing et Zehran [405], elle permet de mesurer le courant de court-circuit à travers une membrane biologique. On peut ainsi distinguer les transports actifs des transports passifs des ions à travers ces membranes.

D'abord mise au point pour évaluer les transports ioniques à travers la peau de grenouille, elle a été très vite adaptée à d'autres tissus épithéliaux natifs ou reconstitués sur membrane semi-perméable (trachée, bronche, intestin, culture de lignées cellulaires épithéliales…). Cette technique est aujourd'hui largement utilisée dans les domaines de la physiologie et de la pharmacologie.

Le dispositif est constitué de deux chambres séparées par l'épithélium polarisé, il s'y crée ainsi un compartiment apical et un compartiment basolatéral. Chaque compartiment est baigné par un même volume d'une solution ionique de composition précise afin d'éliminer les forces électrochimiques et mécaniques. Des transports ioniques transépithéliaux se mettent alors en place générant une différence de potentiel transépithéliale.

La technique de voltage clamp utilisée consiste à appliquer un courant à l'ensemble de l'épithélium qui annule le potentiel de membrane. Ce courant appliqué que l'on appelle courant de court-circuit (scc) est une mesure directe des flux nets d'ions transépithéliaux. Dans l'épithélium respiratoire, le courant de court-circuit traduit la résultante de l'absorption de Na^+ du compartiment apical vers le compartiment basolatéral et la sécrétion de Cl^- du compartiment basolatéral vers le compartiment apical.

III.B. Matériel

Le dispositif des chambres d'Ussing miniatures horizontales (*Navicyte)* que nous utilisons dans cette étude comprend trois éléments (Figure 12) :

- les chambres sont constituées de deux éléments transparents en plexiglas qui déterminent le compartiment apical ou muqueux, et le compartiment basolatéral ou séreux. C'est entre ces deux éléments que l'on insère la culture sur filtre perméable. Chaque compartiment est relié aux réservoirs muqueux et séreux par des tubulures de silicone ;
- les réservoirs des fluides muqueux et séreux sont en verre, et thermostatés à 37°C. L'oxygénation du filtre monté dans la chambre de Ussing et l'homogénéisation des liquides contenus dans les deux réservoirs sont assurées par bullage d'air à débit constant ;
- le circuit de mesure des paramètres électriques. Chaque chambre est reliée par des ponts électrolytiques (agar-agar 4% dans du KCl 3M) à des électrodes Ag/Cl. Les électrodes sont reliées au préamplificateur puis à l'amplificateur (*EVC 4000, World Precison instrument*) qui permet de mesurer le potentiel de membrane et d'imposer la différence de potentiel à 0

mV afin de mesurer le courant de court-circuit. Le signal de sortie est digitalisé par le système d'acquisition *Powerlab* (*Chart for windows, v4.0 ADInstrument*).

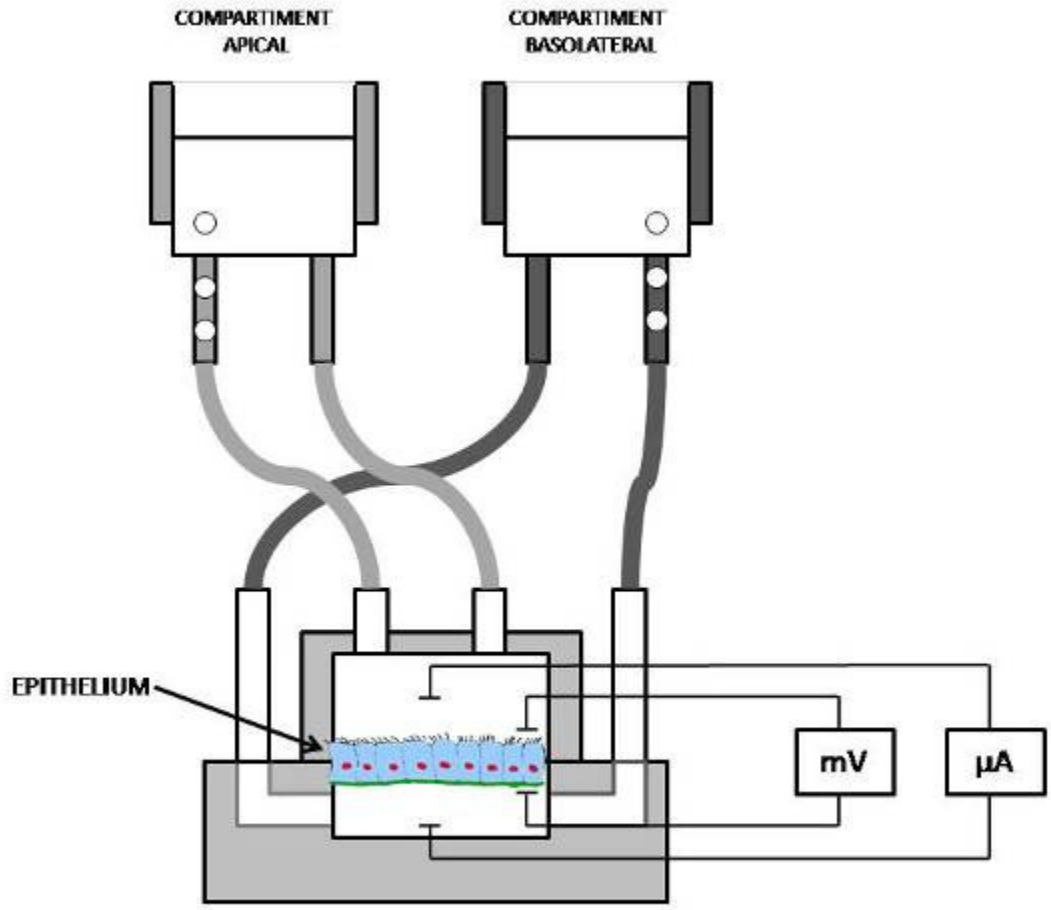

Figure 12 : Schéma des chambres d'Ussing horizontales.

III.C. Solutions et produits chimiques utilisés

Le milieu utilisé dans les compartiments apical et basolatéral est une solution saline de Krebs (140 mM NaCl, 5 mM KCL, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$ pH 7,4, 290 mOsM). Pour augmenter la sécrétion de chlore, la solution de Krebs peut être remplacée dans le compartiment apical par une solution de Krebs low chloride (125 mM Na-Gluconate, 15 mM NaCl, 5 mM KCL, 2 mM $CaCl_2$, 6 mM HEPES, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, pH 7,4, 290 mOsM).

Pour déterminer quelle est l'implication des différents canaux ioniques, nous avons utilisé des inhibiteurs de ces canaux :

- **Amiloride** : Bloqueur des canaux épithéliaux sodiques apicaux amiloride sensible. Utilisé à 100 µM.
- **DPC** : Inhibiteur non spécifique des canaux chlores apicaux, utilisation à 100 µM.
- **NPPB** : Inhibiteur non spécifique des canaux chlores apicaux, utilisation à 100 µM.
- **Glybenclamide** : Inhibiteur non spécifique des canaux chlores CFTR apicaux, utilisation à 100 µM.
- **CFTR(inh)-172** : Inhibiteur spécifique du canal chlore apical CFTR, utilisation à 10 µM.
- **BAPTA-AM** : Chélateur calcique intracellulaire, utilisation à 50 µM.
- **Forskoline** : Activateur de la sécrétion de chlore AMPc dépendante, utilisation à 10 µM.

Les différents inhibiteurs ainsi que les composants du Krebs provenaient de chez Sigma.

III.D. Protocole

Pour les expériences en chambres d'Ussing, les cellules épithéliales sont cultivées sur filtres perméables (C*ostar, snapwell-clear*, 12 mm, 0.4mm pore) et montées en chambre d'Ussing lorsque les monocouches cellulaires ont atteint une résistance électrique de 800 à 1200 Ohms (8 à 10 jours de culture).

Les deux faces de l'épithélium sont baignées dans du milieu Krebs-Henseleit pour un temps d'équilibre de 20 min à 37°C en condition d'enregistrement de courant de court-circuit. Après cette période de stabilisation, le bain apical est remplacé par du Krebs low-chlore pour créer un gradient de chlore du côté basolatéral vers la face apicale de l'épithélium.

Ensuite après 20 min de stabilisation, soit les inhibiteurs soit le LPS sont appliqués dans le bain apical.

IV. Autres techniques

IV.A. Etude des protéines secrétées du système SSTT de P. aeruginosa

IV.A.1. Isolation de protéines bactériennes secrétées

Après deux jours de culture, les cellules sont mises en co-culture avec les différentes souches de *P. aeruginosa* (CHA, CHA-D1 à la MOI 100) pendant deux heures (juste avant le début de la lyse cellulaire).

Après le temps d'incubation, les surnageants sont récupérés et centrifugés à 1,000 *g* pendant 10 min pour éliminer le culot bactérien. Les surnageants sont ensuite concentrés par ultrafiltration (Vivapore, Sartorius, Germany) à 4°C pour avoir un volume final de 100 µl. Puis les concentrats sont mélangés à des inhibiteurs de protéases : proteases inhibitor cocktail (Sigma) et congelés à -80°C.

En parallèle, les culots cellulaires étaient récupérés, mélangés avec le proteases inhibitor cocktail et congelés à -80°C.

IV.A.2. Dosage des protéines

La quantité de protéines de chaque échantillon est déterminée par la technique de Bradford. Après décongélation, 50 µl de l'échantillon sont mélangés avec 1 ml (qsp) de réactif de Bradford. Une gamme étalon est réalisée avec des solutions d'albumine bovine à 0, 10, 20, 50, 100, 200, 250 et 300 mg/ml. Après 10 min d'incubation, la Densité Optique (DO) à 595 nm est mesurée, et la concentration en protéines est calculée à partir de la courbe étalon.

IV.A.3. Migration

Après quantification de la quantité de protéines dans les échantillons par dosage de Bradford, 50 µg de protéines sont mises à migrer sur un gel de polyacrylamide sodium dodecyl (lauryl) sulfate à 12% (SDS-PAGE). Cette migration permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le gel de polyacrylamide en condition dénaturante est composé d'un « gel de concentration » placé au dessus du « gel de séparation ». La composition des gels en acrylamide varie selon la taille des protéines à séparer (Tableau 2).

Les protéines sont dénaturées dans du « loading buffer » (H_2O 355 µl, Tris-HCl pH 6,8 0.5M 125 µl, Glycérol 250 µl, SDS 10% 200 µl, Bleu de Bromophénol 1% 200µl, β-

mercaptoéthanol 50µl) puis par chauffage à 100°C pendant 5 minutes avant d'être déposées sur le gel de concentration. La migration est réalisée pendant 2 heures à voltage constant (100 V) dans le tampon d'électrophorèse (Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, H_2O 1l qsp).

Tableau 2 : Composition des gels SDS-PAGE

	Gel de concentration (5%)	Gel de séparation (12%)
Acrylamide 40%	1,24 ml	6 ml
H_2O	6,16 ml	8,8 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml	/
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	/	5 ml
SDS (10%)	100 µl	200 µl
APS (30%)	160 µl	32 µl
TEMED	8 µl	8 µl

IV.A.4. Transfert

Pour détecter spécifiquement la présence d'une protéine donnée, les protéines séparées sur le gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Le transfert des protéines se fait par la technique du « sandwich » dans lequel le gel d'acrylamide est déposé sur une membrane de nitrocellulose, le tout est placé entre des feuilles de papier Wattman imbibées de tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, Méthanol 20%, H_2O). Le « sandwich » est ensuite placé entre les deux électrodes et le transfert est réalisé pendant 2 heures sous un courant de 350 mA.

IV.A.5. Immuno-détection

Après le transfert, les membranes sont incubées avec une solution de TBS-Tween 1X (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, Tween20 0,05%, pH 7,5) contenant 3% de lait demi-écrémé pour saturer les sites non spécifiques. La membrane est ensuite lavée 3 fois dans du TBS-Tween 1X avant d'être incubée avec l'anticorps polyclonal anti *Pseudomonas aeruginosa* ExoS (Agrisera, Vännäs, Sweden) à la concentration 1/5000ème dans du TBS-Tween 1X avec 3% de lait pendant 1h30. La membrane est ensuite lavée à 3 reprises dans du TBS-Tween 1X pour éliminer l'excédent d'anticorps primaire et les liaisons non spécifiques. Puis les membranes sont exposées pendant 45 minutes avec un anticorps secondaire anti-chicken immunoglobulin G (IgG) spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire et conjugué à la

peroxydase de radis noir (Sigma). L'anticorps secondaire est dilué à la concentration de 1/10000ème dans du TBS-Tween 1X avec 3% de lait demi-écrémé.

Après rinçage, les membranes sont exposées, puis révélées avec le kit de chimiluminescence ECL Plus kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany).

IV.B. Test de cytotoxicité

Pour déterminer la capacité de cytotoxicité des différentes souches de *P. aeruginosa*, 2 x 10^4 cellules sont mises en culture dans des plaques 96 puits et incubées une nuit à 37°C.

Le lendemain, 10 µl de suspension de *P. aeruginosa* (MOI 100) sont mélangés dans du milieu non complémenté et mises en co-culture avec les cellules pendant 5 heures. La cytotoxicité des bactéries envers les cellules est évaluée par la mesure de lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture après 5 heures, avec un kit « cytotoxicity assay kit » (Cytotox 96; Promega, Charbonnières, France). La présence de cette enzyme cytosolique dans le surnageant des co-cultures reflète la perte de l'intégrité membranaire des cellules lors du processus de nécrose.

Cette méthode est basée sur la détection de l'activité LDH par un test enzymatique colorimétrique. La première étape est la réduction du NAD+ en NADH+H+ lors de la conversion du lactate en pyruvate catalysée par la LDH, puis les protons du NADH+H+ sont transférés sur le sel de tétrazolium (jaune pâle) qui est alors réduit en sel de formazan de couleur rouge.

Après le temps de co-culture, 50 µl de surnageant sont transférés dans une microplaque 96 puits à fond plat et mélangés à 50 µl de réactifs. Après un temps d'incubation de 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, la réaction est stoppée puis la DO à 490 nm de chaque puits est mesurée.

La valeur 100% représente la quantité de LDH relarguée par les cellules lysées par du Triton X-100 à 0.8% pendant 45 min (DO_{Triton}). Le relargage spontané de LDH est mesuré dans des puits ne contenant que des cellules (DO_{cell}).

Le pourcentage de cytotoxicité est obtenu selon la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{DO_{Test} - DO_{cell}}{DO_{Triton} - DO_{cell}} \text{ X100}$$

IV.C. Mesure de l'activation du SSTT

L'activation du SSTT est évaluée par bioluminescence émise par la souche CHA (pC ::*lux*). Cette souche a été modifiée par fusion du promoteur de l'opéron *exs*CEBA en amont de l'opéron *lux*CDABE. Les gènes rapporteurs ont ensuite été insérés dans le chromosome de la souche CHA au niveau du gène *attB*.

Les cellules A549 ($8x10^5$ par puits) sont mises en culture dans une plaque 6 puits et incubées toute une nuit. Le lendemain, 100 µl de la souche bioluminescente (MOI 100) sont mélangés avec du milieu frais, sans antibiotiques, et co-incubés avec les cellules pendant 5 heures. La bioluminescence est mesurée avec le système d'imagerie IVIS 50 (Xenogen, Alameda, CA). L'émission de bioluminescence est normalisée en photons par seconde. Les images sont acquises chaque heure avec un temps d'exposition d'une minute et analysées avec le logiciel Living Image 2.5 software (Xenogen, Alameda, CA).

IV.D. Bactéricidie

Les cellules A549 ($8x10^5$ par puits) sont mises en culture toute une nuit dans une plaque 6 puits. La suspension bactérienne est ajoutée à la MOI 100. Chaque heure, un prélèvement est effectué et le nombre de bactéries est évalué par dilution en série et étalement sur boîtes de Pétri. Le comptage des colonies sur les boîtes est effectué après une nuit d'incubation à 37°C.

IV.E. Adhésion bactérienne

Les cellules A549 ($8x10^5$ par puits) sont mises en culture toute une nuit dans une plaque 6 puits. La suspension bactérienne est ajoutée à la MOI 100. Après 3h d'incubation (à 37°C avec 5 % CO_2), les puits sont lavés délicatement six fois dans du PBS pour retirer les bactéries non adhérées. Puis on ajoute pendant 15 minutes 400 µL de Triton X-100 à 0,25% (v/v) dans du PBS pour décoller les bactéries associées aux cellules. Pour évaluer le nombre de bactéries adhérentes, nous effectuons des dilutions en série et un comptage après étalement sur boîtes de Pétri. L'adhésion est exprimée en nombre de bactéries (UFC) par puits.

RESULTATS

I. L'effet protecteur de l'EGTA sur la mort cellulaire induite par le SSTT de *Pseudomonas aeruginosa*

Microbial pathogenesis, en révision, Novembre 2008

Résumé

Le SSTT est le facteur de virulence majeur dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Son activation est dépendante du contact entre la bactérie et les cellules eucaryotes ainsi que de la déplétion calcique du milieu environnant. Cependant, le rôle de la concentration calcique du milieu environnant sur l'activation du SSTT est encore peu compris, et la signification physiologique de ce signal est inconnue. *In vitro,* l'expression du SSTT peut être activée par l'addition de chélateurs calciques dans le milieu de culture. D'autre part, des études ont montré que la chelation des cations divalents pouvait fragiliser les membranes externes des bactéries à Gram-négatif et accroître la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens. Ainsi, l'influence des chélateurs calciques comme l'EGTA sur la cytotoxicité induite par *P. aeruginosa* est inconnue. L'EGTA pourraient influencer la virulence de *P. aeruginosa* soit en activant le SSTT, soit en modifiant d'autres facteurs impliqués dans la pathogénicité.

Dans cette étude, notre objectif était d'évaluer les effets de l'addition de l'EGTA dans le milieu sur la mort cellulaire induite par *P. aeruginosa*, l'adhésion bactérienne, l'activation du SSTT, la translocation de la toxine ExoS et la désorganisation du cytosquelette. Pour cela, des cellules de la lignée A549 ont été mises en co-culture avec différentes souches de *P. aeruginosa* en présence ou non d'EGTA dans le milieu. Nous avons évalué l'influence de l'EGTA sur la mort cellulaire induite par *P. aeruginosa* par deux méthodes distinctes ainsi que l'influence de l'EGTA sur la croissance bactérienne, l'adhésion et l'activation transcriptionnelle du SSTT. Enfin, nous avons déterminé le rôle de l'EGTA sur l'injection d'ExoS et son effet dans la cellule eucaryote.

EGTA prevents *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung epithelial cell-death through decreased ExoS translocation.

J. Buyck[1], K. Faure[2,3], E. Kipnis[2], B. Decoster[1], R. Matran[1], B. Guery[2,3].

[1]*Département de physiologie, EA2689, IFR114 (IMPRT), Université de Lille2, Lille, France*

[2]*Laboratoire de recherche en pathologie infectieuse, EA2689, IFR114 (IMPRT), Université de Lille2, Lille, France*

[3]*Service de Gestion du Risque Infectieux et des Vigilances, CHRU Lille, Lille, France*

Corresponding author:

Pr. Benoit GUERY, EA 2689, Département de physiologie, Faculté de Médecine – Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045 LILLE CEDEX, FRANCE

Phone: +33 (0)3 20 62 34 72

Fax: +33 (0)3 20 62 69 93

E-mail: bguery@invivo.edu

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa type III secretion system (TTSS) is a major determinant of eukaryotic cell-death and virulence by translocating bacterial exotoxins (ExoS, ExoT, ExoU and ExoY) into eukaryotic cells. TTSS activation can be induced *in vitro* by contact with eukaryotic cells or in culture medium with EGTA, a calcium chelator widely used to activate TTSS expression. Paradoxically, EGTA has been shown to have antimicrobial effects. Thus, our study was designed to evaluate the effects of EGTA on cell-death, bacterial adhesion, TTSS activation, ExoS translocation and cytoskeleton disorganization. A549 cells were infected with CHA strain, producing ExoS and ExoT. EGTA protected *Pseudomonas*-induced cell-death independently of bacterial growth. Likewise, chelating properties of EGTA were not involved in this protective effect nor did EGTA decrease TTSS activation. However, our results showed that EGTA modulated actin organization leading to cell rounding and decreased bacterial adhesion resulting in a decrease of ExoS translocation into the host cells. Both EGTA and ExoS led to cytoskeletal modifications which seemed morphologically different. These cytoskeletal effects of EGTA and modulation of ExoS translocation may potentially provide the basis for the protective effect observed on A549 cells and provide new directions for research into therapeutic targets for *P. aeruginosa* lung infection.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, EGTA, cell-death, type three secretion system.

Abbreviations : BAPTA, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid ; CFU, colony forming unit; EGTA, ethylene glycol-*O*,*O'*-bis(2-aminoethyl)-*N*,*N*,*N'N'*-tetra-acetic acid; LDH, lactate dehydrogenase; TTSS, type three secretion system.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative bacillus involved in life-threatening infections including ventilator-acquired pneumonia and lung disease in cystic fibrosis [1,2]. The treatment of these infections is often difficult due to its natural resistance to a large number of antibiotics and an increasing number of strains with acquired multi-resistance [3].

Depending on environmental signals, *P. aeruginosa* can produce a large number of virulence factors; among them, the type three secretion system (TTSS) has been shown to be a major virulence determinant in acute lung infections as evidenced by cell culture studies [4], animal infection models [5] and human epidemiological studies [6,7].

The TTSS system translocates four toxins (ExoS, ExoT, ExoU and ExoY) directly into the cytoplasm of eukaryotic cells to promote pathogenicity [8]. The toxins are secreted through the bacterial injectome, a flagellar-like appendage composed of the assembly of more than 20 proteins, which protrudes from the bacterial surface and permeates the eukaryotic cell membrane through pore-forming interactions [9].

ExoU is the most cytotoxic effectors of the TTSS which acts as a phospholipase capable of inducing irreversible damage to cellular membranes through direct cytotoxicity [10,11]. ExoS and ExoT are bi-functional enzymes with a Rho GTPase N-terminal domain and an ADP-ribosyltransferase C-terminal domain [12]. The Rho GTPase activity interferes with the rearrangement of the actin cytoskeleton leading to cell rounding. The ADP-ribosyltransferase activity can disrupt the activity Ras-signaling molecules or CrkI/II signal transduction. Both of these mechanisms induce eukaryotic cell-death [13]. ExoY is an adenylate cyclase that elevates the intracellular cAMP levels in eukaryotic cells and causes cell rounding of certain cell types [14].

The entire system, including genes encoding effectors, injectome structural proteins, chaperones and regulators, is tightly regulated and dependent upon specific activating signals. Two of most potent known activation signals are contact of the bacterium with target cells and low extracellular calcium concentration in the micromolar range [15,16]. However, the role of calcium remains controversial. In fact, *in vitro,* TTSS expression can be activated by adding calcium chelators into the culture medium to the extent that this is a routine method for TTSS activation in studies of *P. aeruginosa* exotoxins [17]. Interestingly, several studies have also shown that divalent cation chelation might be able to fragilize the outer membrane of Gram-negative bacteria [18,19]. Besides, the addition of chelators like EDTA or EGTA in the culture medium increases the susceptibility of the bacteria to antimicrobial agents [20,21]. Globally these data suggest a potential relationship between calcium and virulence factors through TTSS. This was confirmed by studies which have shown a role for intracellular calcium level ($[Ca]_i$) of host epithelial cells during TTSS activation [22] although this was not confirmed in a recent study by Cisz et al. which found that host cell $[Ca]_i$ does not influence TTSS effector's secretion [23].

Therefore, our objective was to determine if addition of EGTA in host cell culture medium could modify TTSS-induced cell-death of lung epithelial cells and to study the mechanisms involved. To do so, we carried out a co-culture of lung epithelial cells with *P. aeruginosa* strains in presence or not of EGTA in the medium. We evaluated the influence of EGTA on *Pseudomonas*-induced cell-death by two distinct methods. Then, we measured the influence of EGTA on bacterial growth, adhesion and TTSS transcriptional activation. Finally, we determined the role of EGTA on ExoS toxin injection into and effect on eukaryotic cells.

2. Results

2.1. EGTA prevents Pseudomonas-induced cell-death.

Fig 1A shows the percentage of *P. aeruginosa*-induced (CHA, CHA-D1 and PA103) cell-death over time using fluorescence microscopy. Cell-death of non-infected cells (CTL) remained steady over time with only 2.56 ± 0.61% at 5 h. Infection with the CHA strain, a clinical isolate which produces ExoS, ExoT and ExoY, increased cell-death beginning from 3 h to reach 82.87 ± 1.59% (Fig 1A and 1B). Addition of EGTA (5 mM) completely protected the CHA-induced cell-death at 5 h. Cell-death due to the CHA-D1 strain, the isogenic mutant of CHA not expressing the TTSS, was significantly lower compared to CHA-related cell-death at 5 h and was not significantly further decreased by adding EGTA. Experiments with PA103 led to comparable results which were thus not strain-specific.

These results were confirmed by measuring cytotoxicity through LDH. Cytotoxicity was measured at 83.3% with CHA, 29.5% with CHA-D1 and 100% with PA103 in the medium without EGTA (- EGTA). Addition of EGTA (+ EGTA) was associated with a significant decrease of LDH release with CHA (14%) and PA103 (47.3%), but did not reach statistical significance for CHA-D1 (18.6%) (Table 2).

2.2. Effects of divalent magnesium and calcium cations on the protective effect of EGTA

Most properties of EGTA and other chelators are generally attributed to cation chelation and inhibited by addition of exogenous divalent cations such as Mg^{2+} and Ca^{2+} [19]. The extracellular calcium concentration ($[Ca]_e$) was measured to verify that 5 mM of EGTA added in the DMEM reduces $[Ca]_e$ to zero (Data not shown). To test if the protective effect of EGTA was dependent on divalent cation chelation, we first supplemented with $MgCl_2$ (20 mM) the

DMEM containing EGTA and measured the consequent CHA-induced cell-death. Addition of $MgCl_2$ did not alter protective effects of EGTA (Fig. 2A, column 4). The experiments were then repeated in calcium-free DMEM. The co-cultures with CHA strain induced a percentage of cell-death of 79.21 ± 2.83% comparable to that obtained in normal DMEM without EGTA. Addition of EGTA in calcium-free DMEM still protected cells from CHA-induced cytotoxicity (Fig. 2B). These results demonstrate that the protective effect of EGTA is independent of its properties of magnesium chelating properties. Furthermore, calcium-free DMEM experiments demonstrate that calcium plays only a minor role in the protective effect of EGTA because we did not observe any difference with the standard DMEM.

2.3. Bacterial growth is not affected by EGTA

To rule out a bactericidal or bacteriostatic effect of EGTA, we evaluated the viability of the CHA strain exposed to EGTA, with identical experimental conditions. We did not observe any decreased bacterial viability in presence of EGTA compared to culture without EGTA. Moreover, in these conditions, growth curves were similar (Fig. 3).

2.4. EGTA decreases adhesion of bacteria

One of the possible hypothesis for a protective effect of EGTA might be inhibition of *P. aeruginosa* adhesion to eukaryotic cells [24]. We therefore quantified A549-adherent bacteria (CHA strain) in presence or absence of EGTA (Fig. 4). After 3 h of co-culture with EGTA, a significant 32.5% decrease in bacterial adhesion was observed compared to co-culture without EGTA (respectively 7.2×10^6 CFU/well vs. 10×10^6 CFU/well). However at time zero, the number of bacteria in the co-culture was 10^8 CFU/well. Thus after 3 h of co-culture, the

number of adherent bacteria (10^7 CFU/well) was relatively low compared to the number of non-adherent bacteria in co-culture with the cells (9 x 10^7 CFU/well).

2.5. EGTA does not modulate the TTSS transcriptional activation induced by bacterial contact with eukaryotic cells

The CHA (pC::*lux*) strain was cultured in DMEM without cells and without EGTA (5 mM), in this condition, TTSS transcription was not activated. When DMEM without cells with EGTA was used, TTSS transcriptional activation starts to increase after 3 h of co-culture (Fig. 5, dotted line) and was significantly increased only at 5 h. When the CHA (pC::*lux*) strain was co–cultured with A549 cells, TTSS transcriptional activation started to increase after 3 h and was significantly increased from the fourth hour. With the addition of EGTA in the medium, we did not observe any difference between the two groups (Fig. 4, solid line). Moreover, although EGTA induces a significant transcriptional TTSS activation in the bacterial culture, the level of activation was significantly lower than the co-cultures of bacteria with A549 cells (5.80 ± 0.63 x 10^9 photons/sec vs. 2.56 ± 0.29 x 10^9 photons/sec). These results demonstrate that although EGTA is an efficient signal to TTSS transcriptional activation *in vitro*, the contact with host cells is a probably a more effective trigger than calcium depletion.

2.6. EGTA decreases host cell cytoplasm levels of ExoS

Another possible hypothesis for the protective effect of EGTA protective effect could be related to an alteration of cytotoxin translocation into the host cells. We performed a western

blotting of concentrated supernatant and pellets of A549 cell co-cultured with CHA and CHA-D1 strains for 3 h to detect the presence of ExoS.

As expected, no ExoS was detected in cell supernatant and cell lysates with the TTSS-inactivated mutant CHA-D1 control (Fig. 6 A, B and C lane 1 and 2). The analysis of cell supernatants co-cultured with CHA showed a small amount of ExoS under EGTA conditions and without EGTA (Fig. 6 B lane 3 and 4). On the contrary, the analysis of cell lysates infected with CHA showed that ExoS cytotoxin was considerably decreased intracellularly in EGTA conditions compared to EGTA-free medium (Fig. 6 C lane 3 and 4).

2.7. EGTA induces cytoskeleton reorganization

To study the effects of ExoS in our model, we carried out an actin staining to observe cytoskeleton organization, known to be altered by the effects of ExoS. Non-infected cells present a well-distinguished actin stress fibres network and a well-organized cell shape (Fig. 7 A), we clearly observed a circumferential repartition of actin stress fibres. As previously described, EGTA in medium of non-infected cells was also associated with change in cell shape, and in the organization of cytoskeleton [25] (Fig. 7 B). However, the cells were more rounded than ExoS and lamellipode-like cytoplasmic extensions were not observed. Moreover, we did not distinguish actin stress fibres and actin staining was diffuse in the entire cytoplasm. CHA infection induced cell rounding, disorganization of actin and tubulin cytoskeleton with a poorly distinguishable actin stress fibres (Fig. 7 C). Furthermore, the edges of the cells were not marked and the actin staining was concentrated around the nucleus. Finally, the cells also presented some lamellipode-like cytoplasmic extensions.

Finally, the addition of EGTA with CHA strain induced cytoskeleton disorganization but these effects did not seem additive nor synergic (Fig. 7 D). We observed an intermediate

effect with some cells showing lamellipode-like cytoplasmic extensions and some cells completely rounded. Similarly, the actin staining showed that some cells had a diffuse cytoplasmic staining while others a concentrated actin staining around the nucleus.

These results suggest that the modifications induced by EGTA and ExoS are not the same nor do they potentialize each other. These results indicated that both EGTA and ExoS disorganize the actin and tubulin cytoskeleton albeit probably differently.

9

3. Discussion

Pseudomonas aeruginosa is a pathogen characterized by a large number of virulence factors. Among those, the type three secretion system has been shown to be a major factor involved in lung injury. Although the regulation of this system is complex involving several regulatory loops, two factors are known to be capable *in vitro* to stimulate TTSS products secretion: calcium depletion and cell contact. Focusing on the first stimulus, EGTA, a well known calcium chelator, is commonly used in culture medium to decrease extracellular calcium concentration in the micromolar range to activate TTSS *in vitro*. However, several studies have also shown that the addition of chelators in the culture medium increases the susceptibility of the bacteria to antimicrobial agents and fragilize the outer membrane of Gram-negative bacteria. Therefore, our objective was to determine if addition of EGTA in host cell culture medium could modify TTSS-induced cell-death of lung epithelial cells and the mechanisms involved. We demonstrated that EGTA had a protective role on *Pseudomonas*-induced cell-death. EGTA was not responsible for bactericidal effect nor inhibition of TTSS transcriptional activation. However EGTA induces a decrease in bacterial adhesion and ExoS injection into the epithelial cells.

3.1. EGTA effects on Pseudomonas-induced cell-death

The results of our study demonstrate that addition of EGTA in medium of the co-cultured *P. aeruginosa* with A549 cells protects against cell-death as assessed by two distinct methods. We used both a laboratory strain, PA103, known to induce rapid and massive TTSS-dependent cell-death [10], and a clinical strain isolated from a CF patient, CHA, which expresses TTSS and secretes ExoS, ExoT and ExoY under inducing conditions [26]. Both strains were responsible for high cell-death after 5 h of infection, as already reported [27].

CHA-related cytotoxicity was predominantly dependent on TTSS since CHA-D1, its TTSS inactivated mutant, induced only 16.84 ± 1.82% of cell-death [28]. Our main finding is that the addition of EGTA to culture medium protected cell-death induced by PA103 and CHA although it is a known activator of the main determinant of *P. aeruginosa* pathogenicity, the TTSS. Results with CHA-D1 were not significant since the baseline percentage of cell-death was low.

These results are discordant with previous studies. Rajan et al. demonstrated that EGTA increased 16HBE cell apoptosis induced by *P. aeruginosa* [29]. Fleiszig et al. showed that EGTA treatment of airways epithelia increased susceptibility to *P. aeruginosa* cytotoxicity [30]. However, in the study by Rajan, EGTA used a low concentration (50 μM) and in Fleiszig's study, bacteria were not directly in contact with EGTA, which was also used at different concentrations and time points. Our confluent non-polarized monolayer cellular model may also explain these discrepancies. Indeed, cell polarity contributes to defense against bacteria and EGTA has been shown to increase *P. aeruginosa* cytotoxicity through depolarization [29,30]. On the one hand, it has been previously noted that confluent non-polarized cells, such as the ones we used, appeared to be less susceptible to *P. aeruginosa* cytotoxicity [30]. On the other hand, previous works with different model have noted opposite effect of EGTA treatment, EGTA inhibited the invasion of *Listeria monocytogenes* on 2-days old monolayer of epithelial cells grown on plastic support [31]. Furthermore, another study showed that EDTA did not elicit an additional *P. aeruginosa* invasion into 16HBE cell model [32], and EGTA treatment did not increase the cytotoxicity of PAO1 on Human tracheal cells [33]. Thus, it appears that the *P. aeruginosa* cytotoxicity and the effect of EGTA on epithelial cells may vary widely according to the cell model. The conditions leading to beneficial, albeit non-protective, effect of EGTA in the abovementioned studies were similar to ours: 1-2 days culture, plastic grown support and confluent non-polarized monolayer cellular model.

Additionally, we also verified that the cell line type did not account for discrepancies since experiments with 16HBE14o- cell line showed similar results to A549 (data not shown).

3.2. Effects of divalent magnesium and calcium cations on protective effect of EGTA

Most properties of EGTA and others chelators are generally attributed to cation chelation and are inhibited by addition of exogenous divalent cations [19]. We first verified that 5 mM of EGTA added in the medium reduces $[Ca]_e$ to zero (data not shown). In our case, the addition of 20 mM of $MgCl_2$ did not inhibit the preventive effect of EGTA. These results suggest that extracellular magnesium chelation did not play any role. Secondly, by using a calcium-free medium, we observed comparable *Pseudomonas*-induced cell-death compared to calcium containing medium. Thus, the decrease of $[Ca]_e$ by using calcium-free DMEM is not a relevant factor in our model of *Pseudomonas*-induced cell-death. This result is compatible with previous works which demonstrate that the TTSS activation by host cell contact or low calcium and subsequent TTSS-induced cytotoxicity could take different pathways. It has been suggested that in mammal's cells, the host cell contact could bypass the requirement of low-calcium conditions to activate TTSS [15].

Moreover, it seems that in our study the effect of EGTA on cell-death protection was not only calcium chelation dependent. Indeed, EGTA had the same protective effect on cell-death in the calcium-free medium. It is consistent with previous studies that report parallel effect of chelators. EGTA is reported to have a dose dependent disorganizing effect on cell culture compared to free calcium medium [34] including another effect than calcium chelation only. Other studies demonstrated that EGTA and BAPTA have calcium-independent effect on chloride secretion or cytoskeleton disorganization [35,36]. Therefore, we can not exclude that

the EGTA protects the *Pseudomonas*-induced cell-death by other effects than calcium chelation.

3.3. Effects of EGTA on bacterial growth, survival and adhesion

EDTA or EGTA, when added in the medium, have been reported to cause many deleterious effects on Gram negative bacteria, including lipopolysaccharide disorganization, disruption of biofilm, increased outer membrane permeability, greater susceptibility to antibiotics [19,20,37]. In our experimental conditions, 5 mM of EGTA was not responsible for bactericidal or bacteriostatic effect over a 5 h time period. Therefore the protective effects of EGTA cannot be attributed to any direct antimicrobial activity.

The TTSS-induced cytotoxicity towards host cells is highly dependent upon the adherence of the bacteria [38]. We have shown that 5 mM of EGTA decreased the *P. aeruginosa* adhesion on A549 cells by 32.5%. Interestingly, our results are consistent with previous studies on Caco-2 cells which showed that EGTA treatment could inhibit *Listeria monocytogenes* binding by 25% [31]. Although the decrease of adhesion is significant, the number of adherent bacteria after the incubation period (10^7 CFU/well) was relatively low compared to the total number of bacteria in co-culture with the cells at time zero (10^8 CFU/well). Thus, it represents only about 10% of adherent bacteria. This observation is consistent with previous studies of adhesion of PAK strain on A549 cells, these studies have found a range of 2 to 6 bacteria per cells at 1 h to 16 bacteria per cells at 3 h of co-cultures [39,40]. However these studies underline that bacterial adhesion is highly dependent of several factors: temperature, time, number of bacteria and cells, presence of receptor, structure of different adhesins. Likewise, *P. aeruginosa* adheres to the cells via different adhesins including LPS, lectins and pili. These adhesions factors are susceptible to EGTA

effects [19]. Additionally, we observed a rapid cell rounding after the addition of EGTA which has also been reported in previous studies [35,41]. This alteration in cell morphology may lead to a decrease in cell surface available for bacterial adhesion and, in part, explain some of the protective effects of EGTA by decreasing *P. aeruginosa* adherence and translocation.

3.4. EGTA and TTSS transcriptional activation

As described previously, cytotoxicity of *P. aeruginosa* is mainly related to TTSS function and its capacity for toxins secretion and translocation [4]. Our results with the CHA (pC*::lux*) strain show an increase of the activation of the TTSS transcriptional activator *exsA* (Fig. 5) in parallel to the start of the cell-death (Fig. 1A). Indeed, *exsA* activation was significantly increased in CHA (pC*::lux*) from 4 h on while cell-death in the CHA group significantly increased at 4 h. These results suggest that in our study cell-death was a probable consequence of TTSS activation. In these conditions, addition of EGTA in the medium did not modulate the activation of *exsA* although EGTA is a widely recognized TTSS activator [42]. However, EGTA was not the only TTSS activator in our study since we used pathogen-eukaryotic cell co-culture. Indeed, previous studies noted that bacterial contact with eukaryotic cells is probably a more potent activating signal than *in vitro* environmental conditions [15]. Therefore, in our study, EGTA-induced calcium depletion activates the transcription of TTSS of CHA (pC*::lux*) strain when the bacteria were alone in the medium as consistent with previous work [43] whereas in co-cultures with A549 cells, EGTA addition did not increase the TTSS activation significantly in spite of the effect of EGTA on chelation of $[Ca]_c$ (Fig. 5).

The absence of a detectable effect of EGTA on TTSS activation in our study may have been due to the signal being "drowned" in the activation due to cell contact. However, in spite of the difference of adhesion with EGTA, we did not observed a decrease in TTSS activation in presence of EGTA with the CHA (pC*::lux*). This identical TTSS activation through cell contact with or without EGTA is not contradictory with the subsequent decreased adhesion of *P. aeruginosa* due to EGTA. Indeed, we noted that the number of adherent bacteria after 3 hours of co-culture represented only about 10% of the total number of bacteria. Despite the low number adherent bacteria, we measured a high activation of TTSS. However, in this case, we were measuring the *total* number of bacteria in the medium, *both adherent and non-adherent*. It means that a low number of adherent bacteria were highly activating TTSS whereas a majority of non-adherent bacteria were not. Thus, the EGTA-induced difference in adhesion concerning these few bacteria was not sufficient to lead to a detectable difference in TTSS activation measured throughout the total bacterial population.

Although EGTA did not alter TTSS transcriptional activation in presence of cells, it may have modified the translocation or the injection of TTSS toxins into the host cell cytoplasm. Indeed, western blot revealed that the addition of EGTA in medium reduced ExoS toxins detected in the host cells. However, EGTA did not change the secretion of ExoS in the supernatant indicating that EGTA probably decreased ExoS translocation into the cells through the TTSS injectome. One mechanism through which EGTA may have led to different ExoS translocation is through decreased bacterial adhesion because intoxication of eukaryotic cells by ExoS is postulated to occur by a contact-dependent TTSS. Thus, the decrease of bacterial adhesion may be sufficient to decrease ExoS in the cytoplasm of the host cells and consequently protect the cells to death. Nevertheless, the presence of ExoS secreted in the supernatant was not significantly higher when EGTA is added in the medium indicating that even if EGTA chelates the $[Ca]_e$, ExoS secretion is not enhanced in our co-culture model. We

interpret these results as suggesting that the chelation of calcium alone is not capable to induce a secretion of ExoS in a supernatant. In fact, in this study, we used a cell culture medium without foetal calf serum for experiments which may explain this finding. Indeed, a a previous study suggesting that presence of serum in addition to calcium depletion in medium is necessary to activation of type III secretory activity. Furthermore, Vallis et al. suggest that TTSS induction of secretion by calcium chelators or by growth in presence of cells or serum may be due to different induction mechanisms [16].

Studies of the activities of ExoS and ExoT have shown that these effectors induce actin cytoskeleton rearrangements. Indeed, ExoS targets Rho GTPases directly through the GAP domain [13]. The Rho GTPases are critical for actin polymerization and provoke visible morphological changes in eukaryotic cells including cell rounding [44]. Therefore, CHA strain provoked morphological changes in the HeLa epithelial cell line [45]. Similarly to these studies, we have shown that CHA strain induces a disorganization of the host cell actin cytoskeleton. CHA strain elicited the rounding of A549 cells. The infected cells present a generalized disruption of actin with an accumulation of phalloidin-stained material around the periphery of the nucleus. This effect of CHA is probably due to the expression of ExoS since CHA-D1, the non-secreting mutant, did not induce this morphological change (data not shown). Besides $[Ca]_e$ chelation by EGTA has been shown to cause a disruption of tight junctions, cell rounding and changes in the organization of cytoskeleton [41] which may result to a destabilization of epithelial cell barrier. Similarly, we observed that EGTA induced a morphological change of cells and caused cell rounding. Moreover, the addition of EGTA and CHA strain together were neither synergic nor additive probably due to different mechanisms. Although addition of EGTA and infection by *Pseudomonas* both led to a drastically disorganizing effect on lung epithelial cell cytoskeleton, since EGTA was also protective, we cannot exclude that EGTA interferes with the effects of ExoS. Moreover,

previous studies have shown that strains expressing ExoS could induce morphological changes without causing significant cell-death [8,46,47]. As seen in our results, the ExoS translocation into the host cell cytoplasm was reduced in presence of EGTA. This reduced amount of ExoS translocated into the cells might be sufficient to induce cell rounding all the while insufficient to induce cell.

Conclusions

We have shown that EGTA protects lung epithelial cells from *P. aeruginosa*-induced, TTSS-mediated cell-death through a decrease in ExoS translocation into the cells. One common target of both EGTA and ExoS seems to be the cytoskeleton which is altered in both cases leading to cell-rounding. However the specific attributes of the induced cytoskeletal modifications appear different in each case which may indicate that pathways leading to cytoskleletal modifications may be involved in mediating the protective effects of EGTA just as they mediate the cytotoxic effects of ExoS. Further studies in this direction are warranted in order to determine the exact mechanisms through which EGTA modulates ExoS translocation in order to elucidate potential therapeutic targets for *P. aeruginosa* lung infection.

4. Materials and methods

4.1. Cell culture

Human alveolar carcinoma A549 cell line, kindly provided by Dr. P. Gosset (INSERM U774, Lille, France), was grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) - GlutaMAX®-I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Dutscher, Brumath, France) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at 5% CO_2 atmosphere at 37°C. A549 cells were grown to monolayer confluence in a 75 mL culture flask. For experiments, cells were rinsed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), trypsinated and seeded onto tissue culture plates (6-well, 96-well or 8-well glass slide depending on experiments) in fresh culture medium. The number of cells was determined by counting in Malassez cell.

4.2. Preparation of bacterial strains and co-culture

P. aeruginosa strains used for this study are summarized in Table 1. CHA, CHA-D1 and CHA (pC*::lux*) strains were kindly provided by Pr. B. Polack (GREPI, MENRT EA 2938, Grenoble, France). The strains were maintained in 10% (v/v) glycerol stocks at -80°C. Before experiments, strains were grown overnight in 5 mL of Luria-Bertani broth (Biomerieux Laboratories, Lyon, France) at 37°C under agitation. The following day, cultures were centrifuged at 1,000 x *g* for 10 min, bacterial pellets were washed twice in PBS, resuspended and diluted to 10^9 CFU/mL, as evaluated by spectrophotometry (OD_{600} = 0.55). Bacterial concentration was confirmed by serial dilutions and viable colony counting on BCP agar plates (Biomerieux Laboratories, Lyon, France). For all experiments, *P. aeruginosa* was

added to the cells at the ratio 100:1 (Multiplicity of Infection: MOI 100) in fresh DMEM without antibiotics or foetal calf serum.

4.3. Pseudomonas-induced cell-death

Pseudomonas-induced cell-death was assessed using through fluorescence microscopy with the LIVE/DEAD® Cell Viability/cytotoxicity kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). The kit is composed of two dyes: calcein AM which penetrates into cells with intact membranes and intracellularly hydrolyze to a green fluorescent product, and ethidium homodimer-1, a high affinity nucleic acid red stain which penetrates only into cells with damaged membranes. Cells were cultured two days in 6-well plate at 8 x 10^5 cells per well. At cell confluence, culture medium was removed and cells were incubated with 2 µL of ethidium homodimer-1 and 1 µL of 1 : 10 Calcein AM in 1 mL of fresh culture medium without antibiotics for 45 min at 37°C in the dark. The plate was placed on a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E800, Champigny sur Marne, France) equipped with a CCD video camera (Coolsnap Fx; Roper Scientific, Evry, France). At t0, *P. aeruginosa* was added to the cells for 5 h. Using Metamorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA), images were acquired every hour during 5 h. At each time point, green fluorescence images corresponding to Calcein AM (λ_{ex} : 480 nm, λ_{em} : 500 nm) and red fluorescence images corresponding to ethidium homodimer-1 (λ_{ex} : 490 nm, λ_{em} : 635 nm) were recorded at x 10 magnification.

Five fields of fluorescent cells (about 1000 cells) were counted to assess *Pseudomonas*-induced cell-death: Cell-death (%) = $(n_{red\ fluo} / (n_{green\ fluo} + n_{red\ fluo})) \times 100$

4.4. *Pseudomonas aeruginosa cytotoxicity*

A number of 2 x 10^4 cells per well were transferred to 96-well tissue culture plates and incubated overnight. The following day, each *P. aeruginosa* strain added to the cells for 5 h. Cytotoxicity was quantitated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) in the culture supernatants at 5 h, using a cytotoxicity assay kit (Cytotox 96; Promega, Charbonnières, France). The 100% value represented the amount of LDH released from cells lysed by 0.8% Triton X-100 for 45 min. Control wells lacking bacteria were used to calculate the background level of LDH release (normalized to 0%). Cytotoxicity was calculated as follows as a percentage: Cytotoxicity (%) = $((OD_{assay}-OD_{cells})/(OD_{triton}-OD_{cells})) \times 100$

4.5. Bacterial adhesion assays

A549 cells were cultured at 8 x 10^5 cells per well on 6-well tissue culture plates. Bacterial suspension was added. After 3 h of co-culture, supernatants were removed and the cells were gently washed six times with PBS to eliminate non adherent bacteria. Cells were lysed with 400 µL of 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS for 15 min. To quantify the number of cell-associated bacteria, dilutions of the lysates were harvested on BCP overnight at 37°C to quantify adherent bacteria. Bacterial adhesion was expressed in CFU per well.

4.6. Bioluminescence assays

Activation of the TTSS was studied by bioluminescence with the CHA (pC*::lux*) strain. This strain was constructed by a *lux* fusion with *exsC* promoter integrated at the *attB* site of the CHA chromosome [43]. A549 cells were cultured two days in 6-well plate at 8 x 10^5 cells per well. At cell confluence, CHA (pC*::lux*) was applied to the cells for 5 h. Bioluminescence was measured with an IVIS 50 imaging system (Xenogen, Alameda, CA) and images were

acquired each hour using 1 min exposure time. Bioluminescence emission was analyzed using Living Image 2.5 software (Xenogen, Alameda, CA) and normalized to photons per second (p s^{-1}).

4.7. Western Blot analysis of ExoS

As previously described, CHA and CHA-D1 strains were applied to the cells for 3 h. Supernatants were collected, centrifuged at 1,000 x *g* for 10 min and concentrated by ultrafiltration (Vivaporc, Sartorius, Germany) at 4°C to reach about 100 µL, a protease inhibitor cocktail (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) was added and supernatants were frozen at -80°C. At the same time, cells pellets were collected, ground, mixed with proteases inhibitor cocktail and frozen at -80°C. Fifty micrograms of concentrated supernatant protein or intracellular fraction protein of epithelial cells were run on a 12% SDS-PAGE. Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes for immunoblot analysis performed with a chicken polyclonal *P. aeruginosa* ExoS antibody (Agrisera, Vännäs, Sweden). Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-chicken immunoglobulin G (IgG) secondary antibody (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Membranes were then washed, and bound antibodies were detected by the use of ECL Plus kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany).

4.8. Cytoskeleton structure analysis

Cells were cultured in 8-well glass slide (BD-Falcon, Erembodegem, Belgium) at 10^4 cells/well for 2 days. After the coculture with CHA or CHA-D1 strains for 2 h, cells were fixed in cold 4% paraformaldehyde PBS solution for 30 min at room temperature. After

washing with PBS, permeabilization was performed in 0.25% Triton X-100 in PBS for 10 min. After washing, non-specific binding sites were blocked in PBS containing 2% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Actin was directly stained with AlexaFluor 568®-phalloïdin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Samples were then mounted using Vectashield mounting medium and viewed with a fluorescent confocal microscope (LEICA TCS NT, Gennevilliers, France).

4.9. Statistical analysis

Data were analyzed with the Kruskal-Wallis and the Wilcoxon tests where appropriate. p values of < 0.05 were regarded as statistically significant, using GraphPad Prism 5.0 software was used (GraphPad Software INC., San Diego, USA).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. P. Gosset for the cell culture and cytoskeleton staining support and Dr. X. Marechal for their assistance with fluorescence experiments. This work was funded by the Université de Lille 2 and Région Nord Pas-de-Calais.

References

[1] Arama, S. S., V. Arama, A. S. Cercel, D. A. Ion, A. Hristea, and M. Sotcan. [Physiopathology of cystic fibrosis and of infections associated to this disease]. Pneumologia. 2007; 56:202-207.

[2] Chastre, J. and J. Y. Fagon. Ventilator-associated pneumonia. Am. J. Respir. Crit Care Med. 2002; 165:867-903.

[3] Siegel, R. E. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. Respir. Care 2008; 53:471-479.

[4] Sawa, T., M. Ohara, K. Kurahashi, S. S. Twining, D. W. Frank, D. B. Doroques, T. Long, M. A. Gropper, and J. P. Wiener-Kronish. *In vitro* cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. Infect. Immun. 1998; 66:3242-3249.

[5] Shaver, C. M. and A. R. Hauser. Interactions between effector proteins of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system do not significantly affect several measures of disease severity in mammals. Microbiology 2006; 152:143-152.

[6] Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank, and J. P. Wiener-Kronish. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. J. Infect. Dis. 2001; 183:1767-1774.

[7] Hauser, A. R., E. Cobb, M. Bodi, D. Mariscal, J. Valles, J. N. Engel, and J. Rello. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med. 2002; 30:521-528.

[8] Vallis, A. J., V. Finck-Barbancon, T. L. Yahr, and D. W. Frank. Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. Infect. Immun. 1999; 67:2040-2044.

[9] Yahr, T. L. and M. C. Wolfgang. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Mol. Microbiol. 2006; 62:631-640.

[10] Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller, and D. W. Frank. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol. Microbiol. 1997; 25:547-557.

[11] Sato, H. and D. W. Frank. ExoU is a potent intracellular phospholipase. Mol. Microbiol. 2004; 53:1279-1290.

[12] Barbieri, J. T. and J. Sun. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. 2004; 152:79-92.

[13] Henriksson, M. L., C. Sundin, A. L. Jansson, A. Forsberg, R. H. Palmer, and B. Hallberg. Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases *in vivo*. Biochem. J. 2002; 367:617-628.

[14] Cowell, B. A., D. J. Evans, and S. M. Fleiszig. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 250:71-76.

[15] Dasgupta, N., A. Ashare, G. W. Hunninghake, and T. L. Yahr. Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca2+ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. Infect. Immun. 2006; 74:3334-3341.

[16] Vallis, A. J., T. L. Yahr, J. T. Barbieri, and D. W. Frank. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. Infect. Immun. 1999; 67:914-920.

[17] Iglewski, B. H., J. Sadoff, M. J. Bjorn, and E. S. Maxwell. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1978; 75:3211-3215.

[18] Alakomi, H. L., A. Paananen, M. L. Suihko, I. M. Helander, and M. Saarela. Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72:4695-4703.

[19] Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. 1992; 56:395-411.

[20] Kwon, D. H. and C. D. Lu. Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50:1623-1627.

[21] Turakhia, M. H., K. E. Cooksey, and W. G. Characklis. Influence of a Calcium-Specific Chelant on Biofilm Removal. Appl. Environ. Microbiol. 1983; 46:1236-1238.

[22] Jacob, T., R. J. Lee, J. N. Engel, and T. E. Machen. Modulation of cytosolic Ca(2+) concentration in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2002; 70:6399-6408.

[23] Cisz, M., P. C. Lee, and A. Rietsch. ExoS controls the cell contact mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2007.

[24] Apodaca, G., M. Bomsel, R. Lindstedt, J. Engel, D. Frank, K. E. Mostov, and J. Wiener-Kronish. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylation-defective host cells are resistant to bacterial killing. Infect. Immun. 1995; 63:1541-1551.

[25] Badley, R. A., A. Woods, L. Carruthers, and D. A. Rees. Cytoskeleton changes in fibroblast adhesion and detachment. J. Cell Sci. 1980; 43:379-390.

[26] Toussaint, B., I. Delic-Attree, and P. M. Vignais. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; 196:416-421.

[27] Ader, F., R. Le Berre, K. Faure, P. Gosset, O. Epaulard, B. Toussaint, B. Polack, E. Nowak, N. B. Viget, E. Kipnis, and B. P. Guery. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. Infect. Immun. 2005; 73:4263-4271.

[28] Dacheux, D., I. Attree, C. Schneider, and B. Toussaint. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. Infect. Immun. 1999; 67:6164-6167.

[29] Rajan, S., G. Cacalano, R. Bryan, A. J. Ratner, C. U. Sontich, A. van Heerckeren, P. Davis, and A. Prince. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000; 23:304-312.

[30] Fleiszig, S. M., D. J. Evans, N. Do, V. Vallas, S. Shin, and K. E. Mostov. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. Infect. Immun. 1997; 65:2861-2867.

[31] Gaillard, J. L. and B. B. Finlay. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. Infect. Immun. 1996; 64:1299-1308.

[32] Plotkowski, M. C., S. de Bentzmann, S. H. Pereira, J. M. Zahm, O. Bajolet-Laudinat, P. Roger, and E. Puchelle. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999; 20:880-890.

[33] Kube, D. M., D. Fletcher, and P. B. Davis. Relation of exaggerated cytokine responses of CF airway epithelial cells to PAO1 adherence. Respir. Res. 2005; 6:69.

[34] Bilello, J. P., E. E. Cable, R. L. Myers, and H. C. Isom. Role of paracellular junction complexes in baculovirus-mediated gene transfer to nondividing rat hepatocytes. Gene Ther. 2003; 10:733-749.

[35] Saoudi, Y., B. Rousseau, J. Doussiere, S. Charrasse, C. Gauthier-Rouviere, N. Morin, C. Sautet-Laugier, E. Denarier, R. Scaife, C. Mioskowski, and D. Job. Calcium-independent cytoskeleton disassembly induced by BAPTA. Eur. J. Biochem. 2004; 271:3255-3264.

[36] Sabanov, V. and J. Nedergaard. Ca(2+) -independent effects of BAPTA and EGTA on single-channel Cl(-) currents in brown adipocytes. Biochim. Biophys. Acta 2007; 1768:2714-2725.

[37] Banin, E., K. M. Brady, and E. P. Greenberg. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72:2064-2069.

[38] Kang, P. J., A. R. Hauser, G. Apodaca, S. M. Fleiszig, J. Wiener-Kronish, K. Mostov, and J. N. Engel. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. Mol. Microbiol. 1997; 24:1249-1262.

[39] Hambrook, J., R. Titball, and C. Lindsay. The interaction of *Pseudomonas aeruginosa* PAK with human and animal respiratory tract cell lines. FEMS Microbiol. Lett. 2004; 238:49-55.

[40] Chi, E., T. Mehl, D. Nunn, and S. Lory. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. Infect. Immun. 1991; 59:822-828.

[41] Mermelstein, C. S., M. I. Rebello, L. M. Amaral, and M. L. Costa. Changes in cell shape, cytoskeletal proteins and adhesion sites of cultured cells after extracellular Ca2+ chelation. Braz. J. Med. Biol. Res. 2003; 36:1111-1116.

[42] Dacheux, D., O. Epaulard, A. de Groot, B. Guery, R. Leberre, I. Attree, B. Polack, and B. Toussaint. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase aceAB operon. Infect. Immun. 2002; 70:3973-3977.

[43] Shen, D. K., D. Filopon, L. Kuhn, B. Polack, and B. Toussaint. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2006; 74:1121-1129.

[44] Sun, J. and J. T. Barbieri. ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. J. Biol. Chem. 2004; 279:42936-42944.

[45] Hauser, A. R. and J. N. Engel. *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. Infect. Immun. 1999; 67:5530-5537.

[46] Coburn, J. and D. W. Frank. Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Infect. Immun. 1999; 67:3151-3154.

[47] Dacheux, D., B. Toussaint, M. Richard, G. Brochier, J. Croize, and I. Attree. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. Infect. Immun. 2000; 68:2916-2924.

Legends:

Fig 1. Percentage of dead cells co-incubated with *Pseudomonas aeruginosa* strains. **A.** Time-dependent percentage of dead cells without bacteria (CTL) or co-cultured with CHA, CHA-D1 and PA103 strains in the medium. Data are means ± SEM (n = 6; *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ statistically different from the control); **B.** Percentage of dead cells after 5 h of co-culture with CHA, CHAD1 and PA103 strains without (-EGTA) or with (+EGTA) in the medium. Data are means ± SEM (n = 9; *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, statistically different from the control; + $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$ statistically different from the - EGTA group).

Fig 2. Effect of divalent cation chelation on protective effect of EGTA. **A.** Percentage of dead cells without bacteria (CTL), or co-cultured with CHA strain, with CHA + EGTA, CHA + EGTA + $MgCl_2$ (20 mM) in the medium. (n = 6; ***: $p < 0.001$ statistically different from the control; +++: $p < 0.001$ statistically different from the CHA without EGTA group); **B.** Percentage of dead cells without bacteria (CTL), or co-cultured with CHA strain, with CHA + EGTA in calcium-free medium. Data are means ± SEM (n = 6; ***: $p < 0.001$ statistically different from the control; +++: $p < 0.001$ statistically different from the CHA without EGTA group).

Fig 3. Effect of EGTA on bacterial growth. The curve represents viable bacterial counting during the time with (+ EGTA group) or without (- EGTA group) EGTA in the medium. Data are means ± SEM (n = 6).

Fig 4. Effect of EGTA on bacterial adhesion. The graph represents adherent bacteria after 3 h of co-culture with the cells with (+ EGTA) or without EGTA (- EGTA) in the medium. Data are means ± SEM (n = 6; **: $p < 0.01$ statistically different from the - EGTA group).

Fig 5. Effect of EGTA on TTSS transcriptional activation. The graph represents TTSS activation during the time with (▲) or without EGTA (■) in the medium. CHA (pC*::lux)* strain was co-cultured with the A549 cells (solid line) or was alone (dotted line) in culture medium. Data are means ± SEM from 5 assays. *: indicates a significant difference as compared to CHA alone without EGTA and CHA alone with EGTA; Θ: indicates a significant difference as compared to CHA alone and CHA co-cultured with A549 cells without EGTA; ●: indicates a significant difference as compared to CHA alone and CHA co-cultured with A549 cells in presence of EGTA.

Fig 6. Detection of ExoS cytotoxins in supernatant and in cytoplasm of host epithelial cells. After 3 h of co-culture with CHA or CHAD1 strains without (-EGTA) or with (+EGTA) in the medium, secreted proteins were separate by 12% SDS-PAGE and **A.** revealed by staining with Coomassie Blue. **B.** Proteins secreted in supernatant were transferred onto nitrocellulose membrane and detected with ExoS antibodies. **C.** Proteins of cell lysates were transferred onto nitrocellulose membrane and detected with ExoS antibodies.

Fig 7. Effect of *Pseudomonas* TTSS toxins and EGTA on disruption of cytoskeleton. A549 cells were uninfected (**A**), uninfected with EGTA (**B**), infected with CHA strain (**C**), or infected with CHA strain with EGTA (**D**), followed by Alexa568-phalloïdin staining of the actin microfilaments (**A-D**) (x 63).

Fig 1
Click here to download high resolution image

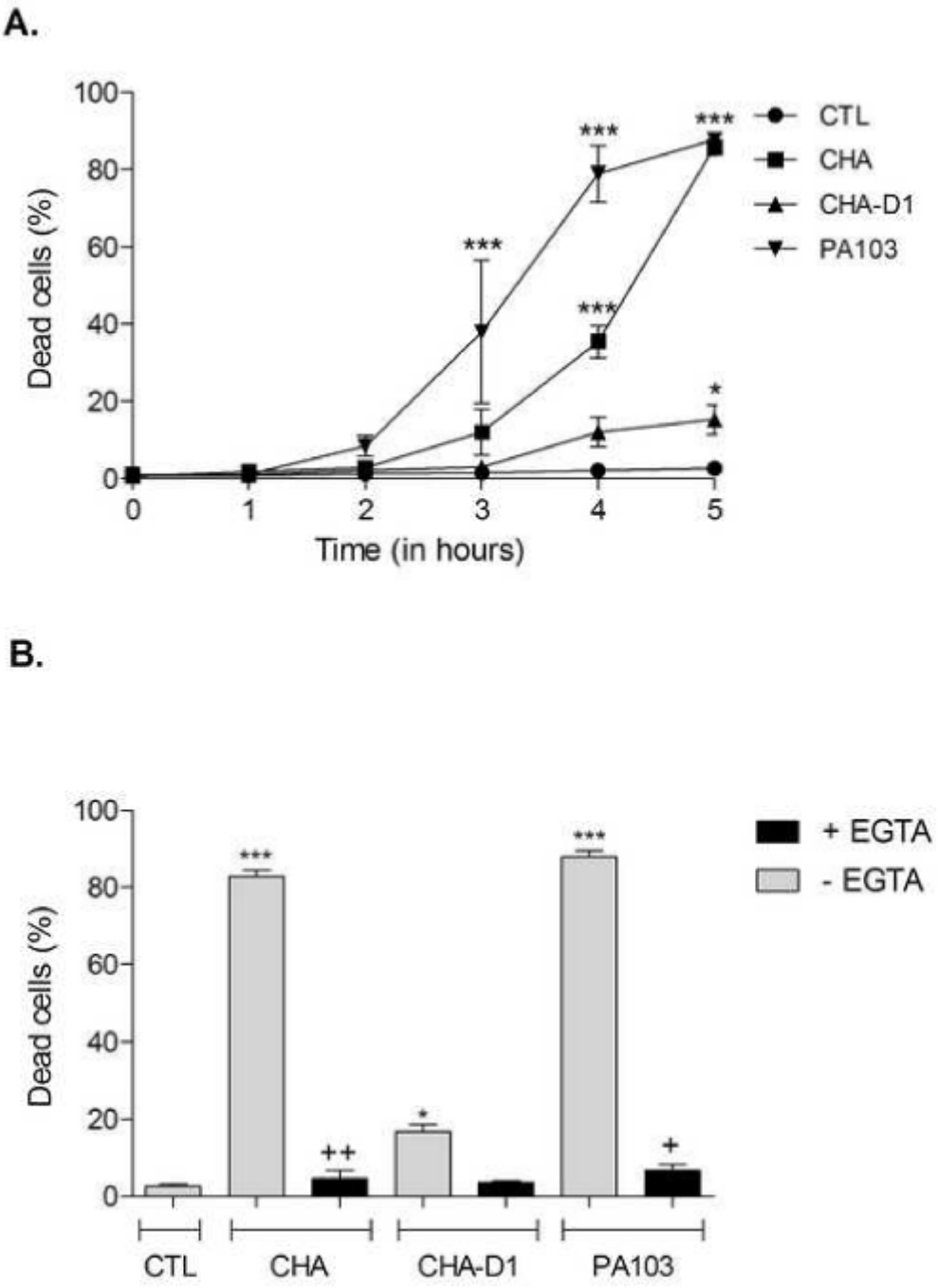

Fig 2
Click here to download high resolution image

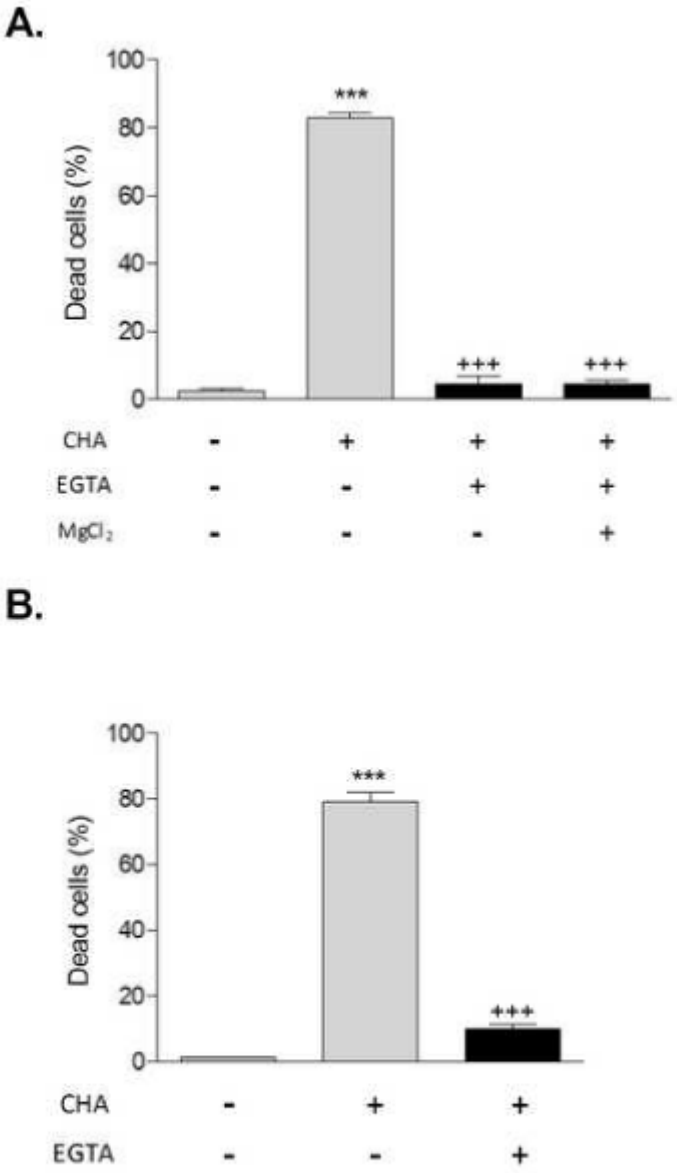

Fig 3
Click here to download high resolution image

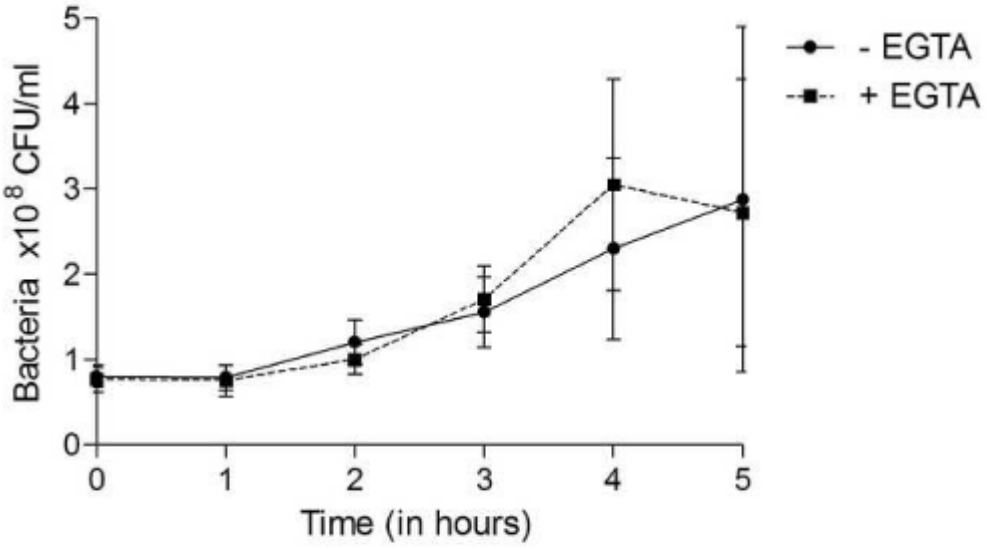

Fig 4
Click here to download high resolution image

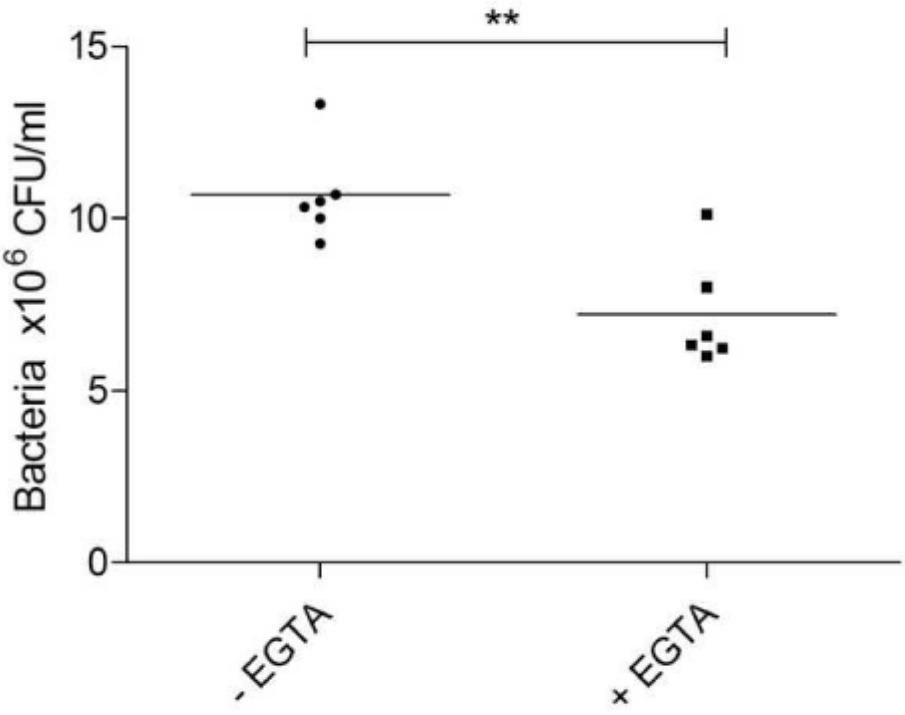

Fig 5
Click here to download high resolution image

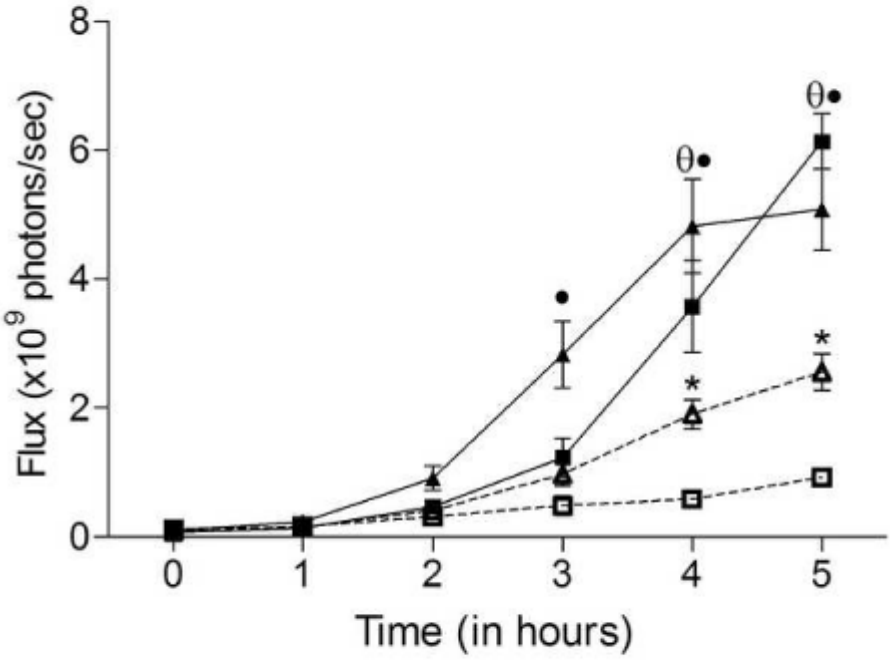

Fig 6
Click here to download high resolution image

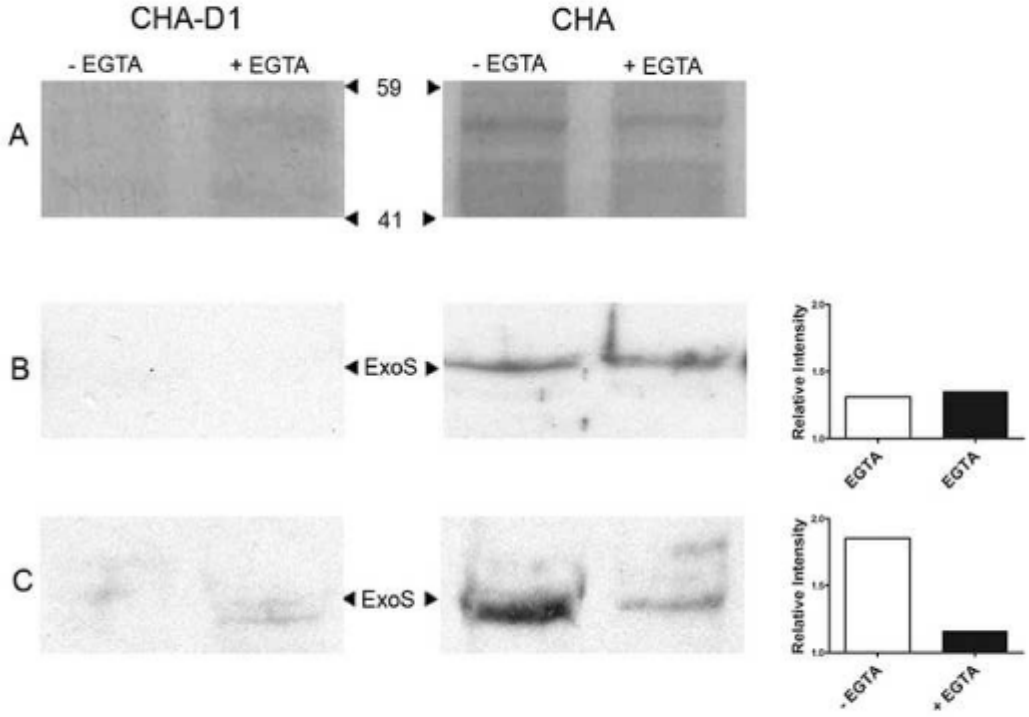

Fig 7
Click here to download high resolution image

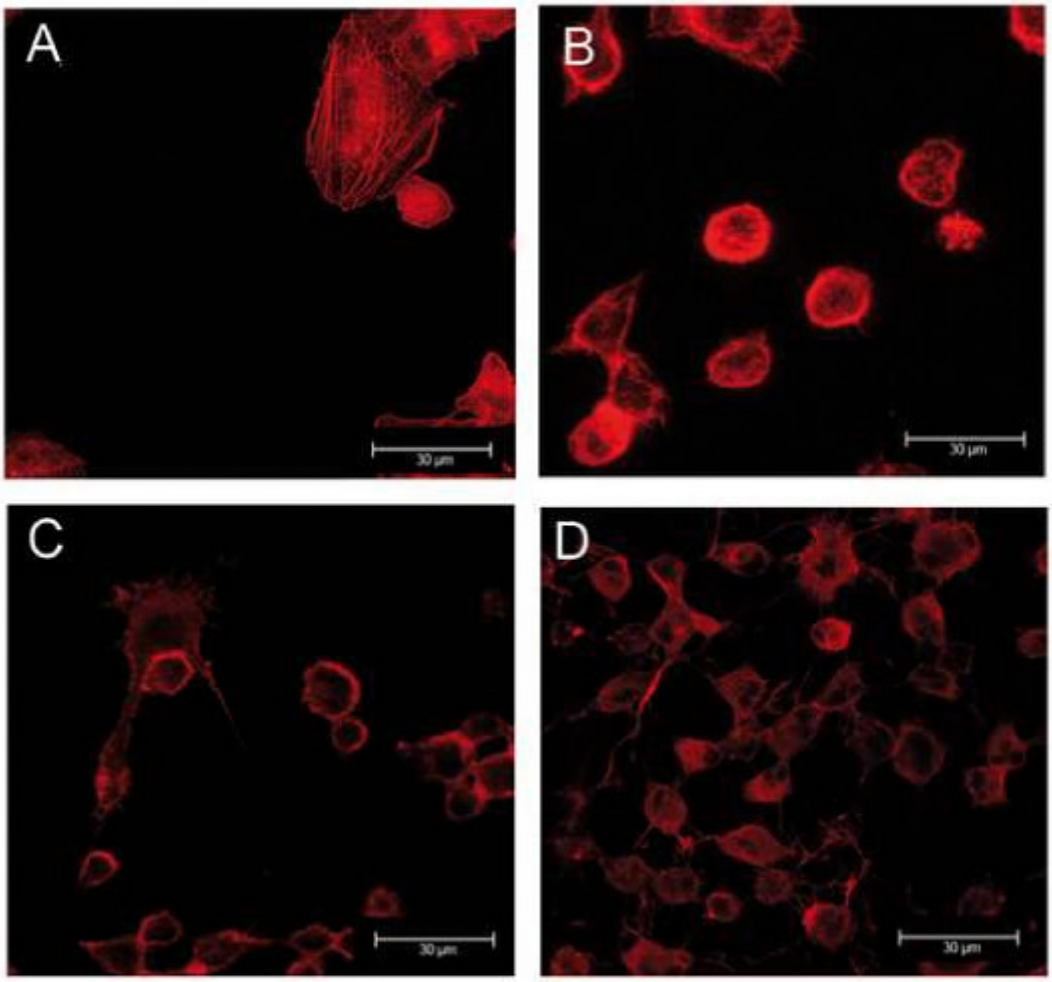

Table 1

Table 1. *Pseudomonas aeruginosa* strains used in this study.

Strain	Description	Source
CHA	Mucoid CF isolate, with TTSS ExoS, ExoT and ExoY	[26]
CHA-D1	CHA *exsA*::Gm^R mutant of CHA without functional TTSS	[28]
CHA (p*C::lux*)	*lux* fusion with *exsCEBA* promoter at the *attB* site of the CHA chromosome	[43]
PA103	Cytotoxic respiratory clinical isolate with a functional TTSS, ExoU and ExoT	[24]

Table 2

Table 2. Cytotoxicity of *Pseudomonas* strains to lung epithelial cells (n = 6; **: $p < 0.01$, significantly different from values for the - EGTA group).

Strains	% Cytotoxicity	
	- EGTA	+ EGTA
CHA	83.3 ± 11.2	14.0 ± 5.7**
CHA-D1	29.5 ± 4.5	18.6 ± 4.7
PA103	100 ± 1.2	47.3 ± 4.9**

II. Effets du LPS de *Pseudomonas aeruginosa* sur le calcium intracellulaire et la sécrétion de chlore des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Effects of LPS from *Pseudomonas aeruginosa* on intracellular $Ca^{2+}$and Cl^- secretion in bronchial epithelial cell lines 16HBE14o-.

BUYCK J.(1), VERRIERE V.(2), BENMAHDI R. (2), GUERY B. (1), MATRAN R. (1) and URBACH V. (2)
(1) Département de physiologie, Faculté de Médecine de Lille, Université de Lille 2, Lille, France
(2) Centre Hospitalier Universitaire Arnaud de Villeneuve, INSERM U661, Montpellier, France.

II.A. Introduction

La colonisation des voies respiratoires par *P. aeruginosa* est principalement due à la capacité des bactéries à adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte, à produire une large batterie de toxines et à envahir les cellules.

L'attachement de *P. aeruginosa* aux membranes des cellules épithéliales déclenche de nombreuses réactions via l'activation de voies de signalisation par des seconds messagers intracellulaires. Le lipopolysaccharide (LPS), un des facteurs d'adhésion et constituant majeur des membranes externes des bactéries à Gram-négatif comme *P. aeruginosa*, peut moduler les fonctions cellulaires épithéliales.

Le LPS peut se fixer au récepteur complexe CD14/TLR4/MD2 [232], ce qui induit la translocation de NFκB [406] et la sécrétion de cytokines proinflammatoires dans différents types cellulaires [407]. A côté des effets du LPS sur l'inflammation, des études ont montré d'autres effets sur les fonctions épithéliales [406,408-410]. Le LPS d'E*. coli* augmente l'expression des CaCC sur des cellules Calu-3 [411]. Le LPS pourrait aussi influencer d'autres canaux sur d'autres modèles de cellules : le LPS diminue l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase sur des cellules épithéliales intestinales [371], module l'échangeur sodium/proton basolatéral des enterocytes [372], régule le signal calcique des cellules microgliales [412], active les canaux BK sur des cellules musculaires lisses [413] ou module l'homéostasie calcique des cellules du pancréas [362]. De plus, d'autres facteurs de virulence membranaires ont un impact fort sur la sécrétion de fluide épithéliale et les transports d'ions. Par exemple, les rhamnolipides peuvent inhiber l'absorption épithéliale de Na^+ par sa fixation aux TLR2 [278], la flagelline peut aussi diminuer l'absorption de Na^+ [359] en se fixant aux ASGM1 ou activer la sécrétion de Cl- des cellules Calu-3 [369]. Le LPS de *Klebsiella pneumoniae* peut aussi inhiber l'absorption de Na+ [370].

Bien que le rôle potentiel du LPS sur la sécrétion ait été montré chez d'autres bactéries, aucun rôle du LPS de *P. aeruginosa* n'a été mis en évidence à ce jour sur l'homéostasie calcique et les transports d'ions. C'est pourquoi dans cette étude, nous avons évalué les effets du LPS de *P. aeruginosa* sur le calcium intracellulaire de cellules bronchiques humaines par fluorescence et déterminer l'origine du signal calcique. De plus, nous avons évalué les effets du LPS sur les transports ioniques des cellules 16HBE14o-.

II.B. Présentation des résultats

II.B.1. Effets du LPS sur le calcium intracellulaire

a) Origine de l'augmentation de calcium

Nous avons, dans un premier temps, évalué l'effet du LPS de *P. aeruginosa* sur le calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) par imagerie en microscopie de fluorescence. Après un temps de stabilisation de 15 min, 30 µg/mL de LPS était ajouté dans la solution de Krebs. Notre étude a montré que le LPS stimule une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules 16HBE14o$^-$ (Figure 1 A, ligne pleine). Cet effet est significatif à partir d'une concentration de 10 µg/mL (non montré). La réponse induite est formée tout d'abord un pic calcique rapide (10 sec) suivi d'un plateau redescendant lentement vers la ligne de base (20 min). Après 30 minutes, les cellules perdaient subitement la fluorescence correspondant probablement à une mort prématurée des cellules due à l'exposition prolongée au LPS.

Afin de déterminer l'origine de cette augmentation de calcium cytosolique, nous avons fait les mêmes expérimentations dans du milieu Krebs à basse concentration en calcium (Low Ca). Dans ces conditions, l'effet du LPS (30 µg/mL) sur le $[Ca^{2+}]_i$ est fortement diminué (Figure 1 A, ligne pointillée). Le pic est diminué significativement à 0,016 ± 0,004 dans le milieu « Low Calcium » (Figure 1 C) comparé à la valeur de 0,083 ± 0,006 lorsque les cellules sont en solution Krebs standard. De même l'aire sous la courbe (AUC), utilisée pour évaluer le calcium mobilisé, est significativement plus faible dans les conditions « Low Calcium » (4,037 ± 1,422) comparé aux conditions de solution Krebs standard (19,560 ± 2,136)(Figure 1 D). Ces résultats montrent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est en partie due à un influx du calcium extracellulaire.

Pour étudier le rôle du calcium des stocks intracellulaires dans la réponse au LPS, nous avons prétraité les cellules avec la thapsigargine, un inhibiteur des pompes SERCA du réticulum. La thapsigargine (15 min, 1 µM) induit un relargage du calcium des stocks intracellulaires et empêche le repompage du calcium cytosolique vers le réticulum endoplasmique, ceci induit une augmentation soutenue de $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 1 B, ligne pleine).

Après stabilisation, l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ stimulée par le LPS est atténuée. Le pic ainsi que l'aire sous la courbe sont significativement plus faibles que pour les conditions normales (0,03883 ± 0,01047 et 6,705 ± 4,140 respectivement) (Figure 1 C et D).

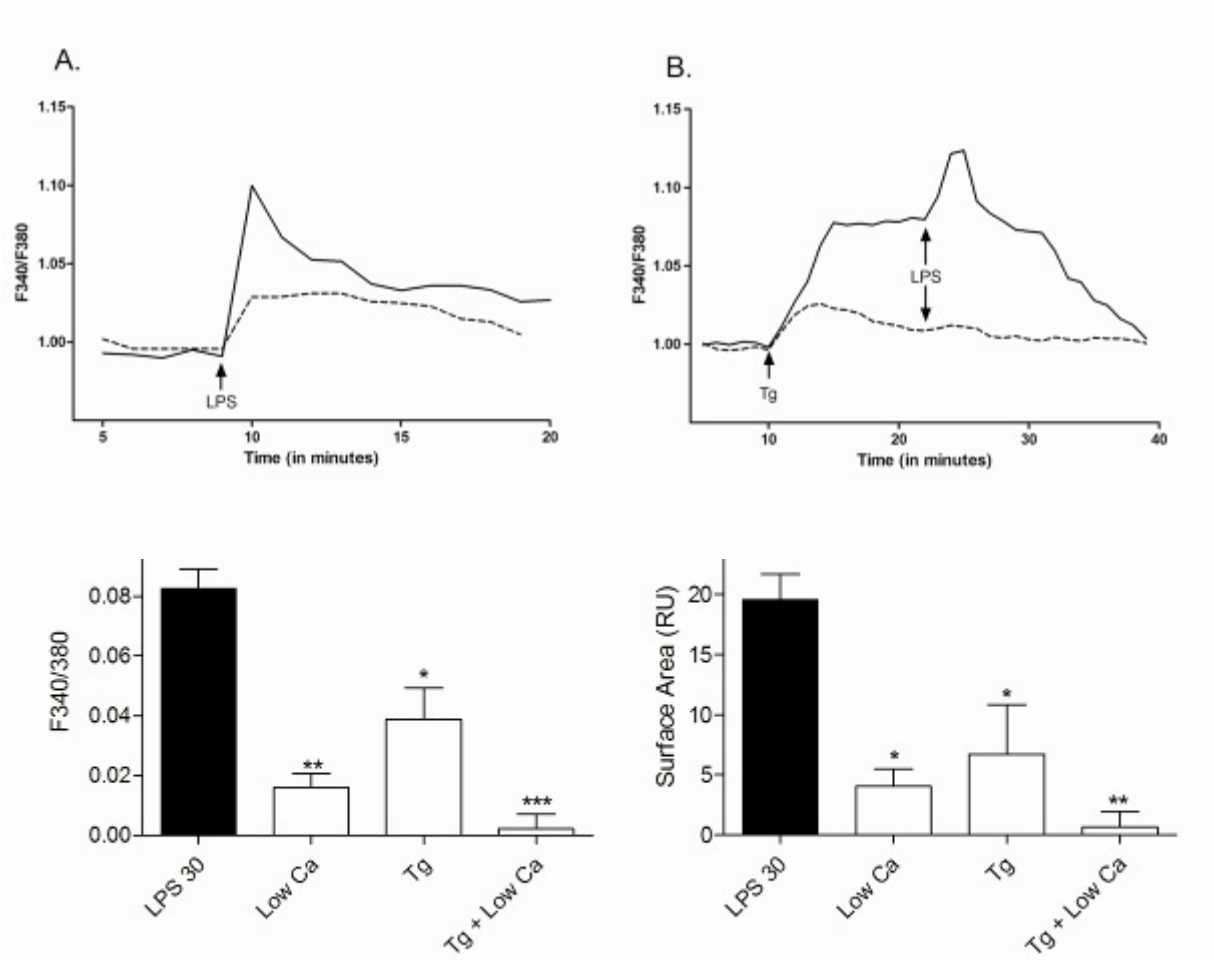

Figure 1. Origine du calcium impliqué dans l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. A. Mesure ratiométrique du calcium intracellulaire au cours du temps après l'ajout de LPS (30 µg/mL), en solution de Krebs standard (ligne pleine) ou dans du Krebs à basse concentration en calcium (ligne pointillée). **B.** Mesure ratiométrique du calcium intracellulaire au cours du temps après l'ajout de LPS (30 µg/mL) et en présence de 1 µM de thapsigargine (Tg), en solution de Krebs standard (ligne pleine) ou dans du Krebs à basse concentration en calcium (ligne pointillée). **C.** Moyenne du pic après ajout de 30 µg/mL de LPS en solution de Krebs standard (LPS 30), dans du Krebs à basse concentration de calcium (Low Ca), en milieu normal après addition de thapsigargine (Tg), et dans du Krebs à basse concentration de calcium après addition de thapsigargine (Tg + Low Ca). Les valeurs indiquées sont les moyennes ± écart à la moyenne (n = 5); * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ indiquent des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS 30.**D.** Moyenne des aires des surfaces sous la courbe à partir du pic jusqu'à 5 minutes après le pic après ajout de 30 µg/mL de LPS en solution de Krebs standard (LPS 30), en solution de Krebs à basse concentration de chlore (Low Ca en solution de Krebs standard après addition de thapsigargine (Tg), et en solution de Krebs à basse concentration de chlore après addition de thapsigargine (Tg + Low Ca). Les valeurs indiquées sont les moyennes ± écart à la moyenne (n = 5; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; Indiquent des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS 30).

Dans la solution à basse concentration en calcium, la thapsigargine (1 µM) induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ beaucoup plus faible que dans la solution de Krebs normale (Figure 1 B, ligne pointillée). Ces conditions inhibent totalement l'effet du LPS (Figure 1 C et D).

Ces résultats montrent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est en partie due à un relargage de calcium des stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique.

Ces résultats montrent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ déclenchée par le LPS est due à un relargage des stocks intracellulaires et à un influx de calcium extracellulaire à travers des canaux membranaires. Le LPS induit une mobilisation de calcium des stocks intracellulaires ce qui déclenche une entrée de calcium par l'activation de canaux calciques de la membrane plasmique ce qui suggère un phénomène d'entrée capacitative de calcium (CCE) comme décrit précédemment dans les cellules 16HBE14o- [414].

b) Les canaux membranaires impliqués dans l'influx calcique

L'entrée capacitative de calcium (CCE) est caractérisée par un relargage des stocks intracellulaire suivi d'une stimulation de canaux calciques ou cationiques non-spécifiques pour remplir le réticulum. Afin de déterminer quels sont les canaux membranaires impliqués dans l'influx de calcium extracellulaire en réponse à la stimulation par le LPS, nous avons utilisé différents inhibiteurs des canaux calciques ou des canaux non-spécifiques connus. Chaque inhibiteur a été testé à plusieurs concentrations et seules les concentrations les plus efficaces ont été présentées dans la Figure 2.

Les cations trivalents, La^{3+} (1 µM) et Gd^{3+} (1 µM) diminuaient significativement l'influx calcique en réponse à la stimulation par le LPS. Les lanthanides diminuaient de façon significative l'AUC induite par la stimulation au LPS (Figure 2B), alors que le pic n'était pas affecté en présence de La^{3+} mais réduit de 61,4% ($p < 0,01$; $n = 5$) en présence de Gd^{3+} (Figure 2 A). Ces résultats indiquent un rôle des canaux calciques membranaires, cependant les cations trivalents sont des inhibiteurs non spécifiques des canaux non spécifiques mais aussi des canaux calciques de type L. Les inhibiteurs des canaux cationiques non spécifiques : le SKF96365 (3 µM) et l'econazole (30 µM), inhibaient également partiellement l'aire sous la courbe après stimulation par la LPS sans avoir d'effet sur le pic. L'inhibition était respectivement de 49,88% ($p < 0,05$; $n = 5$) et 35,22% ($p < 0,05$; $n = 5$). Ces résultats indiquent que les canaux TRPC sont impliqués dans l'influx de calcium. Le ruthenium red (10 µM) qui peut bloquer les canaux TRPV1 et TRPV5 [400,402] n'avait également aucun effet sur le pic mais réduisait significativement l'aire sous la courbe indiquant que ces canaux sont aussi présents et impliqués dans la réponse au LPS. Cependant, l'utilisation de concentration plus élevée s'est révélée impossible du fait d'une interférence avec la sonde

fluorescente Fura-2 comme décrit précédemment [151]. Le verapamil (0,1 µM), un inhibiteur des canaux calciques sensibles au voltage de type L, diminuait significativement l'aire sous la courbe de 48,4% ($p < 0,05$; $n = 5$) indiquant une participation de ces canaux.

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'une activation simultanée de canaux de type TRPC, TRPV et aussi de type L est impliquée dans l'influx de calcium extracellulaire stimulé par le LPS.

De plus, nous avons testé l'inhibiteur des récepteurs IP3 impliqué dans la mobilisation calcique. Le 2-APB (1 µM) n'avait aucun effet significatif ni sur le pic ni sur l'aire sous la courbe. Cependant, il a été prouvé que cet inhibiteur avait un effet complexe et même s'il a été initialement décrit comme un inhibiteur des récepteurs IP3, il a été décrit également comme modulateur des canaux TRPC et comme activateur des TRPV [397-399]. Notre influx calcique incluant ces deux familles de canaux, cela peut expliquer l'absence d'inhibition par le 2-APB.

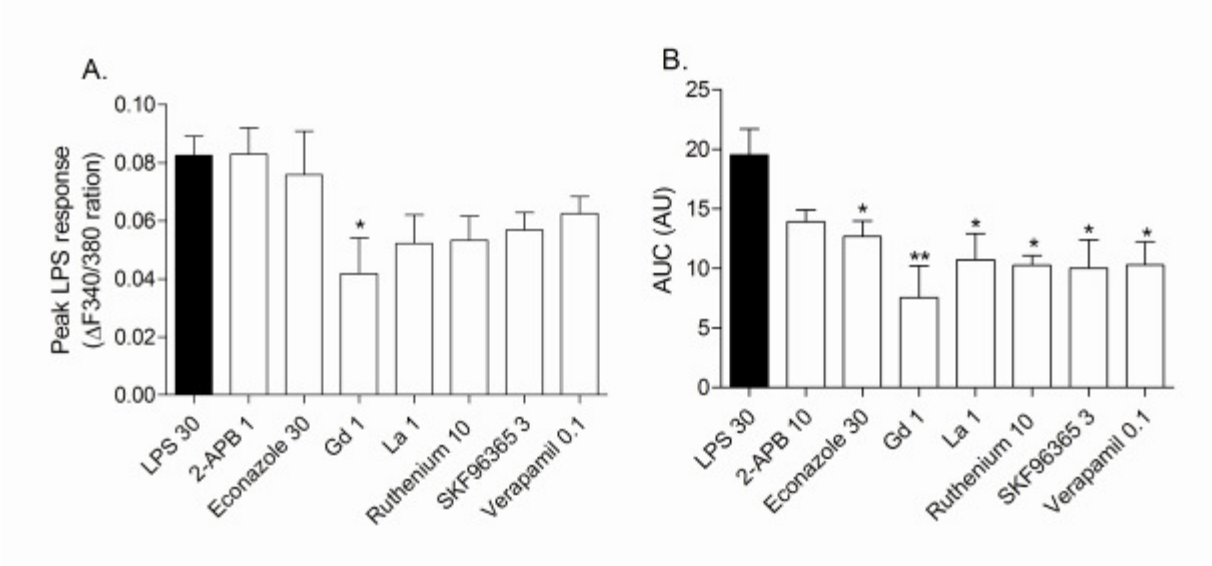

Figure 2. Effets des inhibiteurs de différents canaux calciques sur l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. A. Moyenne du pic après ajout de 30 µg/mL de LPS en solution de Krebs standard (LPS 30), ou en présence d'un inhibiteur. Les valeurs indiquées sont les moyennes ± écart à la moyenne ($n = 5$; * : $p < 0,05$; Indique des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS 30).**B.** Moyenne des aires des surfaces sous la courbe à partir du pic jusqu'à 5 minutes après le pic après ajout de 30 µg/mL de LPS en solution de Krebs standard (LPS 30), ou en présence d'un inhibiteur. Les valeurs indiquées sont les moyennes ± écart à la moyenne ($n = 5$; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; Indiquent des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS 30).

c) Rôle des récepteurs P2Y2

L'activation de la CCE peut se faire par différents signaux cependant l'activation par l'UTP et l'ATP a déjà été bien décrite dans les cellules épithéliales des voies aériennes incluant les 16HBE14o- [151,415]. D'autres études ont aussi montré que les rôles de la flagelline sur l'influx de calcium extracellulaire dans les cellules épithéliales étaient dus à un relargage d'ATP et à une stimulation des récepteurs purinergiques de type P_2Y. Afin de déterminer si une telle voie est impliquée dans l'influx calcique stimulé par le LPS, nous avons utilisé l'inhibiteur des récepteurs P_2Y, la suramine.

L'ajout de 100 µM de suramine n'avait aucun effet sur la réponse calcique induite par le LPS (Figure 3 A et B). De plus, nous avons testé d'autres concentrations de suramine (10 et 1000 µM) qui ne donnaient pas d'effets non plus.

Ces résultats indiquent que l'induction du signal calcique par le LPS n'est probablement pas dû à l'activation de récepteurs aux protéines G comme les P2Ypar un relargage d'ATP.

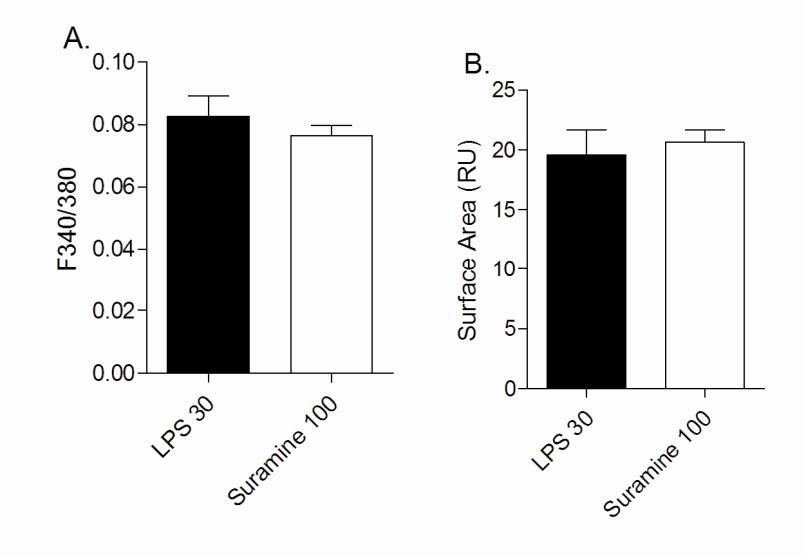

Figure 3. Effets de la suramine sur l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. A. Moyenne du pic après ajout de 30 µg/mL de LPS en solution de Krebs standard (LPS 30), ou en présence de 100 µM de suramine. Les valeurs indiquées sont les moyennes ± écart à la moyenne (n = 5).**B.** Moyenne des aires des surfaces sous la courbe à partir du pic jusqu'à 5 minutes après le pic après ajout de 30 µg/mL de LPS en solution de Krebs standard (LPS 30), ou en présence de 100 µM de suramine. Les valeurs indiquées sont les moyennes ± écart à la moyenne (n = 5).

II.B.2. Le LPS et les transports ioniques

a) Effets du LPS sur le courant de court-circuit

Les modifications de $[Ca^{2+}]_i$ sont impliquées dans de nombreuses fonctions de l'épithélium des voies aériennes [140]. Par exemple, la sécrétion de mucus, de surfactant ou la fréquence des battements ciliaires sont modulés par une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Le Ca^{2+} intracellulaire joue aussi un rôle fondamental dans la régulation des transports ioniques transépithéliaux [66,105]. Ainsi nous avons examiné les conséquences de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ stimulée par le LPS sur l'activation des transports ioniques en chambres d'Ussing.

Le courant de court-circuit (*scc)* mesuré en présence de solution de Krebs apicale et basolatérale est de 8,4 ± 5,77 µA/cm² (*n* = 5). Dans ces conditions, nous n'avons pas montré d'effet du LPS quelque soit l'application apicale ou basolatérale (non montré).

Ensuite, la solution de Krebs apicale a été remplacée par une solution à basse concentration en chlore afin de stimuler la sécrétion de chlore du côté apical. Dans ces conditions, le scc de base augmentait pour atteindre une valeur moyenne de 22,20 ± 2,083 µA/cm². Nous avons montré que le LPS appliqué dans le compartiment apical à une concentration de 30 µg/ml produisait une augmentation transitoire du scc de 8,18 ± 3,83 µA/cm² soit une valeur moyenne de 31,80 ± 2,538 µA/cm² (Figure 4). Cet effet du LPS est significatif dès 10 µg/mL (non montré).

En revanche, lorsque le LPS était appliqué du côté basolatéral, nous n'avons pas obtenu de stimulation du courant de court-circuit (non montré).

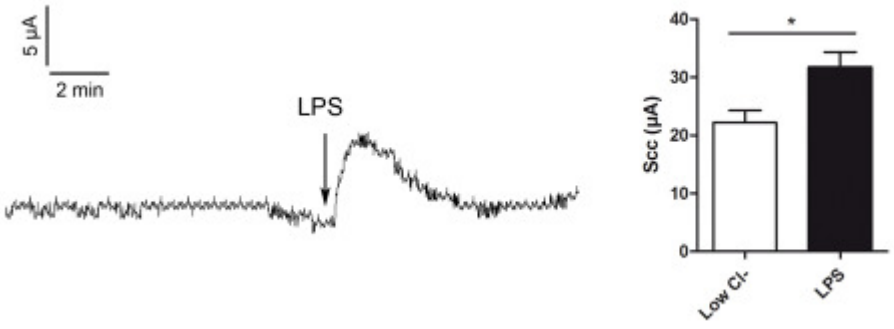

Figure 4. Augmentation du courant de court-circuit (scc) induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. Exemple de trace obtenue après l'addition apicale de 30 µg/mL de LPS (A gauche). Les valeurs indiquées sont les moyennes des valeurs de scc ± écart à la moyenne (*n*= 5 ; * : p < 0,05) (A droite).

b) Implication des ENaCs

Une augmentation de courant de court-circuit peut être expliquée par deux phénomènes : soit une augmentation de l'absorption de sodium par l'intermédiaire des canaux ENaC, soit une augmentation de la sécrétion de chlore via différents canaux chlores apicaux. Pour déterminer si les ENaC sont impliqués dans la réponse au LPS, nous avons utilisé l'amiloride (10 µM) du côté apical (Figure 5 A). Après une période de 15 minutes de stabilisation, le LPS induisait une réponse inchangée (*n* = 5). Les ENaC ne sont donc pas impliqués.

c) Implication des canaux chlorures

Nous avons voulu ensuite déterminer le type de canaux chlorures impliqués dans la stimulation du courant de court-circuit induit par le LPS. Le NPPB (1 µM, inhibiteur des canaux Cl^- activé par le Ca^{2+}) n'affectait pas de façon significative le *scc* de base et ne perturbait pas de façon significative l'augmentation de *scc* produite par le LPS (Figure 5 B). En revanche, un prétraitement apical de l'épithélium par les inhibiteurs non spécifiques du canal CFTR, le DPC (10 µM) ou le glybenclamide (10 µM) produisait une diminution du courant de court-circuit de base et inhibait partiellement l'effet du LPS de 51,01% et 87,86% (Figure 5 B) pour atteindre en moyenne 4,09 ± 1,13 µA/cm² et 1,02 ± 0,25 µA/cm² respectivement.

Pour confirmer le rôle des canaux CFTR dans la stimulation de la sécrétion de chlore par le LPS, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique : le CFTR(inh)-172. Le CFTR(inh)-172 (10 µM) induisait une diminution du courant de court-circuit basal de -6,20 ± 2,15 µA/cm² indiquant qu'il existe des courants de type CFTR activés de façon basale. Après stabilisation (15 min), la réponse induite par le LPS était atténuée significativement de 59,29%.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé un activateur du canal CFTR par augmentation d'AMPc intracellulaire, la forskoline. La forskoline induisait une augmentation du courant de court-circuit basal. Après une période de stabilisation, l'augmentation de scc induite par le LPS était atténuée de façon significative de 65,60%.

Enfin, nous avons combiné l'application de forskoline, et l'application de CFTR(inh)-172 ce qui réduisait encore la réponse au LPS de 72,86%.

L'effet du LPS passe donc en partie par une activation des canaux CFTR mais aussi par les autres canaux chlorures puisque l'utilisation de l'inhibiteur spécifique du CFTR n'atténue pas totalement l'augmentation de scc provoquée par le LPS.

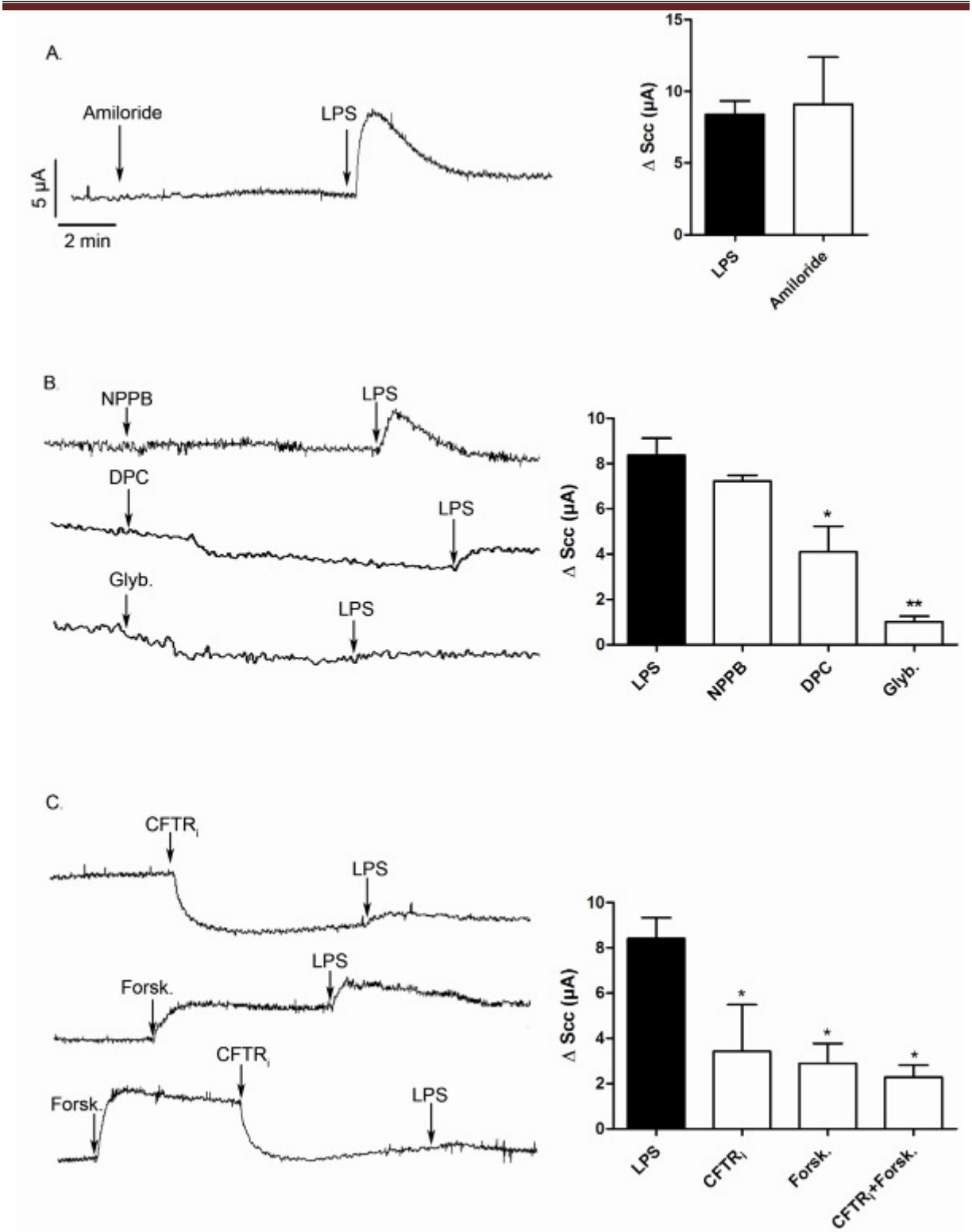

Figure 5. Effets des inhibiteurs de différents canaux sur l'augmentation du courant de court-circuit (scc) induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. A. Exemple de trace obtenue après l'addition apicale de 30 µg/mL de LPS en présence d'amiloride (A gauche), moyenne des valeurs de scc ± écart à la moyenne (n= 5) (A droite). **B.** Exemples de traces obtenues après l'addition apicale de 30 µg/mL de LPS en présence d'inhibiteurs (A gauche), moyenne des valeurs des scc ± écart à la moyenne (n= 5, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$; indiquent des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS) (A droite). **C.** Exemples de traces obtenues après l'addition apicale de 30 µg/mL de LPS en présence d'inhibiteurs (A gauche), moyenne des valeurs des scc ± écart à la moyenne (n= 5, * : $p < 0,05$; indique des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS) (A droite).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'activation du CFTR est partiellement responsable de l'augmentation du courant de court-circuit induite par le LPS. Cependant l'inhibiteur spécifique du CFTR n'induit pas d'inhibition complète de la stimulation par le LPS, ce qui indique que d'autres canaux chlorures, en particulier les CaCC, sont aussi impliqués.

d) Effets du calcium sur le transport de chlore

Le calcium étant un régulateur de certains transports d'ions, nous avons vérifié le rôle de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ sur l'augmentation de sécrétion de chlore en réponse au LPS après l'ajout du chélateur calcique intracellulaire BAPTA-AM. Le prétraitement au BAPTA-AM (50 µM, 30 min), n'affectait pas le courant de base de façon significative mais inhibait totalement l'effet du LPS (Figure 6). Ces résultats démontrent que la sécrétion de chlore n'est qu'une conséquence de l'augmentation de calcium intracellulaire induite par le LPS.

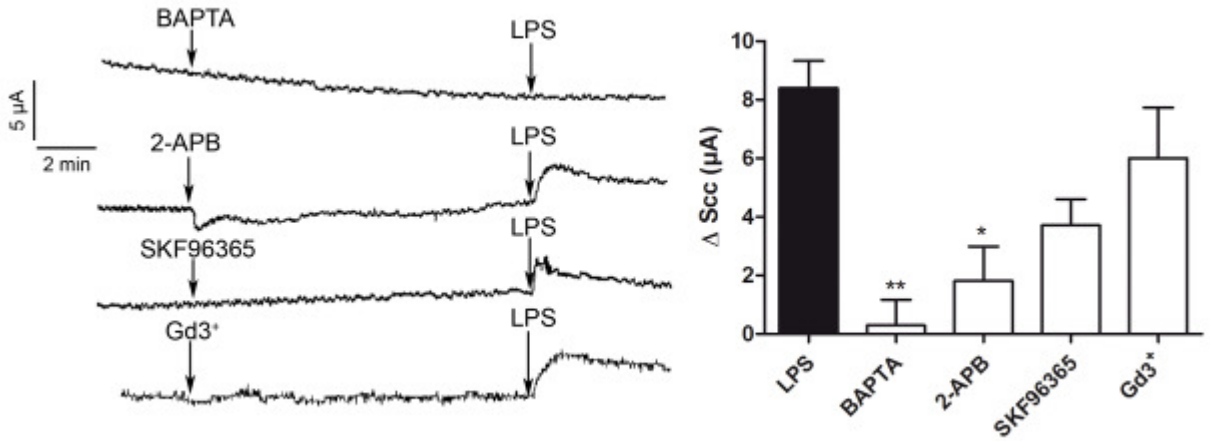

Figure 6. Effets des inhibiteurs de différents canaux calciques sur l'augmentation du courant de court-circuit (scc) induite par le LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. Exemples de traces obtenues après l'addition apicale de 30 µg/mL de LPS en présence d'inhibiteurs (A gauche), moyenne des valeurs des scc ± écart à la moyenne (BAPTA *n*= 5 ; 2-APB *n* = 5 ; SKF96365 *n* = 3; Gd^{3+} *n* = 3, ** : p<0,01 ; * p<0,05 ; indiquent des valeurs différentes comparées aux valeurs du groupe LPS) (A droite).

Ensuite, nous avons fait les mêmes expérimentations en présence de certains inhibiteurs des canaux calciques. Le 2-APB, qui n'affectait pas l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, induisait une inhibition significative de l'effet du LPS sur le courant de court-circuit pour atteindre en moyenne 1,81 ± 1,18 µA/cm². En revanche le SKF96365 et le Gd^{3+}, qui inhibaient significativement l'augmentation de calcium induite par le LPS, ne réduisaient pas la stimulation de scc induite par le LPS.

Ces résultats confirment le rôle très probable de l'augmentation du calcium intracellulaire sur l'augmentation du courant de court-circuit.

II.C. Discussion et conclusion

De nombreux travaux ont montré un rôle de l'infection à *P. aeruginosa* ou de ses facteurs de virulence sur la modulation du calcium intracellulaire et la régulation des transports ioniques des cellules épithéliales. Ces modifications s'effectuent dès les premières minutes de contact hôte/pathogène et pourraient même être le premier signal reconnu par la cellule épithéliale pendant l'infection. Constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, le LPS est principalement responsable de l'activation de la réponse immunitaire innée. Bien qu'aucun rôle du LPS de *P. aeruginosa* sur la régulation du calcium et du transport d'ions n'ai été décrit, il a été montré chez d'autres bactéries. C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons examiné le rôle du LPS de *P. aeruginosa* sur le calcium intracellulaire et la sécrétion de chlore de cellules humaines bronchiques épithéliales 16HBE14o-. Nous avons montré que le LPS augmentait le calcium intracellulaire par relargage des stocks du réticulum endoplasmique et une entrée de calcium extracellulaire. Cet effet est couplé à une sécrétion transitoire de chlore par l'activation des canaux CFTR et CaCC.

II.C.1. L'effet du LPS sur le $[Ca^{2+}]_I$

Les effets de *P. aeruginosa* sur l'augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ ont déjà été décrits. Jacob et al. ont démontré que la présence de *P. aeruginosa* du côté basolatéral mais pas du côté apical provoquait une augmentation du calcium intracellulaire [363]. Il a aussi été montré un effet sur l'augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ avec différents facteurs de virulence comme la pyocyanine [281], les autoinducteurs du quorum sensing [350], l'ExoU [363], la flagelline [209,416] ou les pili [358,363]. Néanmoins, ces effets sont encore controversés et seraient dépendants de la souche de *P. aeruginosa* et du côté de l'application apical ou basolatéral. D'autres études ont montré que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ n'est pas forcément requis mais jouerait un rôle régulateur important dans la réponse immunitaire stimulée par les infections à *P. aeruginosa* [360]. Bien qu'aucune étude ne montre un rôle du LPS de *P. aeruginosa* sur l'augmentation de $[Ca^{2+}]_I$, le LPS d'autres bactéries a de multiples effets. Le LPS d'*Escherichia coli* induirait une augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ sur des pneumocytes de type II de rat [361] provoquant ainsi une sécrétion de surfactant [417]. Nos résultats montrent également une augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ provoquée par le LPS sur des cellules 16HBE14o- contrairement à l'étude de Ratner et al. [358]. Cependant, nous utilisions des LPS d'origines différentes. Dans notre étude, nous utilisions le LPS pseudotype 10 de Sigma qui possède un lipide A penta-acétylé et un antigène O, alors que dans l'étude de Ratner, le LPS était isolé directement de leur souche PAO1. Il a été décrit que les effets du LPS étaient différents en fonction de sa structure. Le

lipide A de *P. aeruginosa* est moins toxique que celui d'*E. Coli* ou de *Salmonella* du fait de sa forme penta-acétylée [230]. Cependant, il a été montré que la forme hexa-acétylée du lipide A retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose déclenchait une réponse inflammatoire plus forte [228,229]. De même, la grande variabilité de l'antigène O peut influer sur la virulence de la bactérie [222]. Ainsi, la différence d'origine des LPS utilisés peut expliquer la différence de stimulation du $[Ca^{2+}]_I$ observée. De plus, Ratner et al. ne détectaient pas de mort cellulaire après l'utilisation de LPS à 100 µg/ml alors que dans notre étude, nous observions avec cette concentration une perte rapide de Fura-2 des cellules qui s'apparente à de la mort cellulaire. Ceci indiquant bien que le LPS de notre étude à des effets bien plus conséquents que dans l'étude de Ratner.

De plus, Paradiso et al. ont décrit des réponses hétérogènes du calcium des cellules épithéliales des voies aériennes humaines selon le type cellulaire et le temps de culture [418]. La différence de cellules utilisées dans notre étude et celle de Ratner peut partiellement expliquer la différence dans l'effet du LPS.

II.C.2. Origines de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_I$

Une augmentation du calcium intracellulaire peut provenir soit du relargage de calcium par le réticulum endoplasmique soit par un influx de calcium par des canaux de la membrane plasmique. Le phénomène d'entrée capacitative de calcium décrit sur les cellules 16HBE14o- [414], est constitué par un vidage des stocks de calcium du réticulum ce qui stimule un influx de calcium provenant du milieu. Cette voie serait la voie principale de signalisation calcique des cellules non-excitables [140]. Nos résultats démontrent que le LPS induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ par un phénomène semblable à une entrée capacitative de calcium, l'influx calcique se ferait par l'activation de différents canaux non-spécifiques et calciques de type L.

Il a été décrit précédemment que certains épithéliums pouvaient exprimer des canaux de type TRPC et TRPV impliqués dans des conductances de type « store-operated » [146]. Pourtant ce type de canaux plus ou moins sélectifs pour le calcium est encore peu décrit dans les épithéliums des voies aériennes. Quelques études récentes ont cependant mis en évidence la présence de TRPC 1, 3, 4, 6 et 7 et TRPV4 dans différentes lignées épithéliales bronchiques humaines [141-143]. Néanmoins la présence de ces canaux est variable selon les types cellulaires et leurs rôles dans l'entrée capacitative de calcium sont encore peu décrits, de plus, tous ne sont pas sélectifs pour le calcium.

L'inhibition observée par les inhibiteurs non spécifiques des canaux cationiques, les lanthanides (La^{3+} et $Gd^{3+)}$ à des concentrations relativement basses (1 µM) sont en accord

avec les études précédentes. Cependant, ces inhibiteurs sont peu spécifiques et peuvent inhiber aussi bien les canaux cationiques non spécifiques [419] que les canaux calciques sensibles au voltage de type L et T [420]. De plus, les concentrations utilisées pour inhiber les TRPV et TRPC sont très variables dans la littérature ceci reflétant la différence d'expression de ces canaux selon les types cellulaires [421,422]. L'utilisation d'autres inhibiteurs plus spécifiques des canaux TRP (SKF96365, econazole et ruthenium red), nous a permis de montrer que les deux familles TRPC et TRPV étaient impliquées dans le signal calcique induit par le LPS. Cependant, le manque d'inhibiteurs spécifiques de ces canaux ne nous a pas permis de déterminer avec précision les canaux impliqués.

L'utilisation de l'inhibiteur des canaux calcique de type L, le Verapamil [423], a permis de mettre en évidence l'activation de ces canaux par le LPS. La présence de ces canaux avait déjà été décrite dans différents épithéliums [424,425] incluant les cellules épithéliales des voies aériennes [426].

De façon surprenante, le 2-APB n'inhibait pas de façon significative l'augmentation de calcium induite par le LPS. Cependant, les effets du 2-APB d'abord introduit comme un inhibiteur de la mobilisation calcique via les récepteurs IP3 du réticulum [397] semblent plus complexes. Il a été décrit plus récemment comme bloqueur des canaux TRPC [398] mais aussi comme activateur des canaux TRPV [399]. Le LPS provoquant l'activation à la fois des TRPC et TRPV, ceci peut expliquer l'absence d'inhibition par la 2-APB. De plus, alors que la fluorescence était uniforme dans toutes les cellules, l'utilisation de 2-APB à des concentrations plus élevées (15 min, 10-100 µM) induisait une dérégulation du $[Ca^{2+}]_i$, la fluorescence variait fortement d'une cellule à l'autre, rendant impossible l'interprétation de ces enregistrements. Ces effets n'ont pas été rapportés précédemment mais pourrait être dus à l'inhibition des récepteurs IP3 par le 2-APB induisant une dérégulation de l'homéostasie calcique intracellulaire.

Nous n'avons pas détecté de rôle des récepteurs purinergiques dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_I$ comme décrit dans d'autres études [151]. Cependant, des travaux récents sur les cellules endothéliales ont révélé d'autres voies possibles d'activation de CCE qui ne requiert pas forcément la déplétion du calcium du réticulum endoplasmique mais qui serait dépendante de la production de certains seconds messagers intracellulaires [427]. Le LPS ayant de nombreux effets sur la production de seconds messagers comme le NO ou l'activation de PKC comme il a été décrit dans des cellules NHBE [410], il serait intéressant d'explorer cette voie.

II.C.3. Effet du LPS sur le courant de court-circuit

Les variations de $[Ca^{2+}]_i$ sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions de l'épithélium des voies aériennes comme la sécrétion de mucus [353,354], la sécrétion de surfactant [355], la fréquence des battements ciliaires [356] et la régulation des transports d'ions [357]. Les cellules épithéliales des voies aériennes peuvent absorber le Na^+ et sécréter le Cl^- de façon active [28,124] et certains canaux sont sensibles aux variations de $[Ca^{2+}]_i$ comme les CaCC [59] ou certains canaux potassiques [97].

Nous avons montré que le LPS ajouté du côté apical induisait une augmentation transitoire du courant de court-circuit. Les ENaCs ne semblent pas impliqués car nous n'avons pas observé d'inhibition de l'augmentation de scc par le LPS en présence d'amiloride (l'inhibiteur des canaux ENaCs). Ceci est contradictoire avec des études précédentes qui montraient que de fortes concentrations de LPS de *Klebsiella pneumoniae* [370] ou la flagelline [359] inhibaient l'absorption de sodium des cellules épithéliales. Cependant, les ENaC n'ont jamais été mis en évidence avec la lignée 16HBE14o- [428,429]. En accord avec ces études, l'ajout d'amiloride du côté apical n'induisait pas d'effet sur le scc basal ce qui indiquait que les ENaCs n'étaient pas actifs ou pas présents sur la membrane apicale de nos cellules 16HBE14o-. Ainsi, nous ne pouvons conclure sur le rôle du LPS de *P. aeruginosa* sur les ENaCs dans notre modèle.

L'augmentation transitoire de scc est donc dépendante d'une sécrétion de chlore puisque elle est atténuée par un prétraitement par le DPC, le glybenclamide, le CFTR(inh)172 mais pas par le NPPB. Ce profil d'inhibition est en accord avec une activation des canaux CFTR comme montré récemment avec la sécrétion de chlore induite par la flagelline [369]. Cependant l'inhibition n'étant pas totale, cela indique l'implication d'autres canaux dans cette augmentation transitoire de scc comme l'indique une étude montrant une activation de courant chlore après contact des cellules épithéliales avec *P. aeruginosa* [430]. Nos expérimentations en présence de BAPTA-AM, un chélateur calcique intracellulaire, révélaient une inhibition totale de l'augmentation transitoire de scc en réponse au LPS, indiquant que la sécrétion de chlore est une conséquence de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. De plus, cela prouve qu'une conductance chlore dépendante du calcium est présente dans l'augmentation de scc produite par le LPS. Cela suggère une implication des CaCC. Il a été montré que CFTR est activé par une augmentation d'AMPc mais pas par une augmentation de calcium [431], néanmoins nos résultats montrent qu'une activation à la fois de CFTR et des CaCC est induite par le LPS. Cependant, le LPS peut activer d'autres voies de signalisation que nous n'avons pas explorées. En effet, des travaux ont montré que le LPS pouvait induire une production d'AMPc [432], activer une NO synthase dépendante du

calcium [433], la production NO pouvant influencer la sécrétion de l'épithélium des voies aériennes [164]. Ainsi, nous ne pouvons exclure une participation annexe de ces voies dans la sécrétion de chlore transitoire que nous avons observé.

Conclusions

Nous avons démontré dans cette étude un effet rapide du LPS sur l'activation d'une entrée capacitative de calcium par les canaux TRPV et TRPC mais aussi des canaux calciques de type L. Cette augmentation de calcium intracellulaire induit une augmentation transitoire de sécrétion de chlore par l'activation des canaux CFTR et CaCC dans les cellules bronchiques humaines 16HBE14o-. Cependant, le mécanisme induisant ces effets reste à explorer et des études complémentaires doivent indiquer si la stimulation d'une sécrétion apicale peut être un mécanisme de défense important de la cellule hôte lors d'infection par les pathogènes.

DISCUSSION

DISCUSSION

La compréhension de la relation entre la bactérie et la cellule hôte ainsi que les différentes stratégies mises en place par l'un et l'autre sont un des facteurs clés afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa.*

En effet, *P. aeruginosa* induit des infections aiguës et chroniques difficiles à traiter du fait de la multiplicité des facteurs de virulence ainsi que du nombre croissant de souches résistantes aux antibiotiques. Outre les effets sur l'inflammation, *P. aeruginosa* induit des modifications dès les premières minutes de son contact avec les cellules hôtes. Parmi ces modifications, le calcium intra et extracellulaire ainsi que la régulation des transports ioniques transépithéliaux semblent jouer un rôle prépondérant.

Le premier objectif de ce travail était d'étudier l'influence de chélateurs calciques sur la virulence du pathogène et en particulier sur le système de sécrétion de type III, un des facteurs de virulence majeurs lors d'infections aiguës. Les chélateurs tels l'EGTA sont utilisés pour déclencher l'expression du SSTT *in vitro.* En revanche, ils peuvent aussi augmenter la susceptibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques et perturber la formation de biofilm ou encore fragiliser la membrane externe. Pour éclaircir les effets de l'EGTA, nous avons étudié l'influence de ce chélateur sur la virulence des bactéries dans un modèle de co-cultures *in vitro* avec des cellules A549.

Notre second objectif était d'étudier le rôle des facteurs de virulence du pathogène dans les modulations du calcium intracellulaire et les transports ioniques des cellules hôtes épithéliales. En effet, de précédentes études ont montré des rôles de composés membranaires de *P. aeruginosa* sur les transports ioniques et le calcium des cellules épithéliales. Cependant, aucune étude n'a montré d'influence du LPS qui est le composant majeur de la membrane bactérienne. Nous avons donc évalué l'effet du LPS sur le calcium intracellulaire et les transports ioniques sur un modèle de cellules épithéliales humaines bronchiques 16 HBE14o-.

I. L'interrelation Hôte / pathogène

Le système respiratoire est constamment en contact avec des pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons. Une de ses premières défenses est une « barrière » de cellules épithéliales formée par la cohésion des cellules entre-elles. L'épithélium pulmonaire normal est constitué de cellules polarisées avec des jonctions serrées, très

résistantes aux toxines et à l'apoptose induite par *P. aeruginosa*. En revanche, la perte de l'intégrité des jonctions serrées de l'épithélium permet à la bactérie d'atteindre le pôle basolatéral cellulaire et augmente la susceptibilité de ces cellules à l'apoptose induite par *P. aeruginosa* [434,435].

L'épithélium a aussi un rôle fondamental dans la régulation de la clairance mucociliaire participant à l'élimination des pathogènes. L'hydratation du mucus et la vitesse de battements des cils sont des éléments essentiels régulés par les cellules épithéliales permettant l'élimination des pathogènes « englués » dans le mucus en quelques heures. D'ailleurs, dans la mucoviscidose, une dérégulation des transports ioniques épithéliaux provoquant une déshydratation du mucus et une augmentation de viscosité pourrait expliquer l'hypersusceptibilité aux infections en particulier à *P. aeruginosa* chez ces patients.

Pour induire une infection, la plupart des pathogènes doivent alors surmonter cette barrière de cellules épithéliales. Ainsi, le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* n'induit pas d'infection sur un épithélium non lésé. En revanche, il a mis en place une série de stratégies afin de léser cette barrière pour d'établir une infection.

I.A. P. aeruginosa perturbateur de l'équilibre épithélial.

L'expression d'adhésines et de toxines par la bactérie est nécessaire à *P. aeruginosa* pour induire une lésion de l'épithélium et une infection. Ces facteurs de virulence sont tous impliqués dans les différentes phases de l'infection induite par *P. aeruginosa* [256].

Les **facteurs membranaires** comme les pili, le LPS ou le flagelle, sont principalement impliqués dans la phase de colonisation en permettant la fixation de la bactérie aux cellules.

La phase aiguë de l'infection est caractérisée par un rôle prédominant des **facteurs secrétés** comme l'exotoxine A, l'élastase ou les exotoxines du SSTT qui détériorent la barrière épithéliale et empêchent une réponse immunitaire efficace de l'hôte en détruisant les macrophages.

Enfin, la phase d'infection chronique (dans la mucoviscidose) est caractérisée par une diminution de la prévalence des facteurs sécrétés et un rôle de l'alginate dans la formation d'un **biofilm** [436] protégeant la population bactérienne des antibiotiques, atténuant la réponse de l'hôte et protégeant les bactéries de la phagocytose [219,220].

La modification de la structure épithéliale

Une des stratégies de *P. aeruginosa* est d'induire une déstructuration de la barrière épithéliale en dégradant les protéines formant les jonctions serrées, fondamentales dans la cohésion des cellules entre-elles [437]. Il a été montré très récemment que les toxines du SSTT (ExoS, ExoT et ExoY) pouvaient modifier la distribution de ZO-1, de l'occludine et de l'ezrine impliquées dans la formation des jonctions serrées [438].

La structure des cellules peut aussi être modifiée directement par certaines toxines. Ainsi, comme nous l'avons confirmé dans notre étude avec ExoS, certaines exotoxines du SSTT (ExoS, ExoT et ExoY) peuvent induire une modification du cytosquelette et induire un arrondissement des cellules *in vitro* [306,439]. De plus, il a été montré aussi qu'ExoT bloque la réparation épithéliale [440]. L'élastase produit une lésion de l'épithélium par une action directe sur les jonctions serrées mais aussi par modification de l'architecture cellulaire liée à une activité sur les fibres d'actine [258,407]. Enfin, certaines molécules du Quorum Sensing pourraient diminuer l'expression des protéines des jonctions serrées [352].

P. aeruginosa peut induire l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaire *in vitro* [435]. L'apoptose des cellules épithéliales à été directement liée à l'expression des toxines du SSTT. Par exemple, ExoU peut induire une nécrose directe des cellules de l'immunité mais aussi des cellules épithéliales [441]. D'autres études montre également un rôle des toxines ExoS et ExoT sur l'induction d'une apoptose des cellules épithéliales *in vitro* [318,338]. Dans notre modèle, nous avons confirmé que des souches ne possédant qu'ExoS et ExoT étaient également capables d'induire une mort cellulaire conséquente. Néanmoins, nous avons vérifié que l'absence de SSTT n'abolie pas totalement l'apoptose des cellules épithéliales, suggérant l'implication d'autres facteurs de virulence, comme par exemple l'exotoxine A ou l'élastase dans l'induction de la mort cellulaire des cellules épithéliales.

Ces modifications de la structure épithéliale et l'induction de l'apoptose permettent à la bactérie d'induire une lésion de l'épithélium facilitant ainsi l'accès basolatéral et l'adhésion des autres bactéries. En revanche, la fixation et l'ingestion de *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales provoque une réaction inflammatoire rapide. L'apoptose des cellules épithéliales provoque ainsi une desquamation des cellules qui est essentielle à la clairance de la bactérie. Dans la mucoviscidose, l'absence de ce mécanisme pourrait être responsable de l'hypersusceptibilité aux infections [442,443].

La perturbation des fonctions épithéliales

Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* peuvent moduler aussi directement les fonctions de l'épithélium. Ainsi dans le poumon de rat, le lipopolysaccharide de *P. aeruginosa* diminue la perméabilité par l'intermédiaire de la chaîne légère de la myosine (MLC) connue pour réguler les jonctions serrées [444]. Nos résultats ont aussi montré un rôle du LPS sur les modifications de transports ioniques à travers l'épithélium. L'élastase augmenterait la perméabilité de l'épithélium respiratoire cultivé *in vitro* à cause d'une attaque protéolytique des jonctions serrées [445]. Des travaux ont aussi montré des rôles des rhamnolipides [446], de la flagelline [359,369] et du SSTT [363] sur la sécrétion de fluide et le calcium intracellulaire des cellules épithéliales.

Ces différentes études montrent que *P. aeruginosa* possède un véritable arsenal pour induire des lésions et modifier les principales fonctions de régulation de l'épithélium. Ainsi, une fois la bactérie fixée aux cellules épithéliales, elle induit des lésions qui facilitent l'attachement des autres bactéries puisque l'adhésion se révèle plus conséquente sur un épithélium lésé que sur un épithélium normal [447]. La compréhension de ce mécanisme d'adhésion peut donc être un moyen efficace de lutte contre les infections.

I.B. Importance de l'adhésion

Des études ont démontré clairement que le contact était indispensable pour que les bactéries induisent des dommages aux cellules épithéliales [394]. En effet, l'exposition des cellules au surnageant de la culture bactérienne n'induit pas d'apoptose alors que le contact direct des bactéries induit une lyse rapide des cellules [448].

Les différents facteurs de virulence associés à la membrane sont impliqués dans l'adhésion, ainsi le flagelle serait impliqué dans le rapprochement de la bactérie aux cellules et pourrait aussi adhérer aux mucines dans les voies aériennes [207]. Chez *P. aeruginosa,* le pili de type IV serait la principale adhésine *via* sa fixation aux récepteurs ASGM1 [385,449,450].

Le LPS partage les mêmes récepteurs ASGM1 que les pili et serait aussi un ligand dans l'interaction avec les cellules épithéliales de la cornée [451], cependant il n'aurait qu'un rôle mineur dans l'adhésion [452]. En revanche, le LPS est un important modulateur de la réaction inflammatoire ; de plus, il pourrait se lier à la protéine CFTR provoquant ainsi l'ingestion de la bactérie par les cellules épithéliales [243], et activerait ainsi des voies de signalisation dépendante du NFκB [247].

A ces facteurs, s'ajoute la production de lectines solubles par *P. aeruginosa* qui joue un rôle important dans l'adhésion aux cellules épithéliales [291] ainsi que la production d'alginate et d'autres protéines dans certaines conditions [453]. Cette phase d'adhésion est indispensable à l'établissement de l'infection à *P. aeruginosa.*

Le principal facteur impliqué dans la virulence, le **SSTT**, permet la translocation directe des toxines dans le cytoplasme des cellules eucaryotes ; les toxines ne sont pas en contact avec le milieu extracellulaire et peuvent ainsi échapper à une reconnaissance directe par le système immunitaire de l'hôte [364]. Un étroit contact entre la bactérie et la cellule hôte est donc absolument nécessaire à l'expression du SSTT et à la translocation des toxines dans le cytoplasme de la cellule hôte. Nous avons montré également dans notre étude que l'effet protecteur de l'EGTA sur la mort cellulaire induite par *P. aeruginosa* était en partie dû à la diminution de l'adhésion qui empêchait la translocation d'ExoS dans le cytoplasme des cellules épithéliales. De plus, ExoS pourrait être aussi impliqué dans l'adhésion de *P. aeruginosa* [454].

Ceci montre que l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales est une étape clé de l'établissement d'une infection. Ainsi, la lutte contre l'adhésion a été proposée récemment comme nouvelle alternative au traitement des infections à *P. aeruginosa* [455]. Des expérimentations ont d'ailleurs montré *in vitro* et *in vivo* que certains composés comme les dextrans ou le mannose diminuaient l'adhésion des bactéries [456,457].

II. Le calcium élément majeur dans la réponse épithéliale aux infections

II.A. Le calcium régulateur de la barrière épithéliale.

Le Ca^{2+} intra et extracellulaire est impliqué dans l'assemblage des jonctions serrées [458]. En effet, le Ca^{2+} extracellulaire est nécessaire à la formation des jonctions serrées puisque l'E-cadhérine initie la formation des jonctions serrées de la cellule via le Ca^{2+} extracellulaire [459]. Siliciano et al. ont démontré que le Ca^{2+} extracellulaire était nécessaire au bon positionnement de ZO-1 à la membrane plasmique [460].

Le Ca^{2+} intracellulaire joue aussi un rôle dans l'assemblage des jonctions serrées. L'utilisation du BAPTA-AM (chélateur du Ca^{2+} intracellulaire) dans les cellules MDCK, démontre que le Ca^{2+} intracellulaire est critique pour la biogénèse des jonctions serrées [461]. En cas de dommages provoqués lors d'une ischémie dans les cellules MDCK, le Ca^{2+} intracellulaire semble être un acteur important dans la facilitation du réassemblage des

jonctions serrées. Le Ca^{2+} apparaît nécessaire à la dissociation du complexe des jonctions serrées avec le cytosquelette d'actine et ensuite il permet le réassemblage fonctionnel des jonctions serrées avec l'actine [462].

Le rôle direct du calcium intracellulaire sur l'assemblage du cytosquelette a aussi été clairement démontré par l'utilisation de chélateurs calciques intracellulaires qui induit des changements dans la morphologie cellulaire détruisant le cytosquelette d'actine [463]. Le calcium extracellulaire serait d'ailleurs aussi impliqué [464]. Dans notre première étude, l'EGTA induisait un arrondissement des cellules ainsi qu'une désorganisation des fibres d'actine.

Le calcium a aussi des rôles sur la fonction de régulation de l'hydratation du mucus puisqu'une augmentation de calcium peut activer différents canaux induisant principalement une sécrétion de chlore.

II.B. Le calcium cible de P. aeruginosa

Le calcium étant indispensable dans de nombreux signaux intracellulaires, dans le maintien de la barrière épithéliale et dans la régulation de la clairance mucociliaire, il n'est donc pas étonnant que les facteurs de virulence de la bactérie aient leurs actions dirigées vers une perturbation de l'homéostasie calcique des cellules épithéliales.

Ratner et al. ont démontré que la liaison de la bactérie aux cellules provoquait un signal calcique, ce signal étant dû à une liaison des pili aux récepteurs ASGM1 confirmant ainsi les travaux de Jacob et al. [358,363].

D'autres travaux ont aussi montré des rôles des facteurs de virulence secrétés sur le signal calcique intracellulaire comme la pyocyanine [281], et plus récemment certaines molécules du Quorum Sensing qui pourraient induire une augmentation de calcium intracellulaire [350].

Des travaux sur la flagelline ont révélé que la modification du signal calcique intracellulaire permettrait d'activer des voies de signalisation intracellulaire aboutissant à la translocation du NFκB dans le noyau et à la production de cytokines proinflammatoire par les cellules épithéliales [238]. Cependant, les rôles de la flagelline (et du flagelle) sur l'induction d'un signal calcique dans les cellules épithéliales avaient été observés par certains auteurs mais d'autres auteurs ont montré que l'activation de cette voie se ferait même sans activation de ce signal calcique [359]. Cette possibilité a été confirmée par les travaux récents de Fu et al. qui ont révélé que le signal calcique ne serait pas indispensable à l'activation de la voie du NFκB en réponse à une stimulation par la flagelline. En revanche, le

calcium aurait un rôle régulateur et induirait un effet plus important de la flagelline lorsqu'il augmente [360].

Outre son rôle sur l'induction de la réaction inflammatoire, nous avons montré dans la deuxième partie de ce travail, des rôles immédiats du **LPS** sur la régulation de l'homéostasie calcique des cellules épithéliales bronchiques.

Bien que le rôle de certaines toxines sur le calcium intracellulaire a été clairement établi, la relation entre calcium et SSTT est plus floue. *In vitro*, le SSTT est sensible à la déplétion calcique du milieu environnant. ExsE est secrété lors d'une faible concentration calcique du milieu extérieur ce qui active la machinerie du SSTT [465]. Ce système de régulation permet à *P. aeruginosa* de répondre très vite pour intoxiquer les cellules hôtes en utilisant le SSTT. Cependant, la relevance de ce signal d'activation *in vivo* est plus discutée [466]. Nous avons montré qu'en effet il existait un rôle sur l'activation transcriptionnelle du SSTT de la déplétion calcique du milieu environnant induite par un chélateur calcique. En revanche, dans notre modèle d'étude le contact cellulaire activait bien plus efficacement le SSTT. Dans ce cas, la déplétion calcique induite pas l'EGTA n'induit pas d'activation supplémentaire du SSTT.

De plus, les rôles du calcium intracellulaire des cellules épithéliales sur l'induction du SSTT sont encore peu clairs. Jacob et al. avait montré qu'ExoU pouvait induire une augmentation du calcium intracellulaire alors que d'autres études avaient montré que des souches n'exprimant pas ExoU pouvaient aussi activer un tel signal [358,363]. Le signal calcique intracellulaire et l'activation du SSTT pourraient être liés. Mais plus récemment, Cisz et al. ont clairement démontré que le calcium intracellulaire n'est pas le signal inducteur du SSTT lors du contact cellulaire [345]. Ces résultats sont en accord avec nos observations sur l'activation du SSTT qui montrent que le contact cellulaire induit une activation plus importante que la déplétion calcique. Bien que mise en évidence, la relation entre calcium intra et extracellulaire et l'activation du SSTT est encore peu comprise. La compréhension de cette voie pourrait mener à de nouveaux moyens d'inhibition de la virulence de la bactérie.

II.C. Le calcium dans la mucoviscidose

L'homéostasie calcique dans la mucoviscidose est perturbée. En effet, la mobilisation de calcium intracellulaire est exacerbée. Ce phénomène serait dû à la persistance de l'infection qui existe dans cette pathologie [189]. Cette infection persistante stimule la production de facteurs antimicrobiens et de cytokines induisant une augmentation de la mobilisation calcique ce qui provoque une hypersensibilité des cellules CF aux stimulations. De plus, les effets directs que nous avons observés du LPS et des autres facteurs sur le calcium pourraient aussi contribuer à cette stimulation calcique. Cette augmentation du signal calcique est cependant à double tranchant pour les cellules. Une augmentation de calcium

peut stimuler les canaux chlorures dépendants du calcium (CaCC) ce qui compenserait l'absence de CFTR chez ces patients restaurant ainsi partiellement le défaut de sécrétion de chlore et de clairance mucociliaire observée [189]. En revanche, cette réponse adaptative des cellules CF augmente également la réponse inflammatoire activée par une augmentation de calcium, ce qui induirait une inflammation persistante mais inefficace aboutissant à la destruction de la barrière épithéliale [467].

Plus récemment, il a été montré *in vitro* une réponse excessive de cytokines dans des cellules épithéliales de bronches CF, non corrélée à l'adhésion de *P. aeruginosa*. Ceci laisse supposer que la réponse excessive inflammatoire n'est pas seulement due à une augmentation de l'adhésion de *P. aeruginosa* [468]. Ainsi, ces études suggèrent que l'inflammation puisse être aussi une anomalie intrinsèque des patients atteints de mucoviscidose. Des travaux plus récents ont étayé cette hypothèse, l'augmentation de mobilisation du calcium intracellulaire chez les CF serait due à la rétention de la protéine CFTR mutée dans le réticulum endoplasmique. La correction de l'adressage de CFTR à la membrane plasmique par des substances comme le miglustat restaure une mobilisation calcique normale même si la protéine est tout de même défectueuse. D'autres travaux montrent que le MPB-07 qui corrige la conductance CFTR, diminue la réponse inflammatoire induite par *P. aeruginosa* dans les cellules CF [469].

III. L'augmentation de la sécrétion de fluides apicale

III.A. P. aeruginosa, modulateur de la sécrétion de fluide

En dépit de l'importance reconnue de la composition de l'ASL dans le maintien de la clairance mucociliaire, les signaux qui contrôlent l'absorption de Na^+ et la sécrétion de Cl^- et qui déterminent les mouvements d'eau restent complexes, il a été démontré par exemple que des pathogènes pouvaient eux-mêmes induire des modifications des propriétés de sécrétion de fluide des épithéliums.

Dès 1986, des effets d'une infection à *P. aeruginosa* sur les transports épithéliaux ont été mis en évidence [367]. Depuis, de nombreux travaux ont montré différents effets de *P. aeruginosa* sur la modulation de ces transports.

En effet, les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* tels les **rhamnolipides** [278], la **flagelline** [359] et l'**Exotoxine A** [275] pourraient diminuer l'absorption active de sodium [367], probablement par une action directe sur les ENaCs. L'importance de l'adhésion dans ces effets a été démontrée car les altérations induites par *P. aeruginosa* nécessitent une interaction directe de la bactérie [368]. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons

démontré des rôles du LPS sur l'activation des transports de chlore dépendants de CFTR et probablement des CaCC. Des effets de *P. aeruginosa* ainsi que de la flagelline avaient déjà été démontrés auparavant sur l'activation des transports de chlore [369,430]. De plus, les infections bactériennes induisent une réponse inflammatoire des cellules épithéliales et il a été montré que les produits d'inflammation contribuent aussi à l'activation de la sécrétion d'ions [161,470].

Les modifications de transports de fluide par *P. aeruginosa* démontrées jusqu'ici induisent une inhibition d'absorption de sodium et une augmentation de la sécrétion de chlore. Ces modifications sont en faveur d'une stimulation de la sécrétion de fluide vers le compartiment muqueux et donc en faveur d'une hydratation de l'ASL.

III.B. A qui profite le maintien d'une sécrétion de fluide ?

L'influence d'une infection à *P. aeruginosa* provoquant une augmentation de la sécrétion de fluide vers le compartiment muqueux, on peut se poser la question de savoir à qui profite cette réaction ?

Cette augmentation de sécrétion peut être un avantage pour l'hôte car cela améliore la clairance et donc permet une meilleure élimination du pathogène. Cette réaction serait particulièrement bénéfique pour l'hôte dans le cas de la mucoviscidose. Les épithéliums CF sont hautement sensibles aux infections du fait d'un défaut de sécrétion de fluide apicale et d'un épaississement du mucus, l'augmentation de sécrétion en réponse aux bactéries pourrait être un mécanisme de défense passif de l'épithélium. D'ailleurs, la restauration de la sécrétion de chlore par le MPB-07 peut contrôler la production d'IL-8 induite par *P. aeruginosa* exacerbée dans la mucoviscidose [469].

A l'inverse, on peut imaginer que l'augmentation de fluide induite par les bactéries soit en faveur d'une diffusion plus facile du pathogène et d'une diminution de l'efficacité des défenses de l'hôte.

Ces mécanismes restent donc encore à éclaircir afin de comprendre le réel impact qu'ils ont sur les infections à *P. aeruginosa*.

Conclusions

Nous avons montré, dans notre modèle de co-cultures *in vitro*, un effet protecteur d'un chélateur calcique (EGTA) sur la mort cellulaire induite par le SSTT de *P. aeruginosa* bien que la chélation du calcium soit couramment rapportée comme activatrice du SSTT. Nous avons montré que l'EGTA agissait par une modification de l'adhésion bactérienne aux

cellules ainsi qu'un effet probable au niveau du cytosquelette. Il serait donc intéressant d'approfondir les effets des chélateurs parallèles à la chélation elle-même et de poursuivre l'exploration de cet effet protecteur observé. Il a été montré des effets différents sur la désorganisation du cytosquelette induit par la souche CHA et par l'EGTA, Il serait nécessaire d'explorer les interactions probables qu'il existe lors de la désorganisation.

Nous avons également démontré sur notre modèle *in vitro*, un effet direct du LPS de *P. aeruginosa* sur le taux de calcium intracellulaire et aussi sur l'activation d'une sécrétion de chlore. Ainsi, nous avons mis en évidence que le composé majoritaire des membranes externe induisait directement des effets immédiats sur les cellules épithéliales autres que la stimulation d'une réponse inflammatoire. En revanche, le mécanisme mis en place dans cette réponse est encore flou. Il apparait indispensable de savoir quel est le récepteur capable de lier le LPS impliqué dans cette réponse, et en particulier déterminer le rôle des ASGM1 et TLR.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Malm L. and Torelmalm NG. 1988. The upper respiratory tract in pulmonary diseases and disorders.

[2] Fishman, A. P. 1988. Structure and function in pulmonary diseases and disorders.

[3] Wanner, A., M. Salathe, and T. G. O'Riordan. Mucociliary clearance in the airways. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1996; 154:1868-1902.

[4] Mercer, R. R., M. L. Russell, V. L. Roggli, and J. D. Crapo. Cell number and distribution in human and rat airways. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1994; 10:613-624.

[5] McDowell, E. M., L. A. Barrett, F. Glavin, C. C. Harris, and B. F. Trump. The respiratory epithelium. I. Human bronchus. J. Natl. Cancer Inst. 1978; 61:539-549.

[6] Jeffery, P. K. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. Am. Rev. Respir. Dis. 1983; 128:S14-S20.

[7] Boers, J. E., A. W. Ambergen, and F. B. Thunnissen. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1998; 157:2000-2006.

[8] Boers, J. E., A. W. Ambergen, and F. B. Thunnissen. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1999; 159:1585-1591.

[9] Godfrey, R. W. Human airway epithelial tight junctions. Microsc. Res. Tech. 1997; 38:488-499.

[10] Guttman, J. A., F. N. Samji, Y. Li, A. W. Vogl, and B. B. Finlay. Evidence that tight junctions are disrupted due to intimate bacterial contact and not inflammation during attaching and effacing pathogen infection in vivo. Infect. Immun. 2006; 74:6075-6084.

[11] Ivanov, D. B., M. P. Philippova, and V. A. Tkachuk. Structure and functions of classical cadherins. Biochemistry (Mosc.) 2001; 66:1174-1186.

[12] Dusek, R. L., L. M. Godsel, and K. J. Green. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. J. Dermatol. Sci. 2007; 45:7-21.

[13] Green, K. J. and J. C. Jones. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. FASEB J. 1996; 10:871-881.

[14] Emery, N., G. A. Place, S. Dodd, M. Lhermitte, G. David, G. Lamblin, J. M. Perini, A. M. Page, R. L. Hall, and P. Roussel. Mucous and serous secretions of human bronchial epithelial cells in secondary culture. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995; 12:130-141.

[15] Jeffery, P. K. and D. Li. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. Eur. Respir. J. 1997; 10:1655-1662.

[16] Kaliner, M., Z. Marom, C. Patow, and J. Shelhamer. Human respiratory mucus. J. Allergy Clin. Immunol. 1984; 73:318-323.

[17] Houtmeyers, E., R. Gosselink, G. Gayan-Ramirez, and M. Decramer. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. Eur. Respir. J. 1999; 13:1177-1188.

[18] Donaldson, S. H., M. Picher, and R. C. Boucher. Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002; 26:209-215.

[19] Jenssen, H., P. Hamill, and R. E. Hancock. Peptide antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 2006; 19:491-511.

[20] Knowles, M. R. and R. C. Boucher. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J. Clin. Invest 2002; 109:571-577.

[21] Laube, D. M., S. Yim, L. K. Ryan, K. O. Kisich, and G. Diamond. Antimicrobial peptides in the airway. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2006; 306:153-182.

[22] Hajjar, A. M., R. K. Ernst, J. H. Tsai, C. B. Wilson, and S. I. Miller. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. Nat. Immunol. 2002; 3:354-359.

[23] Becker, M. N., G. Diamond, M. W. Verghese, and S. H. Randell. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. J. Biol. Chem. 2000; 275:29731-29736.

[24] Cooper, P., S. Potter, B. Mueck, S. Yousefi, and G. Jarai. Identification of genes induced by inflammatory cytokines in airway epithelium. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2001; 280:L841-L852.

[25] Adler, K. B., B. M. Fischer, D. T. Wright, L. A. Cohn, and S. Becker. Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994; 725:128-145.

[26] Saba, S., G. Soong, S. Greenberg, and A. Prince. Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002; 27:561-567.

[27] Tarran, R. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. Proc. Am. Thorac. Soc. 2004; 1:42-46.

[28] Boucher, R. C. Human airway ion transport. Part one. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1994; 150:271-281.

[29] Canessa, C. M., A. M. Merillat, and B. C. Rossier. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. Am. J. Physiol 1994; 267:C1682-C1690.

[30] Oh, Y., P. R. Smith, A. L. Bradford, D. Keeton, and D. J. Benos. Regulation by phosphorylation of purified epithelial Na+ channels in planar lipid bilayers. Am. J. Physiol 1993; 265:C85-C91.

[31] Garty, H. and L. G. Palmer. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. Physiol Rev. 1997; 77:359-396.

[32] Prat, A. G., A. M. Bertorello, D. A. Ausiello, and H. F. Cantiello. Activation of epithelial Na+ channels by protein kinase A requires actin filaments. Am. J. Physiol 1993; 265:C224-C233.

[33] Barbry, P. and M. Lazdunski. Structure and regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. Ion Channels 1996; 4:115-167.

[34] Briel, M., R. Greger, and K. Kunzelmann. Cl- transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na+ channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC. J. Physiol 1998; 508 (Pt 3):825-836.

[35] Boucher, R. C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Eur. Respir. J. 2004; 23:146-158.

[36] Vallet, V., A. Chraibi, H. P. Gaeggeler, J. D. Horisberger, and B. C. Rossier. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. Nature 1997; 389:607-610.

[37] Tarran, R., L. Trout, S. H. Donaldson, and R. C. Boucher. Soluble mediators, not cilia, determine airway surface liquid volume in normal and cystic fibrosis superficial airway epithelia. J. Gen. Physiol 2006; 127:591-604.

[38] Bachhuber, T., J. Almaca, F. Aldehni, A. Mehta, M. D. Amaral, R. Schreiber, and K. Kunzelmann. Regulation of the epithelial Na+ channel by the protein kinase CK2. J. Biol. Chem. 2008; 283:13225-13232.

[39] Haws, C., M. E. Krouse, Y. Xia, D. C. Gruenert, and J. J. Wine. CFTR channels in immortalized human airway cells. Am. J. Physiol 1992; 263:L692-L707.

[40] Yoshimura, K., H. Nakamura, B. C. Trapnell, C. S. Chu, W. Dalemans, A. Pavirani, J. P. Lecocq, and R. G. Crystal. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. Nucleic Acids Res. 1991; 19:5417-5423.

[41] Hanrahan, J. W. and M. A. Wioland. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. Proc. Am. Thorac. Soc. 2004; 1:17-21.

[42] Bear, C. E., F. Duguay, A. L. Naismith, N. Kartner, J. W. Hanrahan, and J. R. Riordan. Cl- channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene. J. Biol. Chem. 1991; 266:19142-19145.

[43] Linsdell, P., J. A. Tabcharani, and J. W. Hanrahan. Multi-Ion mechanism for ion permeation and block in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. J. Gen. Physiol 1997; 110:365-377.

[44] Gadsby, D. C. and A. C. Nairn. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. Physiol Rev. 1999; 79:S77-S107.

[45] Yurko-Mauro, K. A. and W. W. Reenstra. Prostaglandin F2alpha stimulates CFTR activity by PKA- and PKC-dependent phosphorylation. Am. J. Physiol 1998; 275:C653-C660.

[46] Grygorczyk, R., M. Abramovitz, Y. Boie, L. Bastien, and M. Adam. Detection of adenylate cyclase-coupled receptors in Xenopus oocytes by coexpression with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Anal. Biochem. 1995; 227:27-31.

[47] Lam, R. S., E. M. App, D. Nahirney, A. J. Szkotak, M. A. Vieira-Coelho, M. King, and M. Duszyk. Regulation of Cl- secretion by alpha2-adrenergic receptors in mouse colonic epithelium. J. Physiol 2003; 548:475-484.

[48] Schultz, B. D., A. K. Singh, D. C. Devor, and R. J. Bridges. Pharmacology of CFTR chloride channel activity. Physiol Rev. 1999; 79:S109-S144.

[49] Sheppard, D. N. and K. A. Robinson. Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channels expressed in a murine cell line. J. Physiol 1997; 503 (Pt 2):333-346.

[50] McDonough, S., N. Davidson, H. A. Lester, and N. A. McCarty. Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block. Neuron 1994; 13:623-634.

[51] Sheppard, D. N. CFTR channel pharmacology: novel pore blockers identified by high-throughput screening. J. Gen. Physiol 2004; 124:109-113.

[52] Mall, M., M. Bleich, J. Kuehr, M. Brandis, R. Greger, and K. Kunzelmann. CFTR-mediated inhibition of epithelial Na+ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. Am. J. Physiol 1999; 277:G709-G716.

[53] Schreiber, R., A. Boucherot, B. Murle, J. Sun, and K. Kunzelmann. Control of epithelial ion transport by Cl- and PDZ proteins. J. Membr. Biol. 2004; 199:85-98.

[54] Stutts, M. J., C. M. Canessa, J. C. Olsen, M. Hamrick, J. A. Cohn, B. C. Rossier, and R. C. Boucher. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science 1995; 269:847-850.

[55] Walsh, D. E., B. J. Harvey, and V. Urbach. CFTR regulation of intracellular calcium in normal and cystic fibrosis human airway epithelia. J. Membr. Biol. 2000; 177:209-219.

[56] Kunzelmann, K. and R. Schreiber. CFTR, a regulator of channels. J. Membr. Biol. 1999; 168:1-8.

[57] Schwiebert, E. M., D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, and W. B. Guggino. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. Physiol Rev. 1999; 79:S145-S166.

[58] Dean, M., B. Gerrard, C. Stewart, L. Krueger, D. Holsclaw, L. Quittell, V. Baranov, N. Kapronov, M. Leppert, J. Amos, and . Identification of cystic fibrosis mutations. Adv. Exp. Med. Biol. 1991; 290:45-51.

[59] Agnel, M., T. Vermat, and J. M. Culouscou. Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. FEBS Lett. 1999; 455:295-301.

[60] Jeulin, C., R. Guadagnini, and F. Marano. Oxidant stress stimulates Ca2+-activated chloride channels in the apical activated membrane of cultured nonciliated human nasal epithelial cells. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2005; 289:L636-L646.

[61] Marunaka, Y. and D. C. Eaton. Chloride channels in the apical membrane of a distal nephron A6 cell line. Am. J. Physiol 1990; 258:C352-C368.

[62] Koumi, S., R. Sato, and T. Aramaki. Characterization of the calcium-activated chloride channel in isolated guinea-pig hepatocytes. J. Gen. Physiol 1994; 104:357-373.

[63] Marty, A., Y. P. Tan, and A. Trautmann. Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. J. Physiol 1984; 357:293-325.

[64] Tarran, R., M. E. Loewen, A. M. Paradiso, J. C. Olsen, M. A. Gray, B. E. Argent, R. C. Boucher, and S. E. Gabriel. Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca2+-activated Cl- conductances. J. Gen. Physiol 2002; 120:407-418.

[65] Clarke, L. L., B. R. Grubb, J. R. Yankaskas, C. U. Cotton, A. McKenzie, and R. C. Boucher. Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in Cftr(-/-) mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1994; 91:479-483.

[66] Kunzelmann, K., R. Kubitz, M. Grolik, R. Warth, and R. Greger. Small-conductance Cl- channels in HT29 cells: activation by Ca2+, hypotonic cell swelling and 8-Br-cGMP. Pflugers Arch. 1992; 421:238-246.

[67] Jentsch, T. J., V. Stein, F. Weinreich, and A. A. Zdebik. Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiol Rev. 2002; 82:503-568.

[68] Schwiebert, E. M., M. M. Morales, S. Devidas, M. E. Egan, and W. B. Guggino. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1998; 95:2674-2679.

[69] White, M. M. and M. Aylwin. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca2(+)-activated Cl- channels in Xenopus oocytes. Mol. Pharmacol. 1990; 37:720-724.

[70] Frings, S., D. Reuter, and S. J. Kleene. Neuronal Ca2+ -activated Cl- channels--homing in on an elusive channel species. Prog. Neurobiol. 2000; 60:247-289.

[71] Arreola, J., T. Begenisich, K. Nehrke, H. V. Nguyen, K. Park, L. Richardson, B. Yang, B. C. Schutte, F. S. Lamb, and J. E. Melvin. Secretion and cell volume regulation by salivary acinar cells from mice lacking expression of the Clcn3 Cl- channel gene. J. Physiol 2002; 545:207-216.

[72] Sun, H., T. Tsunenari, K. W. Yau, and J. Nathans. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2002; 99:4008-4013.

[73] Fischmeister, R. and H. C. Hartzell. Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. J. Physiol 2005; 562:477-491.

[74] Suzuki, M. and A. Mizuno. A novel human Cl(-) channel family related to Drosophila flightless locus. J. Biol. Chem. 2004; 279:22461-22468.

[75] Eggermont, J. Calcium-activated chloride channels: (un)known, (un)loved? Proc. Am. Thorac. Soc. 2004; 1:22-27.

[76] Cunningham, S. A., M. S. Awayda, J. K. Bubien, I. I. Ismailov, M. P. Arrate, B. K. Berdiev, D. J. Benos, and C. M. Fuller. Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. J. Biol. Chem. 1995; 270:31016-31026.

[77] Toda, M., M. K. Tulic, R. C. Levitt, and Q. Hamid. A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 2002; 109:246-250.

[78] Fuller, C. M., H. L. Ji, A. Tousson, R. C. Elble, B. U. Pauli, and D. J. Benos. Ca(2+)-activated Cl(-) channels: a newly emerging anion transport family. Pflugers Arch. 2001; 443 Suppl 1:S107-S110.

[79] Gruber, A. D., R. C. Elble, H. L. Ji, K. D. Schreur, C. M. Fuller, and B. U. Pauli. Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca2+-activated Cl- channel proteins. Genomics 1998; 54:200-214.

[80] Ji, H. L., M. D. DuVall, H. K. Patton, C. L. Satterfield, C. M. Fuller, and D. J. Benos. Functional expression of a truncated Ca(2+)-activated Cl- channel and activation by phorbol ester. Am. J. Physiol 1998; 274:C455-C464.

[81] Mundhenk, L., M. Alfalah, R. C. Elble, B. U. Pauli, H. Y. Naim, and A. D. Gruber. Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins. J. Biol. Chem. 2006; 281:30072-30080.

[82] Papassotiriou, J., J. Eggermont, G. Droogmans, and B. Nilius. Ca(2+)-activated Cl-channels in Ehrlich ascites tumor cells are distinct from mCLCA1, 2 and 3. Pflugers Arch. 2001; 442:273-279.

[83] Frizzell, R. A., D. R. Halm, G. Rechkemmer, and R. L. Shoemaker. Chloride channel regulation in secretory epithelia. Fed. Proc. 1986; 45:2727-2731.

[84] Welsh, M. J. An apical-membrane chloride channel in human tracheal epithelium. Science 1986; 232:1648-1650.

[85] Egan, M., T. Flotte, S. Afione, R. Solow, P. L. Zeitlin, B. J. Carter, and W. B. Guggino. Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. Nature 1992; 358:581-584.

[86] Schwiebert, E. M., M. E. Egan, T. H. Hwang, S. B. Fulmer, S. S. Allen, G. R. Cutting, and W. B. Guggino. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. Cell 1995; 81:1063-1073.

[87] Xia, Y., C. M. Haws, and J. J. Wine. Disruption of monolayer integrity enables activation of a cystic fibrosis "bypass" channel in human airway epithelia. Nat. Med. 1997; 3:802-805.

[88] Szkotak, A. J., S. F. Man, and M. Duszyk. The role of the basolateral outwardly rectifying chloride channel in human airway epithelial anion secretion. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003; 29:710-720.

[89] Itani, O. A., F. S. Lamb, J. E. Melvin, and M. J. Welsh. Basolateral chloride current in human airway epithelia. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2007; 293:L991-L999.

[90] Fischer, H., B. Illek, W. E. Finkbeiner, and J. H. Widdicombe. Basolateral Cl channels in primary airway epithelial cultures. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2007; 292:L1432-L1443.

[91] Wehner, F. Cell volume-regulated cation channels. Contrib. Nephrol. 2006; 152:25-53.

[92] Urbach, V., E. Van Kerkhove, D. Maguire, and B. J. Harvey. Cross-talk between ATP-regulated K+ channels and Na+ transport via cellular metabolism in frog skin principal cells. J. Physiol 1996; 491 (Pt 1):99-109.

[93] Matsumura, Y., B. Cohen, W. B. Guggino, and G. Giebisch. Electrical effects of potassium and bicarbonate on proximal tubule cells of Necturus. J. Membr. Biol. 1984; 79:145-152.

[94] Mall, M., A. Wissner, R. Schreiber, J. Kuehr, H. H. Seydewitz, M. Brandis, R. Greger, and K. Kunzelmann. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl(-) secretion in human airway epithelia. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000; 23:283-289.

[95] Welsh, M. J. and J. D. McCann. Intracellular calcium regulates basolateral potassium channels in a chloride-secreting epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1985; 82:8823-8826.

[96] McCann, J. D., J. Matsuda, M. Garcia, G. Kaczorowski, and M. J. Welsh. Basolateral K+ channels in airway epithelia. I. Regulation by Ca2+ and block by charybdotoxin. Am. J. Physiol 1990; 258:L334-L342.

[97] Ridge, F. P., M. Duszyk, and A. S. French. A large conductance, Ca2+-activated K+ channel in a human lung epithelial cell line (A549). Biochim. Biophys. Acta 1997; 1327:249-258.

[98] Fernandez-Fernandez, J. M., M. Nobles, A. Currid, E. Vazquez, and M. A. Valverde. Maxi K+ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. Am. J. Physiol Cell Physiol 2002; 283:C1705-C1714.

[99] Papassotiriou, J., R. Kohler, J. Prenen, H. Krause, M. Akbar, J. Eggermont, M. Paul, A. Distler, B. Nilius, and J. Hoyer. Endothelial K(+) channel lacks the Ca(2+) sensitivity-regulating beta subunit. FASEB J. 2000; 14:885-894.

[100] Jeong, J. S., H. J. Lee, J. S. Jung, S. H. Shin, Y. J. Son, J. H. Yoon, S. H. Lee, H. S. Lee, I. Yun, and T. H. Hwang. Characterization of inwardly rectifying K(+) conductance across the basolateral membrane of rat tracheal epithelia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 288:914-920.

[101] Wu, J. V., M. E. Krouse, A. Rustagi, N. S. Joo, and J. J. Wine. An inwardly rectifying potassium channel in apical membrane of Calu-3 cells. J. Biol. Chem. 2004; 279:46558-46565.

[102] Leroy, C., A. Dagenais, Y. Berthiaume, and E. Brochiero. Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2004; 286:L1027-L1037.

[103] Leroy, C., A. Prive, J. C. Bourret, Y. Berthiaume, P. Ferraro, and E. Brochiero. 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 2006; 291:L1207-L1219.

[104] Cowley, E. A. and P. Linsdell. Characterization of basolateral K+ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. J. Physiol 2002; 538:747-757.

[105] Mall, M., T. Gonska, J. Thomas, R. Schreiber, H. H. Seydewitz, J. Kuehr, M. Brandis, and K. Kunzelmann. Modulation of Ca2+-activated Cl- secretion by basolateral K+ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. Pediatr. Res. 2003; 53:608-618.

[106] Jorgensen, P. L., K. O. Hakansson, and S. J. Karlish. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. Annu. Rev. Physiol 2003; 65:817-849.

[107] Miller, T. J. and P. B. Davis. FXYD5 modulates Na+ absorption and is increased in cystic fibrosis airway epithelia. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2008; 294:L654-L664.

[108] O'Grady, S. M., H. C. Palfrey, and M. Field. Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. Am. J. Physiol 1987; 253:C177-C192.

[109] Soybel, D. I., M. B. Davis, and L. Y. Cheung. Characteristics of basolateral Cl-transport by gastric surface epithelium in Necturus antral mucosa. Am. J. Physiol 1993; 264:G910-G920.

[110] Palfrey, H. C., P. Greengard, and P. W. Feit. Specific inhibition by "loop" diuretics of an anion-dependent Na+ + K+ cotransport system in avian erythrocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1980; 341:134-138.

[111] Haas, M. and B. Forbush, III. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. Annu. Rev. Physiol 2000; 62:515-534.

[112] Haas, M. and B. Forbush, III. The Na-K-Cl cotransporters. J. Bioenerg. Biomembr. 1998; 30:161-172.

[113] Paradiso, A. M. Identification of Na(+)-H+ exchange in human normal and cystic fibrotic ciliated airway epithelium. Am. J. Physiol 1992; 262:L757-L764.

[114] Harvey, B. J. and J. Ehrenfeld. Epithelial pH and ion transport regulation by proton pumps and exchangers. Ciba Found. Symp. 1988; 139:139-164.

[115] Malo, M. E. and L. Fliegel. Physiological role and regulation of the Na+/H+ exchanger. Can. J. Physiol Pharmacol. 2006; 84:1081-1095.

[116] Dudeja, P. K., N. Hafez, S. Tyagi, C. A. Gailey, M. Toofanfard, W. A. Alrefai, T. M. Nazir, K. Ramaswamy, and F. J. Al Bazzaz. Expression of the Na+/H+ and Cl-/HCO-3 exchanger isoforms in proximal and distal human airways. Am. J. Physiol 1999; 276:L971-L978.

[117] Tse, M., S. Levine, C. Yun, S. Brant, L. T. Counillon, J. Pouyssegur, and M. Donowitz. Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na+/H+ exchanger gene family. J. Membr. Biol. 1993; 135:93-108.

[118] Shin, J. H., W. Namkung, C. H. Kim, J. Y. Choi, J. B. Yoo, K. D. Lee, J. G. Lee, M. G. Lee, and J. H. Yoon. Expression of Na+/H+ exchanger isoforms in normal human nasal epithelial cells and functional activity of Na+/H+ exchanger 1 in intracellular pH regulation. Acta Otolaryngol. 2005; 125:286-292.

[119] Sardet, C., P. Fafournoux, and J. Pouyssegur. Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na+/H+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. J. Biol. Chem. 1991; 266:19166-19171.

[120] Aronson, P. S., J. Nee, and M. A. Suhm. Modifier role of internal H+ in activating the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. Nature 1982; 299:161-163.

[121] Bertrand, B., S. Wakabayashi, T. Ikeda, J. Pouyssegur, and M. Shigekawa. The Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. J. Biol. Chem. 1994; 269:13703-13709.

[122] Paris, S. and J. Pouyssegur. Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na+/H+ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. J. Biol. Chem. 1983; 258:3503-3508.

[123] Masereel, B., L. Pochet, and D. Laeckmann. An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. Eur. J. Med. Chem. 2003; 38:547-554.

[124] Boucher, R. C. Human airway ion transport. Part two. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1994; 150:581-593.

[125] Rochelle, L. G., D. C. Li, H. Ye, E. Lee, C. R. Talbot, and R. C. Boucher. Distribution of ion transport mRNAs throughout murine nose and lung. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2000; 279:L14-L24.

[126] Tarran, R., B. R. Grubb, J. T. Gatzy, C. W. Davis, and R. C. Boucher. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. J. Gen. Physiol 2001; 118:223-236.

[127] Kunzelmann, K., R. Schreiber, and A. Boucherot. Mechanisms of the inhibition of epithelial Na(+) channels by CFTR and purinergic stimulation. Kidney Int. 2001; 60:455-461.

[128] Schwiebert, E. M., E. D. Potter, T. H. Hwang, J. S. Woo, C. Ding, W. Qiu, W. B. Guggino, M. A. Levine, and S. E. Guggino. cGMP stimulates sodium and chloride currents in rat tracheal airway epithelia. Am. J. Physiol 1997; 272:C911-C922.

[129] Loussouarn, G., S. Demolombe, R. Mohammad-Panah, D. Escande, and I. Baro. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K+ currents. Am. J. Physiol 1996; 271:C1565-C1573.

[130] Knowles, A. F., R. E. Isler, and J. F. Reece. The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta 1983; 731:88-96.

[131] Boucher, R. C., M. J. Stutts, M. R. Knowles, L. Cantley, and J. T. Gatzy. Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. J. Clin. Invest 1986; 78:1245-1252.

[132] Dagenais, A., C. Denis, M. F. Vives, S. Girouard, C. Masse, T. Nguyen, T. Yamagata, C. Grygorczyk, R. Kothary, and Y. Berthiaume. Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na+-K+-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2001; 281:L217-L230.

[133] Becq, F., M. D. Merten, M. A. Voelckel, M. Gola, and C. Figarella. Characterization of cAMP dependent CFTR-chloride channels in human tracheal gland cells. FEBS Lett. 1993; 321:73-78.

[134] Widdicombe, J. H. Cystic fibrosis and beta-adrenergic response of airway epithelial cell cultures. Am. J. Physiol 1986; 251:R818-R822.

[135] Cotten, J. F. and M. J. Welsh. Covalent modification of the regulatory domain irreversibly stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J. Biol. Chem. 1997; 272:25617-25622.

[136] Warth, R., N. Riedemann, M. Bleich, W. van Driessche, A. E. Busch, and R. Greger. The cAMP-regulated and 293B-inhibited K+ conductance of rat colonic crypt base cells. Pflugers Arch. 1996; 432:81-88.

[137] Hansen, M., S. Boitano, E. R. Dirksen, and M. J. Sanderson. A role for phospholipase C activity but not ryanodine receptors in the initiation and propagation of intercellular calcium waves. J. Cell Sci. 1995; 108 (Pt 7):2583-2590.

[138] De, P., I, I. Brouns, I. Pintelon, J. P. Timmermans, and D. Adriaensen. Pulmonary expression of voltage-gated calcium channels: special reference to sensory airway receptors. Histochem. Cell Biol. 2007; 128:301-316.

[139] Boitano, S., E. R. Dirksen, and M. J. Sanderson. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. Science 1992; 258:292-295.

[140] Putney, J. W., Jr. and C. M. Ribeiro. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. Cell Mol. Life Sci. 2000; 57:1272-1286.

[141] Heilig, E. A., K. J. Thompson, R. M. Molina, A. R. Ivanov, J. D. Brain, and M. Wessling-Resnick. Manganese and iron transport across pulmonary epithelium. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2006; 290:L1247-L1259.

[142] Chubanov, V., S. Waldegger, M. Schnitzler, H. Vitzthum, M. C. Sassen, H. W. Seyberth, M. Konrad, and T. Gudermann. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2004; 101:2894-2899.

[143] Fernandez-Fernandez, J. M., Y. N. Andrade, M. Arniges, J. Fernandes, C. Plata, F. Rubio-Moscardo, E. Vazquez, and M. A. Valverde. Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance, calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines. Pflugers Arch. 2008.

[144] Chung, M. K., H. Lee, and M. J. Caterina. Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. J. Biol. Chem. 2003; 278:32037-32046.

[145] Tiruppathi, C., G. U. Ahmmed, S. M. Vogel, and A. B. Malik. Ca2+ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. Microcirculation. 2006; 13:693-708.

[146] Hoenderop, J. G., B. Nilius, and R. J. Bindels. Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation. Pflugers Arch. 2003; 446:304-308.

[147] Peng, J. B., E. M. Brown, and M. A. Hediger. Epithelial Ca2+ entry channels: transcellular Ca2+ transport and beyond. J. Physiol 2003; 551:729-740.

[148] Vennekens, R., J. G. Hoenderop, J. Prenen, M. Stuiver, P. H. Willems, G. Droogmans, B. Nilius, and R. J. Bindels. Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. J. Biol. Chem. 2000; 275:3963-3969.

[149] Vennekens, R., T. Voets, R. J. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius. Current understanding of mammalian TRP homologues. Cell Calcium 2002; 31:253-264.

[150] Hoenderop, J. G., B. Nilius, and R. J. Bindels. Calcium absorption across epithelia. Physiol Rev. 2005; 85:373-422.

[151] Bahra, P., J. Mesher, S. Li, C. T. Poll, and H. Danahay. P2Y2-receptor-mediated activation of a contralateral, lanthanide-sensitive calcium entry pathway in the human airway epithelium. Br. J. Pharmacol. 2004; 143:91-98.

[152] Strehler, E. E., A. J. Caride, A. G. Filoteo, Y. Xiong, J. T. Penniston, and A. Enyedi. Plasma membrane Ca2+ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007; 1099:226-236.

[153] Philipson, K. D., D. A. Nicoll, M. Ottolia, B. D. Quednau, H. Reuter, S. John, and Z. Qiu. The Na+/Ca2+ exchange molecule: an overview. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002; 976:1-10.

[154] Martonosi, A. N. and S. Pikula. The structure of the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Acta Biochim. Pol. 2003; 50:337-365.

[155] Garty, H. and C. Asher. Ca2+-dependent, temperature-sensitive regulation of Na+ channels in tight epithelia. A study using membrane vesicles. J. Biol. Chem. 1985; 260:8330-8335.

[156] Guo, F. H., H. R. De Raeve, T. W. Rice, D. J. Stuehr, F. B. Thunnissen, and S. C. Erzurum. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1995; 92:7809-7813.

[157] Stoos, B. A. and J. L. Garvin. Actions of nitric oxide on renal epithelial transport. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol 1997; 24:591-594.

[158] Izzo, A. A., N. Mascolo, and F. Capasso. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. Dig. Dis. Sci. 1998; 43:1605-1620.

[159] Tamaoki, J., M. Kondo, A. Sakai, E. Tagaya, H. Takemura, and K. Konno. Tachykinins stimulate nitric oxide generation by canine cultured tracheal epithelium. Regul. Pept. 1995; 60:55-60.

[160] Elmer, H. L., K. G. Brady, M. L. Drumm, and T. J. Kelley. Nitric oxide-mediated regulation of transepithelial sodium and chloride transport in murine nasal epithelium. Am. J. Physiol 1999; 276:L466-L473.

[161] Jain, L., X. J. Chen, L. A. Brown, and D. C. Eaton. Nitric oxide inhibits lung sodium transport through a cGMP-mediated inhibition of epithelial cation channels. Am. J. Physiol 1998; 274:L475-L484.

[162] Jain, B., I. Rubinstein, R. A. Robbins, and J. H. Sisson. TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. Am. J. Physiol 1995; 268:L911-L917.

[163] Lazrak, A., A. Samanta, and S. Matalon. Biophysical properties and molecular characterization of amiloride-sensitive sodium channels in A549 cells. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2000; 278:L848-L857.

[164] Duszyk, M. Regulation of anion secretion by nitric oxide in human airway epithelial cells. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2001; 281:L450-L457.

[165] Lubman, R. L. and E. D. Crandall. Polarized distribution of Na(+)-H+ antiport activity in rat alveolar epithelial cells. Am. J. Physiol 1994; 266:L138-L147.

[166] Lubman, R. L. and E. D. Crandall. Regulation of intracellular pH in alveolar epithelial cells. Am. J. Physiol 1992; 262:L1-14.

[167] Al Bazzaz, F. J., N. Hafez, S. Tyagi, C. A. Gailey, M. Toofanfard, W. A. Alrefai, T. M. Nazir, K. Ramaswamy, and P. K. Dudeja. Detection of Cl--. JOP. 2001; 2:285-290.

[168] Palmer, L. G. Intracellular pH as a regulator of Na + transport. J. Membr. Biol. 2001; 184:305-311.

[169] Poulsen, J. H. and T. E. Machen. HCO3-dependent pHi regulation in tracheal epithelial cells. Pflugers Arch. 1996; 432:546-554.

[170] Qu, Z. and H. C. Hartzell. Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. J. Gen. Physiol 2000; 116:825-844.

[171] Sutto, Z., G. E. Conner, and M. Salathe. Regulation of human airway ciliary beat frequency by intracellular pH. J. Physiol 2004; 560:519-532.

[172] Laitinen, L. A., M. Heino, A. Laitinen, T. Kava, and T. Haahtela. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1985; 131:599-606.

[173] McNamara, N., M. Gallup, A. Khong, A. Sucher, I. Maltseva, J. Fahy, and C. Basbaum. Adenosine up-regulation of the mucin gene, MUC2, in asthma. FASEB J. 2004; 18:1770-1772.

[174] Wang, K., F. Q. Wen, Y. L. Feng, X. M. Ou, D. Xu, J. Yang, and Z. P. Deng. Increased expression of human calcium-activated chloride channel 1 gene is correlated with mucus overproduction in Chinese asthmatic airway. Cell Biol. Int. 2007; 31:1388-1395.

[175] Bousquet, J., P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am. J. Respir. Crit Care Med. 2000; 161:1720-1745.

[176] Chanez, P., A. M. Vignola, P. Vic, F. Guddo, G. Bonsignore, P. Godard, and J. Bousquet. Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1999; 159:588-595.

[177] Chiappara, G., R. Gagliardo, A. Siena, M. R. Bonsignore, J. Bousquet, G. Bonsignore, and A. M. Vignola. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2001; 1:85-93.

[178] Wang, K., Y. L. Feng, F. Q. Wen, X. R. Chen, X. M. Ou, D. Xu, J. Yang, and Z. P. Deng. Increased expression of human calcium-activated chloride channel 1 is correlated with mucus overproduction in the airways of Chinese patients with chronic obstructive pulmonary disease. Chin Med. J. (Engl.) 2007; 120:1051-1057.

[179] Hauber, H. P., C. Bergeron, A. Tsicopoulos, B. Wallaert, R. Olivenstein, K. J. Holroyd, R. C. Levitt, and Q. Hamid. Increased expression of the calcium-activated chloride channel hCLCA1 in airways of patients with obstructive chronic bronchitis. Can. Respir. J. 2005; 12:143-146.

[180] Li, W., Y. J. Xu, and Z. X. Zhang. [Detection of the mRNA level of the subunits of amiloride-sensitive Na+ channel in human bronchial epithelium cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease]. Zhonghua Jie. He. He. Hu Xi. Za Zhi. 2004; 27:533-536.

[181] Widdicombe, J. H. Accumulation of airway mucus in cystic fibrosis. Pulm. Pharmacol. 1994; 7:225-233.

[182] Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Doring. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. J. Clin. Invest 2002; 109:317-325.

[183] Kunzelmann, K., G. L. Kiser, R. Schreiber, and J. R. Riordan. Inhibition of epithelial Na+ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. FEBS Lett. 1997; 400:341-344.

[184] Ritzka, M., F. Stanke, S. Jansen, A. D. Gruber, L. Pusch, S. Woelfl, H. J. Veeze, D. J. Halley, and B. Tummler. The CLCA gene locus as a modulator of the gastrointestinal basic defect in cystic fibrosis. Hum. Genet. 2004; 115:483-491.

[185] Leverkoehne, I., H. Holle, F. Anton, and A. D. Gruber. Differential expression of calcium-activated chloride channels (CLCA) gene family members in the small intestine of cystic fibrosis mouse models. Histochem. Cell Biol. 2006; 126:239-250.

[186] Brouillard, F., N. Bensalem, A. Hinzpeter, D. Tondelier, S. Trudel, A. D. Gruber, M. Ollero, and A. Edelman. Blue native/SDS-PAGE analysis reveals reduced expression of the mClCA3 protein in cystic fibrosis knock-out mice. Mol. Cell Proteomics. 2005; 4:1762-1775.

[187] Button, B., M. Picher, and R. C. Boucher. Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia. J. Physiol 2007; 580:577-592.

[188] Knowles, M. R., L. L. Clarke, and R. C. Boucher. Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 1991; 325:533-538.

[189] Ribeiro, C. M., A. M. Paradiso, M. A. Carew, S. B. Shears, and R. C. Boucher. Cystic fibrosis airway epithelial Ca2+ i signaling: the mechanism for the larger agonist-mediated Ca2+ i signals in human cystic fibrosis airway epithelia. J. Biol. Chem. 2005; 280:10202-10209.

[190] Antigny, F., C. Norez, F. Becq, and C. Vandebrouck. Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. Cell Calcium 2008; 43:175-183.

[191] Weber, A. J., G. Soong, R. Bryan, S. Saba, and A. Prince. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl- channel function. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2001; 281:L71-L78.

[192] Bonfield, T. L., J. R. Panuska, M. W. Konstan, K. A. Hilliard, J. B. Hilliard, H. Ghnaim, and M. Berger. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1995; 152:2111-2118.

[193] Dean, T. P., Y. Dai, J. K. Shute, M. K. Church, and J. O. Warner. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. Pediatr. Res. 1993; 34:159-161.

[194] Rao, S. and J. Grigg. New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. Arch. Dis. Child 2006; 91:786-788.

[195] DiMango, E., A. J. Ratner, R. Bryan, S. Tabibi, and A. Prince. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. J. Clin. Invest 1998; 101:2598-2605.

[196] Scheid, P., L. Kempster, U. Griesenbach, J. C. Davies, A. Dewar, P. P. Weber, W. H. Colledge, M. J. Evans, D. M. Geddes, and E. W. Alton. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. Eur. Respir. J. 2001; 17:27-35.

[197] Kube, D., U. Sontich, D. Fletcher, and P. B. Davis. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2001; 280:L493-L502.

[198] Armstrong, D. S., K. Grimwood, R. Carzino, J. B. Carlin, A. Olinsky, and P. D. Phelan. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. BMJ 1995; 310:1571-1572.

[199] Govan, J. R., A. R. Brown, and A. M. Jones. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. Future. Microbiol. 2007; 2:153-164.

[200] Zulianello, L., C. Canard, T. Kohler, D. Caille, J. S. Lacroix, and P. Meda. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2006; 74:3134-3147.

[201] Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrock-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406:959-964.

[202] Chastre, J. and J. Y. Fagon. Ventilator-associated pneumonia. Am. J. Respir. Crit Care Med. 2002; 165:867-903.

[203] Fagon, J. Y., J. Chastre, A. Vuagnat, J. L. Trouillet, A. Novara, and C. Gibert. Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. JAMA 1996; 275:866-869.

[204] Govan, J. R. and G. S. Harris. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. Microbiol. Sci. 1986; 3:302-308.

[205] Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. Van Delden, and J. C. Pechere. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol. 2000; 182:5990-5996.

[206] O'Toole, G. A. and R. Kolter. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 1998; 30:295-304.

[207] Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, and A. Prince. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infect. Immun. 1998; 66:43-51.

[208] Montie, T. C., D. Doyle-Huntzinger, R. C. Craven, and I. A. Holder. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. Infect. Immun. 1982; 38:1296-1298.

[209] Adamo, R., S. Sokol, G. Soong, M. I. Gomez, and A. Prince. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004; 30:627-634.

[210] Tseng, J., J. Do, J. H. Widdicombe, and T. E. Machen. Innate immune responses of human tracheal epithelium to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, TNF-alpha, and IL-1beta. Am. J. Physiol Cell Physiol 2006; 290:C678-C690.

[211] Hybiske, K., J. K. Ichikawa, V. Huang, S. J. Lory, and T. E. Machen. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. Cell Microbiol. 2004; 6:49-63.

[212] Gupta, S. K., R. S. Berk, S. Masinick, and L. D. Hazlett. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. Infect. Immun. 1994; 62:4572-4579.

[213] Giltner, C. L., E. J. van Schaik, G. F. Audette, D. Kao, R. S. Hodges, D. J. Hassett, and R. T. Irvin. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. Mol. Microbiol. 2006; 59:1083-1096.

[214] Mattick, J. S. Type IV pili and twitching motility. Annu. Rev. Microbiol. 2002; 56:289-314.

[215] Tang, H., M. Kays, and A. Prince. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. Infect. Immun. 1995; 63:1278-1285.

[216] Comolli, J. C., A. R. Hauser, L. Waite, C. B. Whitchurch, J. S. Mattick, and J. N. Engel. *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. Infect. Immun. 1999; 67:3625-3630.

[217] Doring, G. and G. B. Pier. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa.* Vaccine 2008; 26:1011-1024.

[218] Reisner, A., N. Hoiby, T. Tolker-Nielsen, and S. Molin. Microbial pathogenesis and biofilm development. Contrib. Microbiol. 2005; 12:114-131.

[219] Hentzer, M., G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov, and M. R. Parsek. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. J. Bacteriol. 2001; 183:5395-5401.

[220] Cobb, L. M., J. C. Mychaleckyj, D. J. Wozniak, and Y. S. Lopez-Boado. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. J. Immunol. 2004; 173:5659-5670.

[221] Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, and J. S. Lam. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999; 63:523-553.

[222] Cryz, S. J., Jr., T. L. Pitt, E. Furer, and R. Germanier. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 1984; 44:508-513.

[223] Dasgupta, T., T. R. de Kievit, H. Masoud, E. Altman, J. C. Richards, I. Sadovskaya, D. P. Speert, and J. S. Lam. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. Infect. Immun. 1994; 62:809-817.

[224] Lam, J., R. Chan, K. Lam, and J. W. Costerton. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. Infect. Immun. 1980; 28:546-556.

[225] Govan, J. R. and V. Deretic. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol. Rev. 1996; 60:539-574.

[226] Pier, G. B. Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen. Carbohydr. Res. 2003; 338:2549-2556.

[227] Pier, G. B., R. B. Markham, and D. Eardley. Correlation of the biologic responses of C3H/HEJ mice to endotoxin with the chemical and structural properties of the lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* and Escherichia coli. J. Immunol. 1981; 127:184-191.

[228] Ernst, R. K., A. M. Hajjar, J. H. Tsai, S. M. Moskowitz, C. B. Wilson, and S. I. Miller. *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. J. Endotoxin. Res. 2003; 9:395-400.

[229] Ernst, R. K., E. C. Yi, L. Guo, K. B. Lim, J. L. Burns, M. Hackett, and S. I. Miller. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. Science 1999; 286:1561-1565.

[230] Pier, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. Int. J. Med. Microbiol. 2007; 297:277-295.

[231] Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997; 388:394-397.

[232] Fitzgerald, K. A. and Z. J. Chen. Sorting out Toll signals. Cell 2006; 125:834-836.

[233] Schnare, M., M. Rollinghoff, and S. Qureshi. Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. Int. Arch. Allergy Immunol. 2006; 139:75-85.

[234] Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M. I. Gomez, A. Van Heeckeren, and A. Prince. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004; 30:777-783.

[235] Greene, C. M., T. P. Carroll, S. G. Smith, C. C. Taggart, J. Devaney, S. Griffin, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. J. Immunol. 2005; 174:1638-1646.

[236] Erridge, C., A. Pridmore, A. Eley, J. Stewart, and I. R. Poxton. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. J. Med. Microbiol. 2004; 53:735-740.

[237] Krivan, H. C., V. Ginsburg, and D. D. Roberts. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). Arch. Biochem. Biophys. 1988; 260:493-496.

[238] McNamara, N., A. Khong, D. McKemy, M. Caterina, J. Boyer, D. Julius, and C. Basbaum. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2001; 98:9086-9091.

[239] Imundo, L., J. Barasch, A. Prince, and Q. Al Awqati. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1995; 92:3019-3023.

[240] Singh, A., L. Hazlett, and R. S. Berk. Characterization of pseudomonal adherence to unwounded cornea. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1991; 32:2096-2104.

[241] Schroeder, T. H., T. Zaidi, and G. B. Pier. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. Infect. Immun. 2001; 69:719-729.

[242] DU, J. W., F. Zhang, J. E. Capo-Aponte, S. D. Tachado, J. Zhang, F. S. Yu, R. A. Sack, H. Koziel, and P. S. Reinach. AsialoGM1-mediated IL-8 release by human corneal epithelial cells requires coexpression of TLR5. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 2006; 47:4810-4818.

[243] Goldberg, J. B. and G. B. Pier. The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. Trends Microbiol. 2000; 8:514-520.

[244] Pier, G. B., M. Grout, T. S. Zaidi, J. C. Olsen, L. G. Johnson, J. R. Yankaskas, and J. B. Goldberg. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. Science 1996; 271:64-67.

[245] Pier, G. B., M. Grout, and T. S. Zaidi. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1997; 94:12088-12093.

[246] Schroeder, T. H., N. Reiniger, G. Meluleni, M. Grout, F. T. Coleman, and G. B. Pier. Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract. J. Immunol. 2001; 166:7410-7418.

[247] Schroeder, T. H., M. M. Lee, P. W. Yacono, C. L. Cannon, A. A. Gerceker, D. E. Golan, and G. B. Pier. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2002; 99:6907-6912.

[248] Massengale, A. R., F. J. Quinn, A. Williams, S. Gallagher, and S. C. Aronoff. The effect of alginate on the invasion of cystic fibrosis respiratory epithelial cells by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Exp. Lung Res. 2000; 26:163-178.

[249] Darling, K. E., A. Dewar, and T. J. Evans. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells. Cell Microbiol. 2004; 6:521-533.

[250] Kostakioti, M., C. L. Newman, D. G. Thanassi, and C. Stathopoulos. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. J. Bacteriol. 2005; 187:4306-4314.

[251] Mougous, J. D., C. A. Gifford, T. L. Ramsdell, and J. J. Mekalanos. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Nat. Cell Biol. 2007; 9:797-803.

[252] Shrivastava, S. and S. S. Mande. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. PLoS. ONE. 2008; 3:e2955.

[253] Heck, L. W., K. Morihara, and D. R. Abrahamson. Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease. Infect. Immun. 1986; 54:149-153.

[254] Heck, L. W., P. G. Alarcon, R. M. Kulhavy, K. Morihara, M. W. Russell, and J. F. Mestecky. Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. J. Immunol. 1990; 144:2253-2257.

[255] Hong, Y. Q. and B. Ghebrehiwet. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. Clin. Immunol. Immunopathol. 1992; 62:133-138.

[256] Van Delden, C. and B. H. Iglewski. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg. Infect. Dis. 1998; 4:551-560.

[257] Blackwood, L. L., R. M. Stone, B. H. Iglewski, and J. E. Pennington. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. Infect. Immun. 1983; 39:198-201.

[258] Azghani, A. O. *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996; 15:132-140.

[259] Cowell, B. A., S. S. Twining, J. A. Hobden, M. S. Kwong, and S. M. Fleiszig. Mutation of lasA and lasB reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. Microbiology 2003; 149:2291-2299.

[260] Mariencheck, W. I., J. F. Alcorn, S. M. Palmer, and J. R. Wright. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003; 28:528-537.

[261] Engel, L. S., J. A. Hobden, J. M. Moreau, M. C. Callegan, J. M. Hill, and R. J. O'Callaghan. *Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1997; 38:1535-1542.

[262] Engel, L. S., J. M. Hill, J. M. Moreau, L. C. Green, J. A. Hobden, and R. J. O'Callaghan. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39:662-665.

[263] Malloy, J. L., R. A. Veldhuizen, B. A. Thibodeaux, R. J. O'Callaghan, and J. R. Wright. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits

surfactant host defense and biophysical functions. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2005; 288:L409-L418.

[264] Shibuya, Y., T. Yamamoto, T. Morimoto, N. Nishino, T. Kambara, and H. Okabe. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. Biochim. Biophys. Acta 1991; 1077:316-324.

[265] Horvat, R. T. and M. J. Parmely. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. Infect. Immun. 1988; 56:2925-2932.

[266] Parmely, M., A. Gale, M. Clabaugh, R. Horvat, and W. W. Zhou. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 1990; 58:3009-3014.

[267] Kida, Y., Y. Higashimoto, H. Inoue, T. Shimizu, and K. Kuwano. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. Cell Microbiol. 2008; 10:1491-1504.

[268] Ostroff, R. M., A. I. Vasil, and M. L. Vasil. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 1990; 172:5915-5923.

[269] Barker, A. P., A. I. Vasil, A. Filloux, G. Ball, P. J. Wilderman, and M. L. Vasil. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. Mol. Microbiol. 2004; 53:1089-1098.

[270] Luberto, C., M. J. Stonehouse, E. A. Collins, N. Marchesini, S. El Bawab, A. I. Vasil, M. L. Vasil, and Y. A. Hannun. Purification, characterization, and identification of a sphingomyelin synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. PlcH is a multifunctional enzyme. J. Biol. Chem. 2003; 278:32733-32743.

[271] Ostroff, R. M., B. Wretlind, and M. L. Vasil. Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. Infect. Immun. 1989; 57:1369-1373.

[272] Wieland, C. W., B. Siegmund, G. Senaldi, M. L. Vasil, C. A. Dinarello, and G. Fantuzzi. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. Infect. Immun. 2002; 70:1352-1358.

[273] Meyers, D. J., K. C. Palmer, L. A. Bale, K. Kernacki, M. Preston, T. Brown, and R. S. Berk. In vivo and in vitro toxicity of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. Toxicon 1992; 30:161-169.

[274] Pastan, I. and D. FitzGerald. *Pseudomonas* exotoxin: chimeric toxins. J. Biol. Chem. 1989; 264:15157-15160.

[275] Pittet, J. F., S. Hashimoto, M. Pian, M. C. McElroy, G. Nitenberg, and J. P. Wiener-Kronish. Exotoxin A stimulates fluid reabsorption from distal airspaces of lung in anesthetized rats. Am. J. Physiol 1996; 270:L232-L241.

[276] Jenkins, C. E., A. Swiatoniowski, A. C. Issekutz, and T. J. Lin. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism. J. Biol. Chem. 2004; 279:37201-37207.

[277] Desai, J. D. and I. M. Banat. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997; 61:47-64.

[278] Graham, A., D. M. Steel, R. Wilson, P. J. Cole, E. W. Alton, and D. M. Geddes. Effects of purified *Pseudomonas* rhamnolipids on bioelectric properties of sheep tracheal epithelium. Exp. Lung Res. 1993; 19:77-89.

[279] Davey, M. E., N. C. Caiazza, and G. A. O'Toole. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 2003; 185:1027-1036.

[280] Wilson, R., T. Pitt, G. Taylor, D. Watson, J. MacDermot, D. Sykes, D. Roberts, and P. Cole. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. J. Clin. Invest 1987; 79:221-229.

[281] Denning, G. M., M. A. Railsback, G. T. Rasmussen, C. D. Cox, and B. E. Britigan. *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. Am. J. Physiol 1998; 274:L893-L900.

[282] Denning, G. M., L. A. Wollenweber, M. A. Railsback, C. D. Cox, L. L. Stoll, and B. E. Britigan. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. Infect. Immun. 1998; 66:5777-5784.

[283] Lau, G. W., H. Ran, F. Kong, D. J. Hassett, and D. Mavrodi. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. Infect. Immun. 2004; 72:4275-4278.

[284] Cox, C. D. and P. Adams. Siderophore activity of pyoverdin for *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 1985; 48:130-138.

[285] Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore, and J. C. Cook, Jr. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1981; 78:4256-4260.

[286] Meyer, J. M., A. Neely, A. Stintzi, C. Georges, and I. A. Holder. Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 1996; 64:518-523.

[287] Britigan, B. E., G. T. Rasmussen, and C. D. Cox. Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. Infect. Immun. 1997; 65:1071-1076.

[288] Laughlin, R. S., M. W. Musch, C. J. Hollbrook, F. M. Rocha, E. B. Chang, and J. C. Alverdy. The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. Ann. Surg. 2000; 232:133-142.

[289] Bajolet-Laudinat, O., S. Girod-de Bentzmann, J. M. Tournier, C. Madoulet, M. C. Plotkowski, C. Chippaux, and E. Puchelle. Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. Infect. Immun. 1994; 62:4481-4487.

[290] Diggle, S. P., R. E. Stacey, C. Dodd, M. Camara, P. Williams, and K. Winzer. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 2006; 8:1095-1104.

[291] Mewe, M., D. Tielker, R. Schonberg, M. Schachner, K. E. Jaeger, and U. Schumacher. *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. J. Laryngol. Otol. 2005; 119:595-599.

[292] Tielker, D., S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau, and K. E. Jaeger. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. Microbiology 2005; 151:1313-1323.

[293] Chanez Chemani, Anne Imberty, Sophie de Bentzman, Maud Pierre, Michaela Wimmerová, Benoît Guery, and Karine Faure. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa* induced lung injury and effect of carbohydrates ligands. Infect. Immun. 2008.

[294] Hueck, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62:379-433.

[295] Hauser, A. R., E. Cobb, M. Bodi, D. Mariscal, J. Valles, J. N. Engel, and J. Rello. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med. 2002; 30:521-528.

[296] Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank, and J. P. Wiener-Kronish. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. J. Infect. Dis. 2001; 183:1767-1774.

[297] Jain, M., D. Ramirez, R. Seshadri, J. F. Cullina, C. A. Powers, G. S. Schulert, M. Bar-Meir, C. L. Sullivan, S. A. McColley, and A. R. Hauser. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:5229-5237.

[298] Corech, R., A. Rao, A. Laxova, J. Moss, M. J. Rock, Z. Li, M. R. Kosorok, M. L. Splaingard, P. M. Farrell, and J. T. Barbieri. Early immune response to the components of the type III system of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:3956-3962.

[299] Shaver, C. M. and A. R. Hauser. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infect. Immun. 2004; 72:6969-6977.

[300] Frank, D. W. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 1997; 26:621-629.

[301] Feltman, H., G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson, and A. R. Hauser. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2001; 147:2659-2669.

[302] Yahr, T. L., J. T. Barbieri, and D. W. Frank. Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 1996; 178:1412-1419.

[303] Krall, R., G. Schmidt, K. Aktories, and J. T. Barbieri. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. Infect. Immun. 2000; 68:6066-6068.

[304] Goehring, U. M., G. Schmidt, K. J. Pederson, K. Aktories, and J. T. Barbieri. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. J. Biol. Chem. 1999; 274:36369-36372.

[305] Barbieri, J. T. and J. Sun. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. 2004; 152:79-92.

[306] Sun, J. and J. T. Barbieri. ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. J. Biol. Chem. 2004; 279:42936-42944.

[307] Sundin, C., B. Hallberg, and A. Forsberg. ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo. FEMS Microbiol. Lett. 2004; 234:87-91.

[308] Henriksson, M. L., C. Sundin, A. L. Jansson, A. Forsberg, R. H. Palmer, and B. Hallberg. Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. Biochem. J. 2002; 367:617-628.

[309] Pederson, K. J. and J. T. Barbieri. Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. Mol. Microbiol. 1998; 30:751-759.

[310] Lazdunski, A. [*Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen]. Ann. Fr. Anesth. Reanim. 2003; 22:523-526.

[311] Epelman, S., D. Stack, C. Bell, E. Wong, G. G. Neely, S. Krutzik, K. Miyake, P. Kubes, L. D. Zbytnuik, L. L. Ma, X. Xie, D. E. Woods, and C. H. Mody. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. J. Immunol. 2004; 173:2031-2040.

[312] Sayner, S. L., D. W. Frank, J. King, H. Chen, J. VandeWaa, and T. Stevens. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. Circ. Res. 2004; 95:196-203.

[313] Lee, V. T., R. S. Smith, B. Tummler, and S. Lory. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. Infect. Immun. 2005; 73:1695-1705.

[314] Sato, H. and D. W. Frank. ExoU is a potent intracellular phospholipase. Mol. Microbiol. 2004; 53:1279-1290.

[315] Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller, and D. W. Frank. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol. Microbiol. 1997; 25:547-557.

[316] Hauser, A. R., P. J. Kang, and J. N. Engel. PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa,* is necessary for cytotoxicity and virulence. Mol. Microbiol. 1998; 27:807-818.

[317] Kurahashi, K., O. Kajikawa, T. Sawa, M. Ohara, M. A. Gropper, D. W. Frank, T. R. Martin, and J. P. Wiener-Kronish. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. J. Clin. Invest 1999; 104:743-750.

[318] Ader, F., R. Le Berre, K. Faure, P. Gosset, O. Epaulard, B. Toussaint, B. Polack, E. Nowak, N. B. Viget, E. Kipnis, and B. P. Guery. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. Infect. Immun. 2005; 73:4263-4271.

[319] Dacheux, D., I. Attree, C. Schneider, and B. Toussaint. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. Infect. Immun. 1999; 67:6164-6167.

[320] Vallis, A. J., T. L. Yahr, J. T. Barbieri, and D. W. Frank. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. Infect. Immun. 1999; 67:914-920.

[321] Pollack, C., S. C. Straley, and M. S. Klempner. Probing the phagolysosomal environment of human macrophages with a Ca2+-responsive operon fusion in Yersinia pestis. Nature 1986; 322:834-836.

[322] Kim, J., K. Ahn, S. Min, J. Jia, U. Ha, D. Wu, and S. Jin. Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2005; 151:3575-3587.

[323] Dasgupta, N., A. Ashare, G. W. Hunninghake, and T. L. Yahr. Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca2+ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. Infect. Immun. 2006; 74:3334-3341.

[324] Rietsch, A., I. Vallet-Gely, S. L. Dove, and J. J. Mekalanos. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2005; 102:8006-8011.

[325] Wolfgang, M. C., V. T. Lee, M. E. Gilmore, and S. Lory. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. Dev. Cell 2003; 4:253-263.

[326] Albus, A. M., E. C. Pesci, L. J. Runyen-Janecky, S. E. West, and B. H. Iglewski. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 1997; 179:3928-3935.

[327] West, S. E., A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky. The vfr gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. J. Bacteriol. 1994; 176:7532-7542.

[328] Beatson, S. A., C. B. Whitchurch, J. L. Sargent, R. C. Levesque, and J. S. Mattick. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2002; 184:3605-3613.

[329] Ventre, I., A. L. Goodman, I. Vallet-Gely, P. Vasseur, C. Soscia, S. Molin, S. Bleves, A. Lazdunski, S. Lory, and A. Filloux. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2006; 103:171-176.

[330] Aspedon, A., K. Palmer, and M. Whiteley. Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2006; 188:2721-2725.

[331] Rietsch, A. and J. J. Mekalanos. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 2006; 59:807-820.

[332] Dacheux, D., O. Epaulard, A. de Groot, B. Guery, R. Leberre, I. Attree, B. Polack, and B. Toussaint. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase aceAB operon. Infect. Immun. 2002; 70:3973-3977.

[333] Linares, J. F., J. A. Lopez, E. Camafeita, J. P. Albar, F. Rojo, and J. L. Martinez. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2005; 187:1384-1391.

[334] Rietsch, A., M. C. Wolfgang, and J. J. Mekalanos. Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2004; 72:1383-1390.

[335] Ha, U. H., J. Kim, H. Badrane, J. Jia, H. V. Baker, D. Wu, and S. Jin. An in vivo inducible gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an anti-ExsA to suppress the type III secretion system. Mol. Microbiol. 2004; 54:307-320.

[336] Bleves, S., C. Soscia, P. Nogueira-Orlandi, A. Lazdunski, and A. Filloux. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 2005; 187:3898-3902.

[337] Hogardt, M., M. Roeder, A. M. Schreff, L. Eberl, and J. Heesemann. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* exoS is controlled by quorum sensing and RpoS. Microbiology 2004; 150:843-851.

[338] Dacheux, D., B. Toussaint, M. Richard, G. Brochier, J. Croize, and I. Attree. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. Infect. Immun. 2000; 68:2916-2924.

[339] Wu, W., H. Badrane, S. Arora, H. V. Baker, and S. Jin. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2004; 186:7575-7585.

[340] Page, A. L. and C. Parsot. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. Mol. Microbiol. 2002; 46:1-11.

[341] Shen, D. K., L. Quenee, M. Bonnet, L. Kuhn, M. Derouazi, D. Lamotte, B. Toussaint, and B. Polack. Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. Biomed. Environ. Sci. 2008; 21:103-109.

[342] Finck-Barbancon, V., T. L. Yahr, and D. W. Frank. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. J. Bacteriol. 1998; 180:6224-6231.

[343] Faudry, E., V. Job, A. Dessen, I. Attree, and V. Forge. Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. FEBS J. 2007; 274:3601-3610.

[344] Yang, H. J., M. C. Li, D. S. Wei, and L. J. Xing. [Characterization of pcr2 gene of *Pseudomonas aeruginosa*]. Wei Sheng Wu Xue. Bao. 2007; 47:779-784.

[345] Cisz, M., P. C. Lee, and A. Rietsch. ExoS controls the cell contact mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2007.

[346] Van Delden, C. [When bacteria communicate with each other: the significance of intercellular signals in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections]. Rev. Med. Suisse Romande 2000; 120:7-13.

[347] Tang, H. B., E. DiMango, R. Bryan, M. Gambello, B. H. Iglewski, J. B. Goldberg, and A. Prince. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. Infect. Immun. 1996; 64:37-43.

[348] Wu, H., Z. Song, M. Givskov, G. Doring, D. Worlitzsch, K. Mathee, J. Rygaard, and N. Hoiby. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. Microbiology 2001; 147:1105-1113.

[349] Smith, R. S., E. R. Fedyk, T. A. Springer, N. Mukaida, B. H. Iglewski, and R. P. Phipps. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. J. Immunol. 2001; 167:366-374.

[350] Shiner, E. K., D. Terentyev, A. Bryan, S. Sennoune, R. Martinez-Zaguilan, G. Li, S. Gyorke, S. C. Williams, and K. P. Rumbaugh. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. Cell Microbiol. 2006; 8:1601-1610.

[351] Smith, R. S., S. G. Harris, R. Phipps, and B. Iglewski. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. J. Bacteriol. 2002; 184:1132-1139.

[352] Vikstrom, E., F. Tafazoli, and K. E. Magnusson. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. FEBS Lett. 2006; 580:6921-6928.

[353] Davis, C. W., M. L. Dowell, M. Lethem, and M. Van Scott. Goblet cell degranulation in isolated canine tracheal epithelium: response to exogenous ATP, ADP, and adenosine. Am. J. Physiol 1992; 262:C1313-C1323.

[354] Conway, J. D., T. Bartolotta, L. H. Abdullah, and C. W. Davis. Regulation of mucin secretion from human bronchial epithelial cells grown in murine hosted xenografts. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2003; 284:L945-L954.

[355] Haller, T., J. Ortmayr, F. Friedrich, H. Volkl, and P. Dietl. Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1998; 95:1579-1584.

[356] Lansley, A. B., M. J. Sanderson, and E. R. Dirksen. Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by Ca2+ and cAMP. Am. J. Physiol 1992; 263:L232-L242.

[357] Paradiso, A. M., C. M. Ribeiro, and R. C. Boucher. Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. J. Gen. Physiol 2001; 117:53-67.

[358] Ratner, A. J., R. Bryan, A. Weber, S. Nguyen, D. Barnes, A. Pitt, S. Gelber, A. Cheung, and A. Prince. Cystic fibrosis pathogens activate Ca2+-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. J. Biol. Chem. 2001; 276:19267-19275.

[359] Kunzelmann, K., K. Scheidt, B. Scharf, J. Ousingsawat, R. Schreiber, B. Wainwright, and B. McMorran. Flagellin of Pseudomonas aeruginosa inhibits Na+ transport in airway epithelia. FASEB J. 2006; 20:545-546.

[360] Fu, Z., K. Bettega, S. Carroll, K. R. Buchholz, and T. E. Machen. Role of Ca2+ in responses of airway epithelia to *Pseudomonas aeruginosa*, flagellin, ATP, and thapsigargin. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2007; 292:L353-L364.

[361] Benito, E., M. T. Portoles, and M. A. Bosch. Involvement of calcium in the stimulation of phosphatidylcholine secretion in primary cultures of rat type II pneumocytes by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Mol. Cell Biochem. 2000; 205:39-44.

[362] Zhang, H., Y. Y. Li, S. N. Wang, K. H. Zhang, and X. Z. Wu. Effects of lipopolysaccharides on calcium homeostasis in isolated pancreatic acinar cells of rat. Acta Pharmacol. Sin. 2003; 24:790-795.

[363] Jacob, T., R. J. Lee, J. N. Engel, and T. E. Machen. Modulation of cytosolic Ca(2+) concentration in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2002; 70:6399-6408.

[364] Yahr, T. L., J. Goranson, and D. W. Frank. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. Mol. Microbiol. 1996; 22:991-1003.

[365] Wiley, D. J., R. Rosqvist, and K. Schesser. Induction of the *Yersinia* type 3 secretion system as an all-or-none phenomenon. J. Mol. Biol. 2007; 373:27-37.

[366] Hybiske, K., Z. Fu, C. Schwarzer, J. Tseng, J. Do, N. Huang, and T. E. Machen. Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and DeltaF508CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca2+ of airway epithelia. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2007; 293:L1250-L1260.

[367] Stutts, M. J., J. H. Schwab, M. G. Chen, M. R. Knowles, and R. C. Boucher. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on bronchial epithelial ion transport. Am. Rev. Respir. Dis. 1986; 134:17-21.

[368] Evans, D. J., P. S. Matsumoto, J. H. Widdicombe, C. Li-Yun, A. A. Maminishkis, and S. S. Miller. *Pseudomonas aeruginosa* induces changes in fluid transport across airway surface epithelia. Am. J. Physiol 1998; 275:C1284-C1290.

[369] Illek, B., Z. Fu, C. Schwarzer, T. Banzon, S. Jalickee, S. S. Miller, and T. E. Machen. Flagellin-stimulated Cl- secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2008; 295:L531-L542.

[370] Tamaoki, J., N. Sakai, K. Isono, T. Kanemura, K. Takeyama, and T. Takizawa. Lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae* inhibits Na+ absorption in canine tracheal epithelium. Infect. Immun. 1991; 59:716-717.

[371] Suzuki, Y., Q. Lu, D. Z. Xu, C. Szabo, G. Hasko, and E. A. Deitch. Na+,K+-ATPase activity is inhibited in cultured intestinal epithelial cells by endotoxin or nitric oxide. Int. J. Mol. Med. 2005; 15:871-877.

[372] Cetin, S., J. Dunklebarger, J. Li, P. Boyle, O. Ergun, F. Qureshi, H. Ford, J. Upperman, S. Watkins, and D. J. Hackam. Endotoxin differentially modulates the basolateral and apical sodium/proton exchangers (NHE) in enterocytes. Surgery 2004; 136:375-383.

[373] Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15:194-222.

[374] Dohrman, A., S. Miyata, M. Gallup, J. D. Li, C. Chapelin, A. Coste, E. Escudier, J. Nadel, and C. Basbaum. Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1998; 1406:251-259.

[375] Rose, M. C. and J. A. Voynow. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. Physiol Rev. 2006; 86:245-278.

[376] Voynow, J. A., D. M. Selby, and M. C. Rose. Mucin gene expression (MUC1, MUC2, and MUC5/5AC) in nasal epithelial cells of cystic fibrosis, allergic rhinitis, and normal individuals. Lung 1998; 176:345-354.

[377] Campodonico, V. L., M. Gadjeva, C. Paradis-Bleau, A. Uluer, and G. B. Pier. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Trends Mol. Med. 2008; 14:120-133.

[378] Gilljam, H., A. Ellin, and B. Strandvik. Increased bronchial chloride concentration in cystic fibrosis. Scand. J. Clin. Lab Invest 1989; 49:121-124.

[379] Joris, L., I. Dab, and P. M. Quinton. Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148:1633-1637.

[380] Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. Cell 1996; 85:229-236.

[381] Goldman, M. J., G. M. Anderson, E. D. Stolzenberg, U. P. Kari, M. Zasloff, and J. M. Wilson. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell 1997; 88:553-560.

[382] Knowles, M. R., J. M. Robinson, R. E. Wood, C. A. Pue, W. M. Mentz, G. C. Wager, J. T. Gatzy, and R. C. Boucher. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. J. Clin. Invest 1997; 100:2588-2595.

[383] Bals, R., D. J. Weiner, R. L. Meegalla, F. Accurso, and J. M. Wilson. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2001; 25:21-25.

[384] Taggart, C. C., C. M. Greene, S. G. Smith, R. L. Levine, P. B. McCray, Jr., S. O'Neill, and N. G. McElvaney. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. J. Immunol. 2003; 171:931-937.

[385] de Bentzmann, S., P. Roger, F. Dupuit, O. Bajolet-Laudinat, C. Fuchey, M. C. Plotkowski, and E. Puchelle. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. Infect. Immun. 1996; 64:1582-1588.

[386] Tager, A. M., J. Wu, and M. W. Vermeulen. The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998; 19:643-652.

[387] Painter, R. G., R. W. Bonvillain, V. G. Valentine, G. A. Lombard, S. G. LaPlace, W. M. Nauseef, and G. Wang. The role of chloride anion and CFTR in killing of

Pseudomonas aeruginosa by normal and CF neutrophils. J. Leukoc. Biol. 2008; 83:1345-1353.

[388] Watt, A. P., J. Courtney, J. Moore, M. Ennis, and J. S. Elborn. Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. Thorax 2005; 60:659-664.

[389] Kazmierczak, B. I., K. Mostov, and J. N. Engel. Interaction of bacterial pathogens with polarized epithelium. Annu. Rev. Microbiol. 2001; 55:407-435.

[390] Cook, I. and A. Young. Towards a physiology of epithelial pathogens. Pflugers Arch. 2002; 443:339-343.

[391] Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. 1992; 56:395-411.

[392] Toussaint, B., I. Delic-Attree, and P. M. Vignais. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; 196:416-421.

[393] Shen, D. K., D. Filopon, L. Kuhn, B. Polack, and B. Toussaint. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2006; 74:1121-1129.

[394] Apodaca, G., M. Bomsel, R. Lindstedt, J. Engel, D. Frank, K. E. Mostov, and J. Wiener-Kronish. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylation-defective host cells are resistant to bacterial killing. Infect. Immun. 1995; 63:1541-1551.

[395] Cozens, A. L., M. J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W. E. Finkbeiner, J. H. Widdicombe, and D. C. Gruenert. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1994; 10:38-47.

[396] Forbes, B., A. Shah, G. P. Martin, and A. B. Lansley. The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. Int. J. Pharm. 2003; 257:161-167.

[397] Maruyama, T., T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno, and K. Mikoshiba. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced Ca2+ release. J. Biochem. 1997; 122:498-505.

[398] Lievremont, J. P., G. S. Bird, and J. W. Putney, Jr. Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. Mol. Pharmacol. 2005; 68:758-762.

[399] Colton, C. K. and M. X. Zhu. 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels. Handb. Exp. Pharmacol. 2007;173-187.

[400] Nilius, B., J. Prenen, R. Vennekens, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, and G. Droogmans. Pharmacological modulation of monovalent cation currents through the epithelial Ca2+ channel ECaC1. Br. J. Pharmacol. 2001; 134:453-462.

[401] Babich, O., J. Reeves, and R. Shirokov. Block of CaV1.2 channels by Gd3+ reveals preopening transitions in the selectivity filter. J. Gen. Physiol 2007; 129:461-475.

[402] Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum, and D. Julius. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron 1998; 21:531-543.

[403] Xu, L., A. Tripathy, D. A. Pasek, and G. Meissner. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca(2+) release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. J. Biol. Chem. 1999; 274:32680-32691.

[404] Chaib, N., E. Kabre, M. Metioui, E. Alzola, C. Dantinne, A. Marino, and J. P. Dehaye. Differential sensitivity to nickel and SK&F96365 of second messenger-operated and receptor-operated calcium channels in rat submandibular ductal cells. Cell Calcium 1998; 23:395-404.

[405] Ussing, H. H. and K. Zerahn. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand. 1951; 23:110-127.

[406] Preciado, D., E. Caicedo, R. Jhanjee, R. Silver, G. Harris, S. K. Juhn, D. I. Choo, and F. Ondrey. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide induction of keratinocyte proliferation, NF-kappa B, and cyclin D1 is inhibited by indomethacin. J. Immunol. 2005; 174:2964-2973.

[407] Azghani, A. O., E. J. Miller, and B. T. Peterson. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. Lung 2000; 178:261-269.

[408] Yeh, T. H., W. C. Hsu, Y. S. Chen, C. J. Hsu, and S. Y. Lee. Lipopolysaccharide decreases connexin 43 expression on nasal epithelial cells in vitro. Acta Otolaryngol. 2005; 125:1091-1096.

[409] Tesfaigzi, Y., J. F. Harris, J. A. Hotchkiss, and J. R. Harkema. DNA synthesis and Bcl-2 expression during development of mucous cell metaplasia in airway epithelium of rats exposed to LPS. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2004; 286:L268-L274.

[410] Koff, J. L., M. X. Shao, S. Kim, I. F. Ueki, and J. A. Nadel. *Pseudomonas* lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. J. Immunol. 2006; 177:8693-8700.

[411] Hauber, H. P., T. Goldmann, E. Vollmer, B. Wollenberg, H. L. Hung, R. C. Levitt, and P. Zabel. LPS-induced mucin expression in human sinus mucosa can be attenuated by hCLCA inhibitors. J. Endotoxin. Res. 2007; 13:109-116.

[412] Beck, A., R. Penner, and A. Fleig. Lipopolysaccharide-induced down-regulation of Ca2+ release-activated Ca2+ currents (I CRAC) but not Ca2+-activated TRPM4-like currents (I CAN) in cultured mouse microglial cells. J. Physiol 2008; 586:427-439.

[413] Yakubovich, N., J. R. Eldstrom, and D. A. Mathers. Lipopolysaccharide can activate BK channels of arterial smooth muscle in the absence of iNOS expression. Biochim. Biophys. Acta 2001; 1514:239-252.

[414] Kerstan, D., J. Thomas, R. Nitschke, and J. Leipziger. Basolateral store-operated Ca(2+)-entry in polarized human bronchial and colonic epithelial cells. Cell Calcium 1999; 26:253-260.

[415] Hansen, M., S. Boitano, E. R. Dirksen, and M. J. Sanderson. Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells. J. Cell Sci. 1993; 106 (Pt 4):995-1004.

[416] McNamara, N., M. Gallup, A. Sucher, I. Maltseva, D. McKemy, and C. Basbaum. AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2006; 34:653-660.

[417] Romero, C., E. Benito, and M. A. Bosch. Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on surfactant secretion in primary cultures of rat type II pneumocytes. Biochim. Biophys. Acta 1995; 1256:305-309.

[418] Paradiso, A. M., H. A. Brown, H. Ye, T. K. Harden, and R. C. Boucher. Heterogeneous responses of cell Ca2+ in human airway epithelium. Exp. Lung Res. 1999; 25:277-290.

[419] Halaszovich, C. R., C. Zitt, E. Jungling, and A. Luckhoff. Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. J. Biol. Chem. 2000; 275:37423-37428.

[420] Biagi, B. A. and J. J. Enyeart. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. Am. J. Physiol 1990; 259:C515-C520.

[421] Ng, L. C., S. M. Wilson, and J. R. Hume. Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca2+ entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. J. Physiol 2005; 563:409-419.

[422] Snetkov, V. A., P. I. Aaronson, J. P. Ward, G. A. Knock, and T. P. Robertson. Capacitative calcium entry as a pulmonary specific vasoconstrictor mechanism in small muscular arteries of the rat. Br. J. Pharmacol. 2003; 140:97-106.

[423] Glossmann, H. and J. Striessnig. Molecular properties of calcium channels. Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. 1990; 114:1-105.

[424] Morgan, E. L., O. J. Mace, P. A. Helliwell, J. Affleck, and G. L. Kellett. A role for Ca(v)1.3 in rat intestinal calcium absorption. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003; 312:487-493.

[425] Zhang, M. I. and R. G. O'Neil. An L-type calcium channel in renal epithelial cells. J. Membr. Biol. 1996; 154:259-266.

[426] Boitano, S., M. J. Sanderson, and E. R. Dirksen. A role for Ca(2+)-conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells. J. Cell Sci. 1994; 107 (Pt 11):3037-3044.

[427] Jousset, H., R. Malli, N. Girardin, W. F. Graier, N. Demaurex, and M. Frieden. Evidence for a receptor-activated Ca2+ entry pathway independent from Ca2) store depletion in endothelial cells. Cell Calcium 2008; 43:83-94.

[428] Jeulin, C., J. Fournier, F. Marano, and A. C. Dazy. Effects of hydroxyl radicals on outwardly rectifying chloride channels in a cultured human bronchial cell line (16HBE14o-). Pflugers Arch. 2000; 439:331-338.

[429] Kunzelmann, K., S. Kathofer, A. Hipper, D. C. Gruenert, and R. Gregner. Culture-dependent expression of Na+ conductances in airway epithelial cells. Pflugers Arch. 1996; 431:578-586.

[430] Ullrich, S., S. Berchtold, C. Boehmer, S. Fillon, V. Jendrossek, M. Palmada, T. H. Schroeder, G. B. Pier, and F. Lang. *Pseudomonas aeruginosa* activates Cl- channels in host epithelial cells. Pflugers Arch. 2003; 447:23-28.

[431] Kelley, T. J., L. al Nakkash, and M. L. Drumm. CFTR-mediated chloride permeability is regulated by type III phosphodiesterases in airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995; 13:657-664.

[432] Kim, H. J., S. K. Lee, M. H. Kim, D. W. Seo, and Y. I. Min. Cyclooxygenase-2 mediates mucin secretion from epithelial cells of lipopolysaccharide-treated canine gallbladder. Dig. Dis. Sci. 2003; 48:726-732.

[433] Freitag, A., A. Reimann, I. Wessler, and K. Racke. Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) on rat tracheal epithelial cells in culture: morphology, proliferation and induction of nitric oxide (NO) synthase. Pulm. Pharmacol. 1996; 9:149-156.

[434] Fleiszig, S. M., D. J. Evans, N. Do, V. Vallas, S. Shin, and K. E. Mostov. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. Infect. Immun. 1997; 65:2861-2867.

[435] Rajan, S., G. Cacalano, R. Bryan, A. J. Ratner, C. U. Sontich, A. van Heerckeren, P. Davis, and A. Prince. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000; 23:304-312.

[436] Boyd, A. and A. M. Chakrabarty. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. J. Ind. Microbiol. 1995; 15:162-168.

[437] Coraux, C., C. Kileztky, M. Polette, J. Hinnrasky, J. M. Zahm, P. Devillier, S. de Bentzmann, and E. Puchelle. Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004; 30:605-612.

[438] Soong, G., D. Parker, M. Magargee, and A. S. Prince. The type III toxins of Pseudomonas aeruginosa disrupt epithelial barrier function. J. Bacteriol. 2008; 190:2814-2821.

[439] Cowell, B. A., D. J. Evans, and S. M. Fleiszig. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 250:71-76.

[440] Geiser, T. K., B. I. Kazmierczak, L. K. Garrity-Ryan, M. A. Matthay, and J. N. Engel. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. Cell Microbiol. 2001; 3:223-236.

[441] Sato, H., D. W. Frank, C. J. Hillard, J. B. Feix, R. R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbancon, A. Buchaklian, M. Lei, R. M. Long, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. EMBO J. 2003; 22:2959-2969.

[442] Pier, G. B., M. Grout, T. S. Zaidi, and J. B. Goldberg. How mutant CFTR may contribute to *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1996; 154:S175-S182.

[443] Cannon, C. L., M. P. Kowalski, K. S. Stopak, and G. B. Pier. *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003; 29:188-197.

[444] Eutamene, H., V. Theodorou, F. Schmidlin, V. Tondereau, R. Garcia-Villar, C. Salvador-Cartier, M. Chovet, C. Bertrand, and L. Bueno. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. Eur. Respir. J. 2005; 25:789-796.

[445] Suter, S. The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1994; 150:S118-S122.

[446] Read, R. C., P. Roberts, N. Munro, A. Rutman, A. Hastie, T. Shryock, R. Hall, W. McDonald-Gibson, V. Lund, G. Taylor, and . Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. J. Appl. Physiol 1992; 72:2271-2277.

[447] de Bentzmann, S., P. Roger, and E. Puchelle. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. Eur. Respir. J. 1996; 9:2145-2150.

[448] Hauser, A. R. and J. N. Engel. *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. Infect. Immun. 1999; 67:5530-5537.

[449] Plotkowski, M. C., M. Chevillard, D. Pierrot, D. Altemayer, J. M. Zahm, G. Colliot, and E. Puchelle. Differential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells in primary culture. J. Clin. Invest 1991; 87:2018-2028.

[450] Hahn, H. P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. Gene 1997; 192:99-108.

[451] Fletcher, E. L., S. M. Fleiszig, and N. A. Brennan. Lipopolysaccharide in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea and contact lenses. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1993; 34:1930-1936.

[452] Zhao, Z. and N. Panjwani. *Pseudomonas aeruginosa* infection of the cornea and asialo GM1. Infect. Immun. 1995; 63:353-355.

[453] Azghani, A. O., S. Idell, M. Bains, and R. E. Hancock. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. Microb. Pathog. 2002; 33:109-114.

[454] Baker, N. R., V. Minor, C. Deal, M. S. Shahrabadi, D. A. Simpson, and D. E. Woods. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesion. Infect. Immun. 1991; 59:2859-2863.

[455] Bavington, C. and C. Page. Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. Respiration 2005; 72:335-344.

[456] Bryan, R., M. Feldman, S. C. Jawetz, S. Rajan, E. DiMango, H. B. Tang, L. Scheffler, D. P. Speert, and A. Prince. The effects of aerosolized dextran in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. J. Infect. Dis. 1999; 179:1449-1458.

[457] Azghani, A. O., I. Williams, D. B. Holiday, and A. R. Johnson. A beta-linked mannan inhibits adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human lung epithelial cells. Glycobiology 1995; 5:39-44.

[458] Clarke, H., C. W. Marano, S. A. Peralta, and J. M. Mullin. Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. Adv. Drug Deliv. Rev. 2000; 41:283-301.

[459] Watabe, M., A. Nagafuchi, S. Tsukita, and M. Takeichi. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. J. Cell Biol. 1994; 127:247-256.

[460] Siliciano, J. D. and D. A. Goodenough. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. J. Cell Biol. 1988; 107:2389-2399.

[461] Stuart, R. O., A. Sun, M. Panichas, S. C. Hebert, B. M. Brenner, and S. K. Nigam. Critical role for intracellular calcium in tight junction biogenesis. J. Cell Physiol 1994; 159:423-433.

[462] Ye, J., T. Tsukamoto, A. Sun, and S. K. Nigam. A role for intracellular calcium in tight junction reassembly after ATP depletion-repletion. Am. J. Physiol 1999; 277:F524-F532.

[463] Saoudi, Y., B. Rousseau, J. Doussiere, S. Charrasse, C. Gauthier-Rouviere, N. Morin, C. Sautet-Laugier, E. Denarier, R. Scaife, C. Mioskowski, and D. Job. Calcium-independent cytoskeleton disassembly induced by BAPTA. Eur. J. Biochem. 2004; 271:3255-3264.

[464] Mermelstein, C. S., M. I. Rebello, L. M. Amaral, and M. L. Costa. Changes in cell shape, cytoskeletal proteins and adhesion sites of cultured cells after extracellular Ca2+ chelation. Braz. J. Med. Biol. Res. 2003; 36:1111-1116.

[465] Urbanowski, M. L., E. D. Brutinel, and T. L. Yahr. Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Infect. Immun. 2007; 75:4432-4439.

[466] Yahr, T. L. and M. C. Wolfgang. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Mol. Microbiol. 2006; 62:631-640.

[467] Ribeiro, C. M., A. M. Paradiso, U. Schwab, J. Perez-Vilar, L. Jones, W. O'neal, and R. C. Boucher. Chronic airway infection/inflammation induces a Ca2+i-dependent hyperinflammatory response in human cystic fibrosis airway epithelia. J. Biol. Chem. 2005; 280:17798-17806.

[468] Kube, D. M., D. Fletcher, and P. B. Davis. Relation of exaggerated cytokine responses of CF airway epithelial cells to PAO1 adherence. Respir. Res. 2005; 6:69.

[469] Dechecchi, M. C., E. Nicolis, V. Bezzerri, A. Vella, M. Colombatti, B. M. Assael, Y. Mettey, M. Borgatti, I. Mancini, R. Gambari, F. Becq, and G. Cabrini. MPB-07 reduces the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis bronchial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2007; 36:615-624.

[470] Fukuda, N., C. Jayr, A. Lazrak, Y. Wang, R. Lucas, S. Matalon, and M. A. Matthay. Mechanisms of TNF-alpha stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium. Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 2001; 280:L1258-L1265.

Pseudomonas aeruginosa (PA) représente une des causes principales d'infections respiratoires acquises chez les patients aux défenses immunitaires altérées et la colonisation par PA est une étape marquante de la dégradation de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement de ces infections est difficile à cause de la résistance naturelle du pathogène à un grand nombre d'antibiotiques et d'une augmentation de la prévalence des souches ayant acquis une multi-résistance.

Les facteurs de virulence de PA induisent une augmentation des sécrétions apicale de fluide par l'activation des transports transépithéliaux ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie calcique au niveau de l'épithélium respiratoire ; cependant l'impact de ces effets reste encore mal compris.

Sur un modèle de culture cellulaire de cellules épithéliales respiratoires en co-culture avec différentes souches de PA, nous montrons un effet protecteur d'un chélateur calcique (EGTA) sur la mort cellulaire induite par l'activation du système de sécrétion de type III (TTSS), un des principaux facteurs de virulence de PA. L'EGTA agit en diminuant l'adhésion de la bactérie et l'injection des exotoxines du TTSS dans le cytoplasme de la cellule épithéliale. Sur ce modèle, nous montrons aussi que les toxines du TTSS et l'EGTA induisent des modifications du cytosquelette des cellules épithéliales. L'autre partie de ce travail démontre le rôle du LPS de PA dans l'augmentation du calcium intracellulaire et la sécrétion de chlore des cellules épithéliales bronchiques humaines. Le LPS induit un relargage du calcium du réticulum ainsi qu'une entrée de calcium extracellulaire par des canaux membranaires. Cet effet est corrélé avec une augmentation de la sécrétion de chlore apicale dépendante de l'activation du CFTR mais aussi des canaux chlores activés par le calcium.

Ces effets rapides et encore peu décrits des facteurs de virulence de PA associés au rôle important du calcium intracellulaire et de la sécrétion de chlore des cellules épithéliales dans la signalisation de l'infection constituent probablement un des premiers signaux perçus par l'hôte. Ces mécanismes constituent une étape essentielle en recherche fondamentale afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques pour développer de nouvelles approches thérapeutiques en alternative aux antibiotiques.

Pseudomonas aeruginosa (PA) is an opportunistic Gram-negative bacillus involved in life-threatening infections including ventilator-acquired pneumonia and lung disease in cystic fibrosis. The treatment of these infections is often difficult due to its natural resistance to a large number of antibiotics and an increasing number of strains with acquired multi-resistance.

Virulence factors of PA induce an increase in apical fluid secretion of airways epithelial cells by activating transepithelial transport and by modifying calcium homeostasis in these cells. However, the consequence of these effects remains largely to be clarified.

We showed a protective effect of EGTA on TTSS-induced cell death in a co-culture model of epithelial cells with PA. EGTA protects the cells by a decreasing bacterial adhesion and reducing TTSS toxins translocation into the epithelial cells. In the same model, we have shown a disorganization of cytoskeleton by both EGTA and TTSS toxins. The second part of this work demonstrated the role of LPS from PA on intracellular calcium increase and activation of chloride secretion of human bronchial epithelial cells. LPS induced a calcium release from reticulum and a calcium entry from extracellular space. This increase is related to a chloride secretion by activation of CFTR and calcium-activated chloride channel.

Effects of virulence factors of PA associated to the important role for intracellular calcium and chloride secretion of epithelial cells described here may represent the first signals sensed by the host cells. The understanding of these mechanisms is a crucial step to considerate the pathophysiology and to develop alternative therapeutics to antibiotics.