



**UNIVERSITÉ  
DE GENÈVE**

**Archive ouverte UNIGE**

<https://archive-ouverte.unige.ch>

Thèse

2007

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

---

## Modulation du transport ionique transbronchique par les facteurs de virulence de *pseudomonas aeruginosa*

---

Guanella, Raphaël

### How to cite

GUANELLA, Raphaël. Modulation du transport ionique transbronchique par les facteurs de virulence de *pseudomonas aeruginosa*. Doctoral Thesis, 2007. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:494

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:494>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:494](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:494)

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTÉ DE MÉDECINE  
Section de médecine clinique  
Département de médecine  
interne  
Service de Pneumologie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Thierry ROCHAT

---

**« MODULATION DU TRANSPORT IONIQUE  
TRANSBRONCHIQUE PAR LES FACTEURS DE VIRULENCE  
DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA »**

Thèse

présentée par la Faculté de Médecine  
de l'Université de Genève  
pour obtenir le titre de Docteur en médecine

par

**Raphaël GUANELLA**  
de  
Coire, Grisons

Thèse n° **10516**  
Genève  
2007

## Résumé

La mucoviscidose est une maladie autosomale récessive dont la morbidité et la mortalité est principalement guidée par l'atteinte du système respiratoire. La clearance mucociliaire est un mécanisme de défense inné primordial dans l'élimination des pathogènes. La mutation du gène CFTR rencontré dans la mucoviscidose est responsable d'une hyperabsorption de sodium et d'un défaut de sécrétion de chlore au niveau de l'épithélium respiratoire. Cette anomalie de transport ionique induit une déshydratation de la fine couche de liquide recouvrant les voies respiratoires appelée « airway surface liquid » bloquant de ce fait partiellement le mécanisme de clearance mucociliaire.

Le but de notre travail est d'étudier si, en modifiant le transport ionique à travers l'épithélium bronchique humain, les facteurs de virulences issus de *P. aeruginosa* pouvaient interférer avec la clearance mucociliaire. Nous avons montré qu'un ou plusieurs facteurs de virulence issus de *P. aeruginosa* inhibaient l'absorption de sodium à travers l'épithélium bronchique humain. Les souches de *P. aeruginosa* ne produisant pas de rhamnolipides ou déficiente dans le système du quorum-sensing (QS) induisaient les mêmes effets. En accord avec l'apparition d'un mode de fonctionnement épithélial sécrétant, la réponse aux stimulateurs de la sécrétion de ions chlore était significativement plus importante après exposition aux produits bactériens. Cet effet était partiellement inhibé lors de l'utilisation de souches déficientes dans le système du QS. Ce travail montre donc que l'exposition aux produits bactériens issus de *P. aeruginosa* induit un mode de fonctionnement sécrétant au niveau des cellules épithéliales bronchiques humaines en culture primaire. Chez les personnes non porteuses de la mutation CFTR, l'exposition aux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* semble induire une augmentation de l'hydratation de l'ASL ; ces observations pourraient correspondre à un mécanisme de défense contre les pathogènes respiratoires.

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	4
1.1 Généralités.....	4
1.2 Rappel clinique.....	4
1.3 Pathogénèse de l'infection à <i>P. aeruginosa</i> .....	5
1.4 Adaptation de <i>P. aeruginosa</i> à son environnement.....	10
1.5 Buts de l'étude.....	12
<b>2. MATERIEL &amp; METHODES</b> .....	13
2.1 Cultures de cellules épithéliales bronchiques.....	13
2.2 Préparation des surnageants bactériens .....	15
2.3 Technique de la chambre de Ussing.....	16
2.4 Test de cytotoxicité MTT.....	18
2.5 Analyse physico-chimique des surnageants bactériens.....	19
2.51 Stabilité thermique .....	19
2.52 Effets du LPS .....	19
2.6 Analyse statistique.....	19
<b>3. RESULTATS</b> .....	20
3.1 Mesure des paramètres bioélectriques de base et effets du surnageant de la souche sauvage de <i>P. aeruginosa</i> PT5 .....	20
3.2 Etude de la conductance sodique après exposition aux produits bactériens .....	22
3.3 Etude de la conductance chlore après exposition aux produits bactériens.....	22
3.4 Comparaison des conditions contrôle LB et Krebs Ringer HEPES.....	25
3.5 Effets du surnageant de la souche mutée PT712 $\Delta$ rh1A .....	26
3.6 Effets des surnageants de souches mutées pour le système du quorum-sensing.....	27
3.7 Stabilité thermique des surnageants bactériens .....	28
3.8 Etude du rôle du LPS dans les effets observés.....	28
3.9 Test de cytotoxicité MTT .....	29
<b>4. DISCUSSION</b> .....	30
<b>5. ANNEXE</b> .....	36
<b>6. REFERENCES</b> .....	37

# 1. Introduction

## *1.1 Généralités*

La mucoviscidose ou fibrose kystique (FK) est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives graves dans la population caucasienne. En Suisse, son incidence est estimée à 1/2000 naissances vivantes. En 1989, le gène responsable de la maladie est mis en évidence sur le bras long du chromosome 7 en position 7q31 [1]. Ce gène de 250 kb code pour une glycoprotéine membranaire appelée « Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator » (CFTR) composée de 1480 acides aminés, et localisée au niveau de la paroi apicale de la plupart des cellules épithéliales. Elle appartient à la famille des transporteurs membranaires « ABC » (ATP binding cassette). Plus de 1200 mutations ont été identifiées à ce jour, la plus fréquente étant une délétion d'un acide aminé phénylalanine en position 508 ( $\Delta F508$ ) [2]. La dysfonction de cette protéine peut être liée, selon la mutation présente, à un manque de production, à un défaut de « trafficking » (mutation  $\Delta F508$ ) ou encore à un déficit dans sa fonction (défaut de régulation ou de conductance). Les deux principales activités de cette protéine sont de fonctionner comme un canal chlore régulé par l'AMP cyclique (AMPc) et de moduler la conductance d'autres canaux épithéliaux tels que le canal sodique ENaC (Epithelial Na Channel) [3].

## *1.2 Rappel clinique*

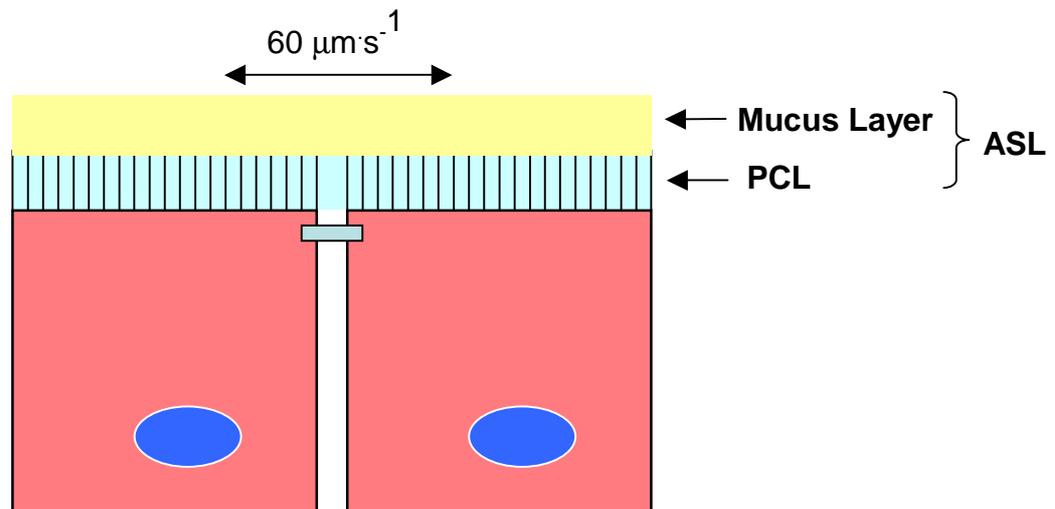
La mucoviscidose est une maladie polymorphe caractérisée par une exocrinopathie multisystémique touchant à la fois l'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie, voies biliaires), mais aussi les glandes sudoripares et l'appareil reproducteur. Le principal déterminant de la morbidité et de la mortalité de cette maladie est l'atteinte du

système respiratoire. Malgré l'apparente normalité du système respiratoire à la naissance, les patients développent précocement des infections broncho-pulmonaires chroniques et récidivantes. Les pathogènes initialement retrouvés sont le *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. En cours d'évolution apparaît le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, qui remplace les autres souches bactériennes ou s'y associe. Cette colonisation par *P. aeruginosa* se retrouve chez plus de 80% des patients adultes [4]. Une fois installée, l'infection endobronchique est définitive et évolue sous forme latente et insidieuse avec des phases d'exacerbations entraînant une réaction inflammatoire très marquée. Un cercle vicieux se met en place avec une hypersécrétion et une inflammation bronchique, auto-entretenu par la présence de médiateurs bactériens et cellulaires, menant progressivement à une insuffisance respiratoire chronique.

### ***1.3 Pathogénèse de l'infection à P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste que l'on retrouve dans l'environnement. Chez l'hôte sain, la bactérie est rapidement éliminée par une variété de systèmes de défense, dont un mécanisme de première importance : la « clairance mucociliaire » [5]. La fonctionnalité de ce système de défense inné nécessite, en premier lieu, la présence de cils fonctionnels battant de façon coordonnée. Le battement ciliaire permet de mettre en mouvement une couche de liquide bistratifiée appelée « airway surface liquid » (ASL) composée d'une phase aqueuse profonde adjacente aux cils (periciliary liquid layer ; PCL) et d'une phase de mucus sus-jacente (**Fig 1**).

**Figure 1. Schéma représentant l'ASL composé d'une couche périciliaire (PCL) et d'une couche muqueuse.**



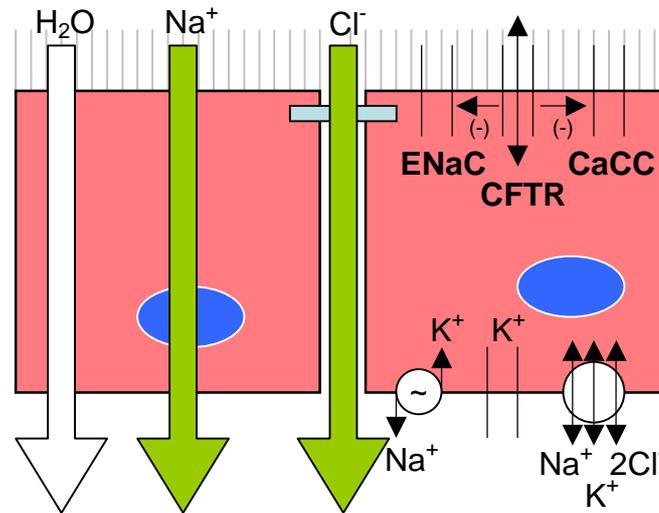
Lorsqu'une bactérie est inhalée, elle se fixe à la couche de mucus grâce à des interactions avec les mucines. De part leur grande diversité de chaînes carbohydrates, ces macromolécules peuvent interagir avec une grande variété de particules inhalées. Le battement ciliaire permet alors de mettre en mouvement la couche de mucus et d'éliminer la bactérie des voies respiratoires en moins de 6 heures. Durant ce laps de temps des molécules telles que la lactoferrine et le lysozyme inhibent la croissance bactérienne [6]. Les poumons possèdent un autre mécanisme de défense également très important appelé « cough clearance » qui est indépendant du mouvement ciliaire. Suite à des efforts de toux le mucus se mobilise sur la couche PCL.

Chez les patients atteints de FK, cette première ligne de défense est défectueuse et certaines bactéries semblent capables de survivre, de se multiplier, et d'induire une infection chronique. Le ou les mécanismes exacts responsables de la colonisation et de la perpétuation de l'infection broncho-pulmonaire par *P. aeruginosa* restent en grande partie inconnus. A l'heure actuelle, il existe plusieurs hypothèses à la fois contradictoires et complémentaires ayant pour but d'expliquer le lien entre la mutation de la protéine CFTR et l'hyper-susceptibilité aux

infections pulmonaires par *P. aeruginosa*. Une attention particulière a été portée récemment sur une anomalie possible du volume et de la composition de cette fine couche de liquide recouvrant les voies respiratoires.

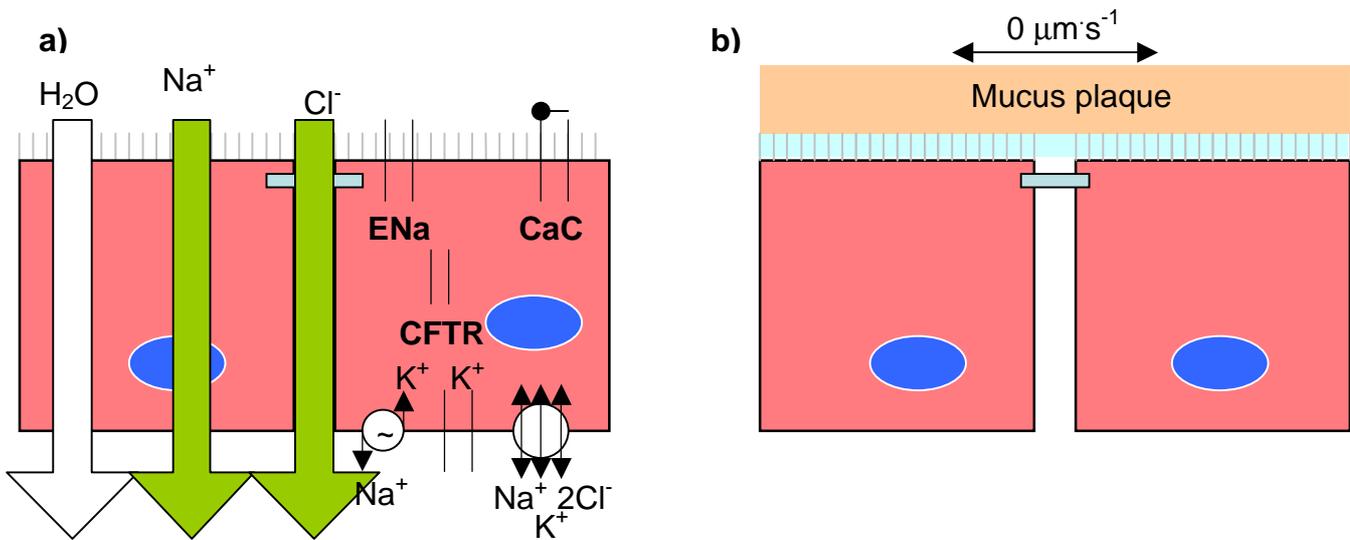
Le volume de l'ASL est régulé par 2 mécanismes. Le premier, passif, est lié à la couche de mucus qui joue un rôle de « réservoir ». Des études récentes ont en effet révélé la capacité de cette couche de mucus à libérer ou absorber le liquide contenu dans la couche périciliaire selon les circonstances afin de maintenir constant le volume de l'ASL [7]. Mais le mécanisme primordial par lequel l'épithélium respiratoire régule le volume de l'ASL est le transport isotonique de sel et d'eau [8]. Dans des conditions basales, l'épithélium respiratoire est absorbant. L'ion sodium est absorbé par voie transcellulaire au niveau apical de la cellule via le canal sodium amiloride-sensible ENaC, puis excrété au niveau de la membrane basolatérale par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Les anions chlore et bicarbonates sont transportés passivement par voie para-cellulaire en suivant le gradient électrochimique généré par l'absorption active du sodium. L'épithélium étant perméable à l'eau, le transport ionique est suivi d'un mouvement d'eau et l'ASL reste iso-osmotique (**Fig 2**). Dans certaines conditions, telles que l'inhibition de l'activité du canal ENaC et le déficit de volume de l'ASL, le mouvement de sel et d'eau peut s'inverser. Le gradient électrochimique est alors favorable à la sécrétion de ions chlore. Deux types de canaux chlore principaux sont exprimés au niveau de la membrane apicale des cellules bronchiques humaines : le CFTR, qui est régulé par le taux intracellulaire d'AMPc, ainsi que le canal dit CaCC pour « Calcium activated chloride channel », dont l'activité dépend de la concentration de calcium intracellulaire.

**Figure 2. Le transport ionique dans l'épithélium respiratoire.**



L'épithélium respiratoire de patients atteints de FK présente une double anomalie du transport ionique. En premier lieu, l'inhibition de l'activité du canal ENaC par le canal CFTR est déficiente. Cet épithélium présente donc une absorption augmentée de ions à l'état basal [9]. De plus, la sécrétion de ions chlore via le canal CFTR en cas de déplétion de l'ASL est anormale (**Fig 3 A**) [10, 11]. L'hyperabsorption du sodium et le déficit de sécrétion de chlore induisent tous deux une diminution du volume de l'ASL interférant avec le battement ciliaire. Les mucines contenues dans la couche muqueuse rentrent en contact avec les mucines et le glycocalyx de la surface des cellules épithéliales et réalise un véritable effet « velcro » (**Fig 3 B**). La déplétion au niveau de la couche PCL bloque donc à la fois le mécanisme de clearance mucociliaire et de clearance par la toux, deux mécanismes primordiaux de défense innée de l'organisme contre les agents bactériens.

**Figure 3. Transport ionique dans l'épithélium bronchique FK.**



**Légende :** a) Schéma montrant l'absorption augmentée de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O. L'absence de CFTR sur la surface apicale limite la capacité sécrétoire de Cl<sup>-</sup> et induit une hyperabsorption de Na<sup>+</sup>. b) Schéma montrant la diminution du volume de la couche périciliaire avec formation de plaques de mucus adhérentes sur les cellules épithéliales FK.

A l'inverse, des stratégies visant à augmenter l'hydratation et donc le volume de l'ASL semblent efficaces chez les patients atteints de FK. Une étude récente par Donaldson et al. a montré que l'inhalation journalière de NaCl hypertonique par des patients FK sur une durée de 2 semaines améliorait significativement le mécanisme de clearance mucociliaire [12]. Elkins et al. ont montré que l'administration d'un traitement similaire sur une période d'une année, bien que peu efficace sur l'amélioration des fonctions pulmonaires, diminuait de façon significative le nombre d'exacerbations respiratoires (réduction du risque relatif de 56%, p=0.02) et améliorait la qualité de vie [13].

Une hypothèse alternative met en évidence le rôle de la composition de l'ASL dans la défense passive contre les infections bactériennes [14]. D'après cette théorie, l'épithélium respiratoire produit un certain nombre de facteurs antibactériens endogènes tels que les défensines dont la

fonctionnalité dépend de la concentration en sel au sein de la couche ASL. En générant un contenu en sel inférieur à celui du plasma, l'épithélium respiratoire permet de maintenir actives ces molécules [15]. Dans le cas de la FK, la concentration en NaCl deviendrait plus élevée que la normale et rendrait donc inopérant les défensines présentes dans l'ASL. Smith et al. ont montré que l'ASL collecté in vitro à partir de cellules épithéliales FK en culture avaient une activité bactéricide diminuée qui pouvait revenir à la normale après diminution du contenu en sel de ce liquide [14]. Des études complémentaires ont suggéré que les  $\beta$ -défensine 1 et 2 étaient responsables de ce mécanisme de défense antimicrobien dépendant de la concentration en sel de l'ASL.

Ces 2 hypothèses sont source d'une grande controverse. Cependant, un certain nombre de travaux récents, ayant pour but de mesurer le contenu en ions et le volume de l'ASL in vivo et in vitro, n'ont pas révélé de différence notable de concentration en sel entre l'ASL des patients sain par rapport aux patients FK[16]. Il apparaît que l'ASL est isotonique dans les deux cas. Le mécanisme de la clearance « mécanique » via le mouvement ciliaire et les efforts de toux reste donc actuellement le modèle privilégié de défense inné du système respiratoire contre les pathogènes.

#### ***1.4 Adaptation de *P. aeruginosa* à son environnement***

Les bactéries ont développé de multiples mécanismes, leur permettant de détecter des modifications de certains paramètres environnementaux comme le pH, l'osmolarité, le type de nutriments et la densité bactérienne. Lors de la modification d'un de ces paramètres, la bactérie s'adapte en modulant la synthèse de plusieurs facteurs, ce qui lui permet de survivre. Le « quorum-sensing » (QS) est un système utilisé par la bactérie pour détecter les modifications de densité bactérienne au sein de sa population, afin de coordonner une réponse

adéquate à ce changement. Initialement décrit chez l'organisme marin bioluminescent *Vibrio fischeri*, un tel système de mieux en mieux caractérisé existe chez *P. aeruginosa* [17-21]. Ce système est fondé, chez les bactéries Gram négatif, sur la production de molécules diffusibles, appelées acyl-homoserine lactones (AHL), dont la quantité de production dépend de la densité bactérienne dans un environnement donné. Ces AHL sont synthétisés par une AHL-synthase qui est codée par un gène de type « I » pour inducteur. Ces molécules diffusent à travers l'enveloppe cellulaire bactérienne, et lorsque leur concentration atteint un seuil critique, se lient à un régulateur transcriptionnel de type « R ». Le complexe AHL-régulateur transcriptionnel va déclencher l'expression de gènes cibles. Le gène « I » est lui-même un de ces gènes cibles, raison pour laquelle les molécules d'AHL sont appelées auto-inducteurs. À ce jour, 3 systèmes distincts de type QS ont été caractérisés chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de *lasR/lasI*, *rhlR/rhII*, et *qscR*. Ces 3 systèmes contrôlent la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la virulence. Les facteurs de virulence dépendant de ce système comprennent des composés de faible poids moléculaire tels que la pyocyanine, les rhamnolipides et l'acide cyanhydrique, mais également des enzymes extracellulaires (protéases, exotoxines, phospholipases, lipases).

Comme décrit dans le chapitre précédent, on note la présence de nombreuses plaques et bouchons muqueux dans les voies aériennes des patients FK. L'analyse de la pression partielle d'oxygène par bronchoscopie au sein du mucus montre des valeurs extrêmement basses chez les patients FK. Des études in vitro ont montré que la conjonction d'épaisses plaques de mucus avec une consommation augmentée en oxygène par les cellules épithéliales porteuses de la mutation du gène CFTR étaient responsable de la genèse de « niches » anaérobies. En ajoutant des souches de *P. aeruginosa* à ces cultures, on note une migration active des bactéries au sein des plaques de mucus. La bactérie s'adapte en modifiant son phénotype (production d'alginate, défaut de mobilité) et forme des macrocolonies [22]. En

formant ces macrocolonies, la bactérie pourrait échapper aux mécanismes de défenses secondaires de l'hôte.

### ***1.5 Buts de l'étude***

Le but premier de notre étude est d'étudier les modifications du transport ionique trans-épithélial, induites par les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, en utilisant un modèle de culture de cellules épithéliales bronchiques humaines primaires cultivées en interface air-liquide. Nous voulons démontrer que par la modification du transport ionique, *P. aeruginosa* est capable de moduler indirectement la clearance mucociliaire.

Notre deuxième objectif est de rechercher la nature du/des produit(s) responsable(s) de ces effets, en utilisant à la fois des souches de *P. aeruginosa* mutées pour le système du quorum-sensing, mais aussi divers traitements physico-chimiques.

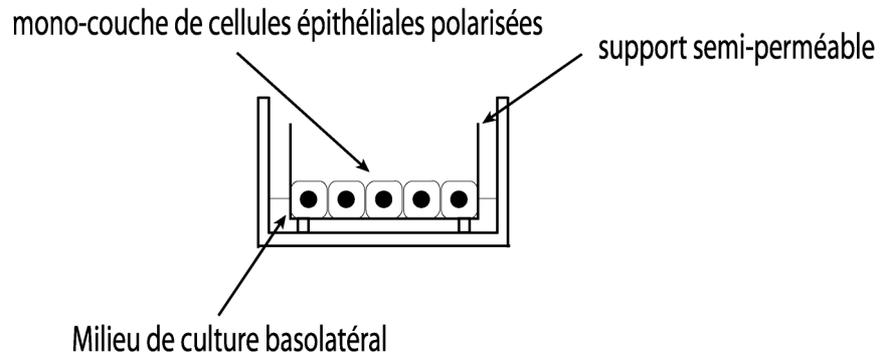
## 2. Matériel & méthodes

### *2.1 Cultures de cellules épithéliales bronchiques*

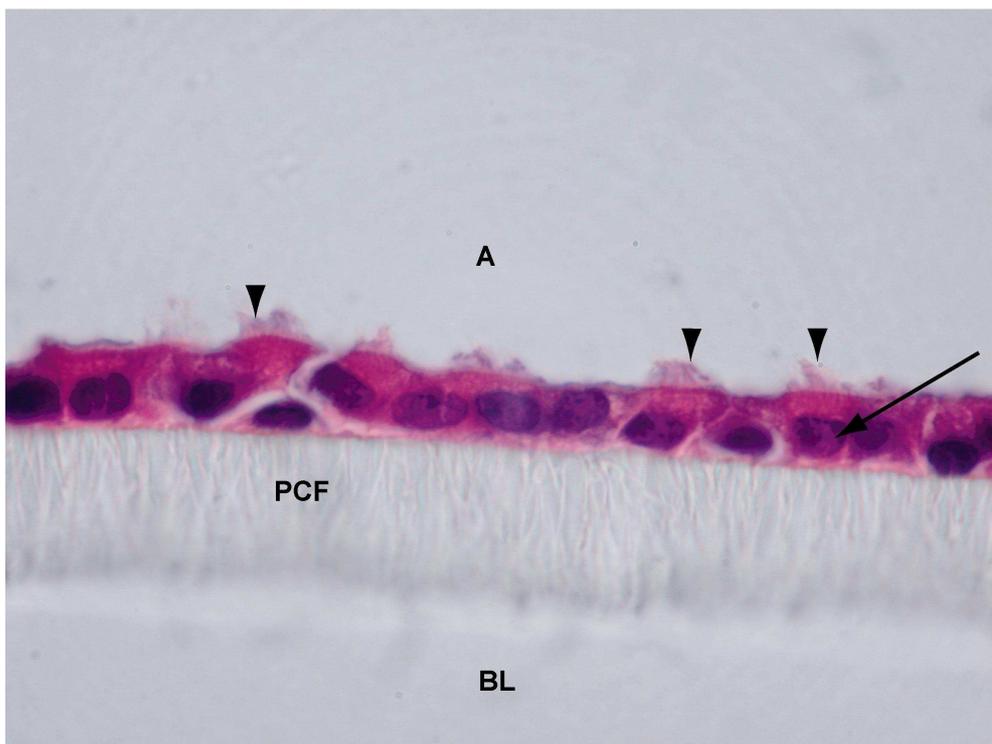
Les spécimens bronchiques ont été rincés à l'aide d'un tampon phosphate salin (PBS Dulbecco, GIBCO), disséqués du parenchyme pulmonaire adjacent, et incubés pour une durée de 24-48 heures à 4°C dans un mélange de DMEM : F12 (1 : 1) (GIBCO), Pronase (1.5 mg/ml, Boehringer-Mannheim) et Deoxyribonucléase (0.1 mg/ml, Sigma). Un mélange de DMEM : F12 5 % Fetal Calf Serum (FCS, Seromed) a été utilisé pour stopper l'activité de ces enzymes. Les cellules ont été ensuite collectées par centrifugation (100-125 X g , 10 min), re-suspendues dans du DMEM : F12 5% FCS et placées pendant 3 heures sur des boîtes de Petri préalablement traitées pour fixer les fibroblastes (Falcon Primaria tissue culture dishes, Million). Après comptage, les cellules ont été placées sur des supports semi-perméables (Millicell-PCF, Corning Costar, Milian) à une concentration de  $5.10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. Un jour après l'ensemencement, les milieux de culture apicaux et basolatéraux ont été aspirés et le milieu basolatéral remplacé par du DMEM : F12 (1:1) 2% Ultrosor G (BioSeptra, Villeneuve-la-Gavenne, France), pénicilline / streptomycine (100 µg/ml), fongizone (0.5 µg/ml). Les cellules ont été placées dans un incubateur 5 % CO<sub>2</sub> humidifié, cultivées en interface air-liquide et le milieu basolatéral changé chaque 72 heures (**Fig 4 A,B**).

**Figure 4. Support semi-perméable utilisé pour la culture de cellules bronchiques en interface air-liquide.**

**A**



**B**



**A.** Représentation schématique **B.** Coupe transversale en microscopie optique montrant l'épithélium monostatifé de cellules épithéliales bronchiques (flèche) au contact du support polycarbonate (PCF), avec par place la présence de cils (têtes de flèche). Pôle apical (A). Pôle basolatéral (BL). Agrandissement 400 X. Coloration hématoxyline-éosine.

## 2.2 Préparation des surnageants bactériens

Les souches de *P. aeruginosa* (**Table 1**) ont été cultivées sur plaque Luria agar pendant 12 heures puis inoculées dans 2 ml de Luria broth (LB). Après 12 heures de culture (37°C, 225 rpm), les bactéries ont été diluées d'un facteur 1 : 50 dans 20 ml de LB frais et cultivées pendant 24 heures supplémentaires. Si nécessaire, de la tetracycline (Sigma, 50 µg/ml), de la gentamycine (Sigma, 15 µg/ml), ou du chlorure de mercure (7.5 µg/ml), ont été ajoutés au milieu de culture. Les bactéries ont ensuite été éliminées par centrifugation (8000 X g, 25°C, 30 min.). Les surnageants ont été collectés, stérilisés à 2 reprises à l'aide d'un filtre 0.2 µm, et immédiatement stockés à -70°C.

**Table 1. Diverses souches de *P. aeruginosa* utilisées dans cette étude.**

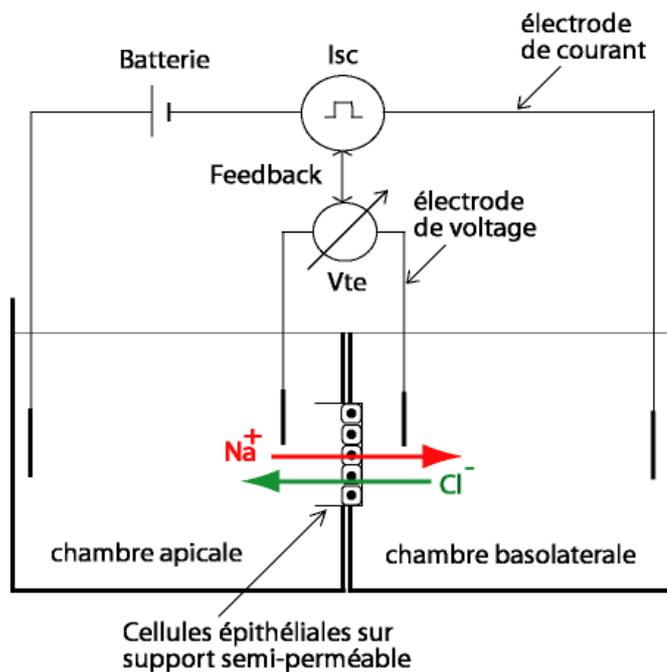
<b>Souche</b>	<b>Génotype</b>
<b>PT5</b>	PAO1 wild type
<b>PT712</b>	PT5 <i>rhlA</i> ::Gm <sup>r</sup>
<b>PT502</b>	PT5Δ <i>rhlI</i> ::Tn501 Δ <i>lasI</i> Hg <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>
<b>PT531</b>	PT5Δ <i>rhlR</i> ::Tn501 Δ <i>lasR</i> Hg <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>

La souche PT712, porteuse d'une mutation sur le gène responsable de la synthèse de la sous-unité protéique *rhlA* de l'enzyme rhamnolipid synthase, est incapable de synthétiser des rhamnolipides. La souche PT531 est mutée pour les activateurs transcriptionnels *rhlR* et *lasR*, alors que la souche PT502 l'est pour les gènes responsables de la synthèse des auto-inducteurs synthases *rhlI* et *lasI*. Il en résulte chez ces deux souches la diminution ou l'absence de production de nombreux facteurs de virulence tels que l'élastase, la protéase de type *lasA*, l'exotoxine A, les rhamnolipides, la pyocyanine et la protéase alcaline [20].

### ***2.3 Technique de la chambre de Ussing***

Après 4-6 semaines de culture, les supports semi-perméables ont été placés dans une chambre de Ussing (Jim's Instrument, Iowa City, IA, **Fig 5**). La chambre apicale et la chambre basolatérale ont été remplies par 5 ml de Krebs Ringer HEPES (KRH) contenant (mM) : 135 NaCl, 0.6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, et 5 Glucose. Les solutions ont été maintenues à une température de 37°C, et ventilées avec un mélange de 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>. La différence de potentiel trans-épithélial et le courant de court-circuit (I<sub>sc</sub>) ont été mesurés à l'aide d'un système de clamp de voltage (558C-5, Bioengineering, Iowa City, IA). Une paire d'électrodes, reliée aux chambres par des ponts KCl-agar, a permis la mesure du V<sub>te</sub>. Une seconde paire d'électrodes a permis la mesure du courant de l'I<sub>sc</sub>. La résistance trans-épithéliale (R<sub>te</sub>) a été déterminée en appliquant de manière périodique un pulse de potentiel. La modification correspondante de courant a été mesurée, et la résistance calculée selon la loi d'Ohm ( $R = \Delta U / \Delta I$ ).

**Figure 5. Représentation schématique d'une chambre de Ussing.**



L'épithélium et son support sont positionnés au centre d'une chambre de Ussing et baignés dans une solution de Krebs Ringer HEPES.

Le courant de court-circuit est défini comme étant le courant devant être appliqué à la monocouche de cellules pour amener le potentiel trans-épithélial à zéro. Cette valeur est le reflet du mouvement global de ions du côté apical vers le côté basolatéral et inversement. Au niveau de l'épithélium bronchique humain, la plus grande partie du courant de court-circuit est générée par l'absorption de sodium du pôle apical en direction du pôle basolatéral. L'autre composante de ce courant, de moindre importance à l'état basal, est la sécrétion des anions chlore et de bicarbonate dans le sens opposé [23].

Les agents pharmacologiques suivants ont été utilisés: amiloride (AML, 100  $\mu$ M), 3-isobutylmethylxanthine (IBMX, 50  $\mu$ M), forskoline (FK, 50  $\mu$ M), adénosine triphosphate (ATP, 100  $\mu$ M), glibenclamide (Glyb, 300  $\mu$ M), 4,4'-dinitrostilbène-2,2'-disulfonate (DIDS, 100  $\mu$ M).

Après une période initiale de stabilisation de 30 minutes, les surnageants bactériens, dilués à 2.5% volume / volume (2.5% V/V) dans du KRH ont été ajoutés au niveau de l'hémichambre apicale. Une condition contrôle LB diluée à 2.5% V/V dans du KRH a été effectuée en parallèle dans une deuxième chambre de Ussing. Les différentes variables bioélectriques ont été mesurées pendant une heure, puis de l'amiloride a été ajouté du côté apical pour bloquer les canaux ENaC. En présence d'amiloride, divers stimulateurs et inhibiteurs de la conductance chlore ont été testés.

Les modifications d' $I_{sc}$  induites par l'adjonction de ces différentes drogues ont été définies comme la différence entre la valeur calculée juste avant l'adjonction de la drogue et la valeur maximale suivant l'adjonction de la drogue ( $\Delta I_{sc \text{ pic}}$ ) ou la valeur mesurée en phase plateau ( $\Delta I_{sc \text{ plateau}}$ ) .

#### ***2.4 Test de cytotoxicité MTT***

La viabilité des cellules exposées aux produits bactériens a été évaluée par un test basé sur la détermination colorimétrique du clivage du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphénol tétrazolium bromide (MTT, Sigma, Buchs, Suisse) par les deshydrogénases mitochondriales en produit bleu formazan. Les mono-couches ont été lavées 2 fois avec du PBS Dulbecco, puis 250, respectivement 150  $\mu\text{l}$  de PBS 0.1% MTT ont été ajoutés du côté basolatéral et apical (60 min., 37°C). Le pigment bleu a été libéré de la cellule par adjonction de 500  $\mu\text{l}$  d'isopropanol du côté apical, et l'absorbance ensuite lue à 550 nm.

## ***2.5 Analyse physico-chimique des surnageants bactériens***

### ***2.51 Stabilité thermique***

La stabilité thermique des produits bactériens a été déterminée en chauffant les surnageants bactériens à 95°C pendant 30 minutes.

### ***2.52 Effets du LPS***

L'effet du LPS Sérotype 10 de *P. aeruginosa* (Sigma) sur le transport ionique a été testé en ajoutant 100 µg/ml de la substance au niveau de la chambre apicale. Les paramètres bioélectriques ont été mesurés pendant 60 min, et la réponse à diverses drogues a été testée, comme précédemment décrit.

Dans certaines expériences, les surnageants bactériens ont été soumis à une pré-incubation de polymyxine B (Sigma, 10 µg/ml) pendant 30 min. à 37°C, avant de débiter l'expérience de la chambre de Ussing. La polymyxine B est connue pour neutraliser en grande partie les effets du LPS en se liant sur le lipide A.

## ***2.6 Analyse statistique***

Les résultats ont été exprimés comme moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons entre deux conditions ont été effectuées par les tests de Student pairés et non pairés. Une valeur de  $p < 0.05$  a été considérée comme significative.

### 3. Résultats

#### *3.1 Mesure des paramètres bioélectriques de base et effets du surnageant de la souche sauvage de P. aeruginosa PT5*

Les paramètres bioélectriques de 172 mono-couches épithéliales non FK ont été mesurés. Après stabilisation, le courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) et le potentiel trans-épithélial s'élevaient respectivement à  $30 \pm 1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et  $-27.9 \pm 0.9 \text{ mV}$ . La résistance trans-épithéliale ( $R_{te}$ ) était de  $618 \pm 172 \Omega.\text{cm}^2$ .

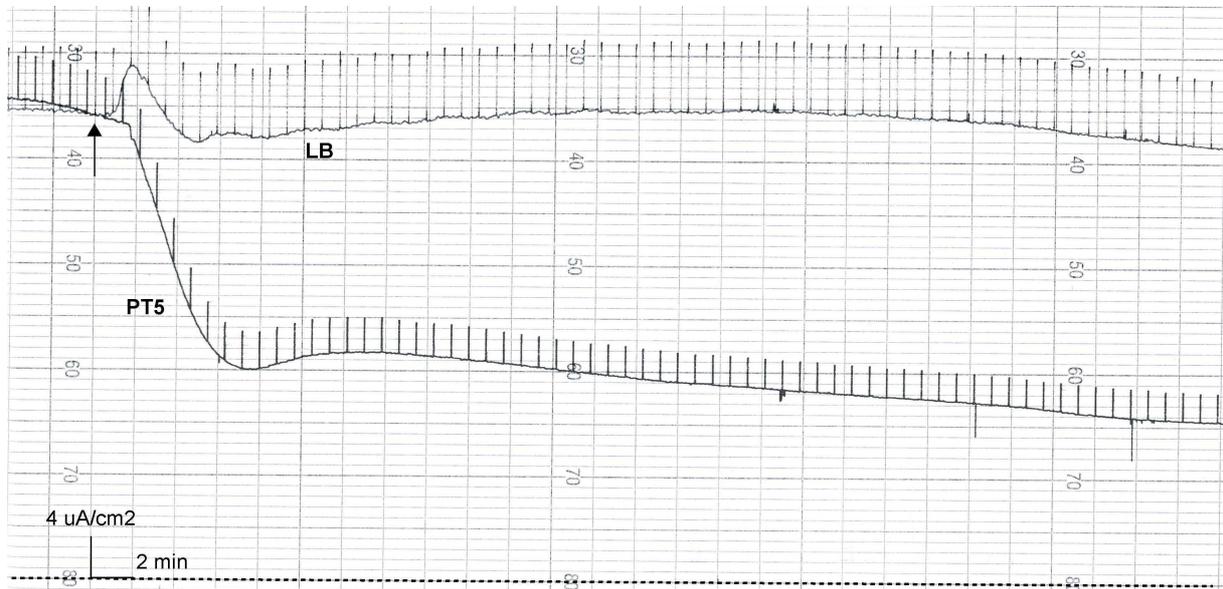
L'adjonction de surnageant bactérien à la concentration de 2.5% au niveau du pôle apical des mono-couches entraînait une diminution de l' $I_{sc}$  initialement rapide suivie d'une baisse plus lente (**Fig 6 A**). La baisse de l' $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$  60 min) et de la  $R_{te}$  à 60 minutes ( $\Delta R_{te}$  60 min) par rapport au temps initial étaient toutes deux significatives.

Les mono-couches exposées au milieu de culture bactérien LB seul, présentaient initialement une augmentation de l' $I_{sc}$  suivie d'une stabilisation et d'un retour à la valeur de base après 60 minutes, ainsi qu'une diminution significative de la  $R_{te}$  (**Fig 6 A**).

Par rapport à la condition contrôle, la mesure de l' $I_{sc}$  à 60 minutes ( $I_{sc}$  60 min) était significativement plus faible dans la condition exposée au surnageant bactérien ( $p < 0.01$  ; **Fig 6 B**).

**Figure 6. Effets du surnageant de la souche sauvage de *P. aeruginosa* PT5**

**A**



**B**

	$I_{sc}$ basal ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$I_{sc}$ 60 min	$\Delta I_{sc}$ 60 min	$R_{te}$ basal ( $\Omega.\text{cm}^2$ )	$R_{te}$ 60 min	$\Delta R_{te}$ 60 min
<b>LB</b> (n=14)	$28.1 \pm 3.6$	$27.3 \pm 2.5$	$-0.8 \pm 1.6$	$585 \pm 59$	$499 \pm 50$	$-85 \pm 30$
<b>PT5</b> (n=14)	$29 \pm 3.2$	$15.1 \pm 0.9^{**}$	$-14 \pm 3^{**}$	$580 \pm 43$	$692 \pm 77^*$	$112 \pm 54^{**}$

**A.** Tracé représentatif de la modification au cours du temps du courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) et de la résistance trans-épithéliale ( $R_{te}$ ) suite à l'adjonction (flèche) de surnageant bactérien (PT5), comparé à la condition contrôle (LB). Les déflexions verticales représentent la modification de l' $I_{sc}$  induite par des pulses de potentiel de +5 mV, permettant ainsi de calculer la  $R_{te}$  selon la loi d'Ohm.

**B.** Paramètres bioélectriques mesurés au temps 0 ( $I_{sc}$ ,  $R_{te}$  basal), après 60 min ( $I_{sc}$ ,  $R_{te}$  60 min). Différence statistiquement significative par rapport au contrôle LB : \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ .

### ***3.2 Etude de la conductance sodique après exposition aux produits bactériens***

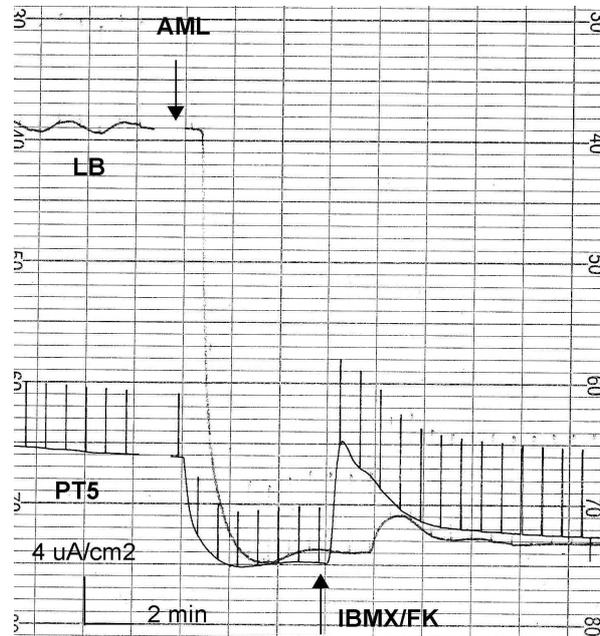
Pour tester la composante sodium-dépendante du courant de court-circuit, nous avons ajouté de l'amiloride après 60 minutes de traitement (**Fig 7 A**). La chute de l' $I_{sc}$ , exprimée en valeur absolue ( $\Delta I_{sc \text{ amil}}$ ), était significativement plus faible dans la condition traitée que dans la condition contrôle ( $p < 0.01$ ). Par ailleurs, l' $I_{sc}$  mesuré après adjonction de l'amiloride était significativement plus faible pour les mono-couches exposées aux produits bactériens ( $\Delta I_{sc \text{ post amil}}$ ,  $p < 0.01$ ).

### ***3.3 Etude de la conductance chlore après exposition aux produits bactériens***

Après 60 minutes d'exposition au surnageant bactérien et inhibition du courant sodique par l'amiloride, nous avons testé la réponse des mono-couches à différents sécrétagogues de l'ion chlore. L'IBMX et la forskoline ont été ajoutés afin de stimuler la sécrétion de  $Cl^-$  dépendante du c-AMP. La forskoline active l'enzyme responsable de la synthèse du cAMP (adénylate-cyclase), alors que l'IBMX inhibe le catabolisme du cAMP (inhibiteur de la phosphodiesterase) [23]. De nombreuses études ont montré que l'activité du canal CFTR est dépendante de la quantité intracellulaire du messenger intracellulaire c-AMP [24]. L'IBMX/forskoline induisait une réponse de type pic ( $\Delta I_{sc \text{ IBMX/FK p}}$ ), suivi d'un plateau ( $\Delta I_{sc \text{ IBMX/FK pl}}$ ). Les réponses pic et plateau observées étaient significativement plus importantes dans la condition traitée ( $p < 0.01$ ; **Fig 7 A,B**). L'addition successive d'ATP, connue pour activer une conductance chlore dépendante du  $Ca^{++}$  intracellulaire, induisait une augmentation de l' $I_{sc}$  plus marquée dans la condition traitée, mais de manière non significative (**Fig 7 B**) [25].

**Figure 7. Etude des conductances sodium et chlore après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens.**

**A**



**B**

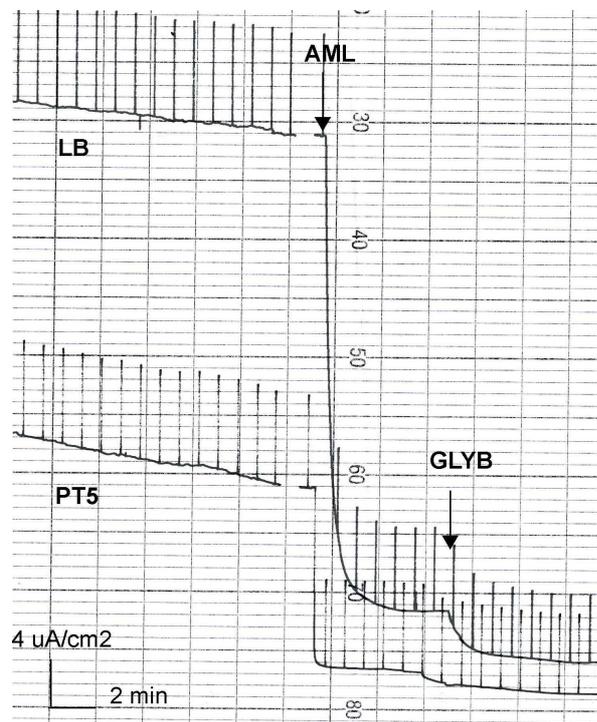
	$\Delta I_{sc \text{ amil}}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$I_{sc \text{ post-amil}}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$\Delta I_{sc \text{ IBMX/FK p}}$	$\Delta I_{sc \text{ IBMX/FK pl}}$	$\Delta I_{sc \text{ ATP}}$
<b>LB</b> (n=14)	$-19 \pm 2.7$	$8.6 \pm 0.8$	$9 \pm 1.9$	$2.5 \pm 0.6$	$7.1 \pm 2.9$
<b>PT5</b> (n=14)	$-10.4 \pm 0.9^{**}$	$4.7 \pm 0.6^{**}$	$16.8 \pm 2.2^*$	$4.7 \pm 0.8^*$	$10.9 \pm 2.9$

**A** Tracé représentatif des modifications de l' $I_{sc}$  et de la  $R_{te}$  suite à l'adjonction d'amiloride (AML) et d'IBMX / forskoline (IBMX / FK) après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens (PT5) par rapport au contrôle LB (LB).

**B** Réponses à l'AML, à l'IBMX / forskoline puis à l'ATP après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens (PT5) ou au milieu de culture seul (LB). Différence statistiquement significative par rapport au contrôle LB : \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ .

Dans d'autres expériences, nous avons comparé l'effet de différents inhibiteurs de la conductance chlore après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens et inhibition de la conductance sodique par l'amiloride. La baisse d' $I_{sc}$  induite par l'adjonction de DIDS du côté apical dans la condition traitée n'était pas différente de celle observée dans la condition contrôle ( $\Delta I_{sc} = 1.14 \pm 0.1 \mu A/cm^2$  et  $1.16 \pm 0.1 \mu A/cm^2$ , respectivement ;  $n=5$ ) . Le DIDS a la particularité d'inhiber de nombreux canaux chlore à l'exception du canal CFTR. Le glibenclamide, qui est un inhibiteur des canaux potassiques ATP dépendant et du canal CFTR, induisait une chute de l' $I_{sc}$  dont l'amplitude était plus faible pour les mono-couches exposées aux produits bactériens par rapport à la condition contrôle LB ( $\Delta I_{sc} = 1.9 \pm 0.9 \mu A/cm^2$  et  $4.2 \pm 1.1 \mu A/cm^2$ , respectivement ;  $n=5$  ; NS) (**Fig 8**).

**Figure 8. Etude de la conductance chlore dépendante du canal CFTR.**



Tracé représentatif de l'effet du glibenclamide (**GLYB**) après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens et blocage du transport de ions sodium par l'amiloride (**AML**).

### 3.4 Comparaison des conditions contrôle LB et Krebs Ringer HEPES

Nous avons observé une baisse progressive de l' $I_{sc}$  dans la condition Krebs Ringer HEPES (KRH) alors que l' $I_{sc}$  dans la condition LB présentait initialement une augmentation suivie d'une stabilisation (**Fig 9 A**). La valeur d' $I_{sc}$  mesurée à 60 minutes dans le contrôle KRH était plus faible (NS). L'adjonction d'amiloride induisait une chute de l' $I_{sc}$  de même amplitude dans les 2 conditions. Toutefois, la valeur d' $I_{sc}$  mesurée après adjonction d'amiloride était significativement plus élevée au niveau des mono-couches exposées au LB (**Fig 9, B**).

La réponse à l'IBMX / FK était de même intensité dans les deux conditions contrôle.

**Figure 9. Comparaison des contrôle LB et Krebs Ringer HEPES.**

**A**

	$I_{sc}$ basal ( $\mu A/cm^2$ )	$I_{sc}$ 15 min	$I_{sc}$ 60 min	R basal ( $\Omega.cm^2$ )	R 60 min	$\Delta R$ 60 min
<b>LB</b> (n=15)	30.6 $\pm$ 4.6	32.8 $\pm$ 4.3	29.7 $\pm$ 3.9	607 $\pm$ 51	517 $\pm$ 47	-90 $\pm$ 21
<b>KRH</b> (n=15)	28.7 $\pm$ 4.3	27.7 $\pm$ 4.3	26.2 $\pm$ 4.5	628 $\pm$ 50	570 $\pm$ 52	-58 $\pm$ 25

**B**

	$\Delta I_{sc}$ amil ( $\mu A/cm^2$ )	$I_{sc}$ post-amil ( $\mu A/cm^2$ )	$\Delta I_{sc}$ IBMX/FK p	$\Delta I_{sc}$ IBMX/FK pl
<b>LB</b> (n=15)	-21.9 $\pm$ 3.8	8.2 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 0.4
<b>KRH</b> (n=15)	-20 $\pm$ 4.4	6.4 $\pm$ 0.5**	7.9 $\pm$ 1	1.9 $\pm$ 0.4

**A.** Valeurs bioélectriques de base et leurs modifications après exposition au milieu de culture seul (LB), comparé au contrôle KRH.

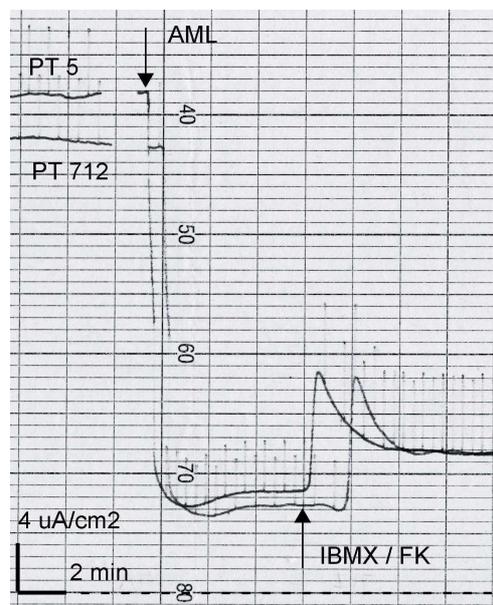
**B** Modification de l' $I_{sc}$  après adjonction d'AML puis IBMX / FK. Différence statistiquement significative par rapport au contrôle KRH : \*\*, p < 0.01.

### 3.5 Effets du surnageant de la souche mutée PT712 $\Delta rhlA$

Nous avons testé le mutant PT712 afin d'évaluer le rôle des rhamnolipides dans les effets observés. Comparé à la souche sauvage PT5, la baisse de l' $I_{sc}$  et l'augmentation de la  $R_{te}$  mesurés après 60 minutes n'étaient pas significativement différentes. Les réponses à l'amiloride et à l'IBMX / FK étaient de même intensité (**Fig 10**). Pour vérifier la non production de rhamnolipides par cette souche, nous avons utilisé des plaques agar contenant du CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium- bromide) et du bleu de méthylène [26]. Ces plaques ont été incubées pour une durée de 24 heures à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à apparition d'un halo bleu signant la production de rhamnolipides. Seules les plaques ensemencées avec la souche PT5 présentaient un halo bleu.

**Figure 10. Comparaison des effets des surnageants issus des souches PT5 et PT712.**

**A**



## B

	$\Delta I_{sc}$ 60 min ( $\mu A/cm^2$ )	$\Delta R_{te}$ 60 min ( $\Omega.cm^2$ )	$I_{sc}$ post-amil	$\Delta I_{sc}$ IBMX/FK p	$\Delta I_{sc}$ IBMX/FK pl
<b>PT5</b> (n=5)	$-12.6 \pm 2.7$	$40 \pm 38$	$18.4 \pm 4.5$	$25.9 \pm 3.7$	$6.6 \pm 1$
<b>PT712</b> (n=5)	$-15 \pm 5$	$73 \pm 21$	$14.7 \pm 3.5$	$19.9 \pm 5.1$	$5.3 \pm 1.7$

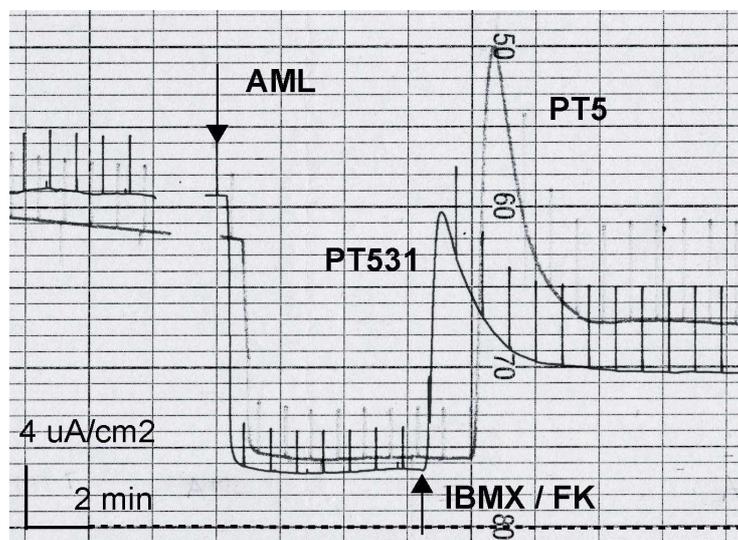
**A.** Tracé représentatif des effets de l'amiloride (**AML**) puis de l'IBMX / forskoline (**IBMX / FK**), après 60 minutes d'exposition au surnageant de *P. aeruginosa* PT5 et PT712.

**B.** Paramètres bioélectriques de base et comparaison des réponses à l'amiloride et à l'IBMX/FK. NS, différence non significative.

### ***3.6 Effets des surnageants de souches mutées pour le système du quorum-sensing.***

Nous avons comparé l'effet de surnageants bactériens obtenus à partir de souches mutantes pour le système du quorum-sensing par rapport à la souche sauvage PT5. La mesure de l' $I_{sc}$ , de la  $R_{te}$  à 60 minutes puis la réponse à l'amiloride étaient similaires dans le groupe contrôle PT5 par rapport aux 2 conditions traitées PT531 et PT502. Par rapport au contrôle PT5, les réponses à l'IBMX / FK de type pic et plateau étaient significativement plus faible dans les condition exposées aux produits bactériens de PT531 (**Fig 11**) et PT502 ( $\Delta I_{sc}$  IBMX/FK p =  $27.7 \pm 3$  versus  $13.2 \pm 3.1 \mu A/cm^2$  respectivement ; n=4 ; p<0.01) .

**Figure 11. Comparaison des effets de surnageants issus des souches PT5 et PT531.**



	$\Delta I_{sc}$ 60 min ( $\mu A/cm^2$ )	$\Delta R$ 60 min ( $\Omega.cm^2$ )	$\Delta I_{sc}$ amil	$I_{sc}$ post-amil	$\Delta I_{sc}$ IBMX/FK p	$\Delta I_{sc}$ IBMX/FK pl
<b>PT5</b> (n=9)	$-13.1 \pm 1.9$	$44 \pm 25$	$22.4 \pm 3.6$	$5 \pm 0.8$	$23.5 \pm 2.4$	$6.2 \pm 0.6$
<b>PT531</b> (n=9)	$-10 \pm 2.3$	$13 \pm 25$	$23 \pm 4.9$	$5.6 \pm 0.8$	$12.8 \pm 2^{**}$	$3.4 \pm 0.8^{**}$

Tracé représentatif des effets de l'amiloride (AML) puis de l'IBMX / forskoline (IBMX / FK), après 60 minutes d'exposition au surnageant de *P. aeruginosa* PT5 et PT531. Différence statistiquement significative par rapport au contrôle LB : \*\* p< 0.01.

### **3.7 Stabilité thermique des surnageants bactériens**

Nous avons testé la stabilité thermique du/des facteur(s) responsable(s) de l'effet observé.

Comparé au surnageant non chauffé, le surnageant chauffé induisait le même type de réponse sur l' $I_{sc}$ , la  $R_{te}$ , la réponse à l'amiloride et à l'IBMX/FK (data not shown).

### **3.8 Etude du rôle du LPS dans les effets observés**

Nous avons testé l'effet du LPS S 10 (100  $\mu g/ml$ ) en suivant le schéma expérimental utilisé lors de l'étude de l'effet du surnageant bactérien. Le LPS n'induisait aucune modification

significative de l' $I_{sc}$  et de la  $R_{te}$  pendant les 60 premières minutes de mesure. Les réponses à l'amiloride et à l'IBMX/forskoline n'étaient pas différentes du contrôle KRH.

Dans un certain nombre d'expériences, nous avons testé si les effets observés avec les surnageants issus de la souche sauvage étaient réversibles lors d'un prétraitement des surnageants avec de la polymyxine B. En effet, la polymyxine B est connue pour antagoniser certains effets du LPS en se fixant sur la partie lipide A [27]. Comparé au surnageant non traité, les mono-couches prétraitées avec de la polymyxine B puis exposées au surnageant bactérien présentaient les mêmes modifications de l' $I_{sc}$  et de la  $R_{te}$  durant les 60 premières minutes. Les réponses à l'amiloride et à l'IBMX/forskoline étaient similaires (data not shown).

### ***3.9 Test de cytotoxicité MTT***

Nous avons quantifié la viabilité des mono-couches par le test de cytotoxicité MTT. Les mono-couches exposées pendant 60 minutes aux produits bactériens n'ont pas montré de différence statistiquement significative par rapport à la condition contrôle (OD 550 nm  $1.435 \pm 0.186$  versus  $1.454 \pm 0.177$ , n=5).

## 4. Discussion

La clearance mucociliaire est un système de défense inné des voies aériennes contre de nombreux pathogènes. L'intégrité de ce système dépend de l'hydratation adéquate de la fine couche de liquide située à la surface des voies aériennes et de la présence de cils fonctionnels. Il semble toutefois que l'hydratation de l'ASL joue un rôle dominant dans la clearance mucociliaire. Des études sur modèle murin ont montré de façon surprenante que l'absence de cils ou la non fonctionnalité de ces derniers n'induisait que peu ou pas d'atteinte pulmonaire [28]. L'étude de la clearance mucociliaire à l'aide de traceurs radioactifs montre que le mécanisme de clearance par la toux reste fonctionnel chez les patients atteints de dyskinésie ciliaire [29]. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'un ASL dont le volume est normal voir augmenté [30].

A l'inverse, il a été démontré dans un modèle de souris transgénique que la sur-expression de la sous-unité bêta du canal ENaC, induisant une hyperactivité de ce canal, réduisait le volume de l'ASL et entravait le mécanisme de clearance mucociliaire. L'analyse histologique des bronchioles a révélé de nombreuses plaques et bouchons muqueux. La mortalité de ces souris à 30 jours, secondaire à une insuffisance respiratoire, s'élevait à 60 % [5]. Une étude menée par Boucher et al., a révélé qu'un ou plusieurs facteurs bactériens issus de *P. aeruginosa* avaient la propriété d'inhiber le transport ionique à travers l'épithélium bronchique canin. Par des mesures du flux ionique isotopique, il a été montré que cet effet était en partie médié par une inhibition du transport de sodium du milieu apical au milieu basolatéral [14]. La question adressée par notre travail était donc de déterminer si les facteurs de virulence obtenus à partir de surnageants de cultures in vitro de *P. aeruginosa* pouvaient induire des modifications sur le transport ionique de cellules épithéliales respiratoires en cultures primaires.

Nous avons montré que les produits bactériens issus de la souche sauvage *P. aeruginosa* induisent une diminution du courant de court-circuit, ainsi qu'une augmentation de la résistance trans-épithéliale sur des mono-couches de cellules épithéliales bronchiques humaines. A l'état basal, une grande part du courant de court-circuit mesuré est généré par l'absorption trans-cellulaire de sodium [20]. Pour déterminer si la baisse du courant de court-circuit observée est liée à une inhibition du transport de sodium, nous avons ajouté de l'amiloride après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens. La chute de l' $I_{sc}$  après adjonction d'amiloride est systématiquement plus faible dans la condition traitée. Nous avons donc conclu qu'un ou plusieurs produits bactériens provenant de *P. aeruginosa* induisent une inhibition du transport de sodium.

Une étude menée par DM Geddes et al. a montré que, sur des cultures in vitro d'épithélium respiratoire de mouton, les rhamnolipides issus de *P. aeruginosa* seraient responsable de la baisse du courant de court-circuit en inhibant l'absorption de ions sodium [15]. Pour vérifier si ces résultats se confirmaient sur notre modèle de cellules bronchiques humaines, nous avons utilisé la souche mutante de *P. aeruginosa* PT712  $\Delta rhlA$  ne produisant pas de rhamnolipides [31]. Dans nos expériences, la baisse de l' $I_{sc}$  après 60 minutes d'exposition aux produits bactériens puis la réponse à l'amiloride se sont révélées similaires entre la souche sauvage de *P. aeruginosa* et la souche ne produisant pas de rhamnolipides. Ceci suggère que ce facteur de virulence n'est pas responsable des effets observés dans notre modèle d'épithélium bronchique humain. L'absence de production de rhamnolipides par la souche PT712 a été vérifiée sur des plaques agar CTAB [26]. Toutefois, la production de rhamnolipides par la souche PT5 n'a pas été testé de façon formelle à partir des surnageants bactériens. Un dosage qualitatif comprenant une extraction à l'éther suivi d'un dosage par la méthode de l'Orcinol aurait pu être effectuée [32]. L'absence de différence entre les 2 conditions pourrait donc être expliquée par l'absence de production de rhamnolipides par la

souche sauvage PT5. L'augmentation des résistances transépithéliales lors de l'exposition aux surnageants issus de la souche PT5 conforte cette hypothèse. En effet, en cas de production de rhamnolipides, on s'attendrait plutôt à une diminution des résistances trans-épithéliales [33].

Plusieurs études utilisant différents modèles animaux ont confirmé l'importance du quorum-sensing dans la virulence de *P. aeruginosa*. Dans un modèle de pneumonie à *P. aeruginosa* chez la souris nouveau-née, les effets de la souche PT5 et de différents dérivés mutants ont été testés. Une souche rendue déficiente en *lasR* induisait une pneumonie beaucoup moins sévère ainsi qu'une mortalité significativement inférieure. De même, une diminution significative de la virulence a été objectivée avec des souches mutantes pour les gènes *lasI*, *rhlI*, ou un double mutant pour *lasI* et *rhlI*. [34]. Dans un modèle de souris brûlée et infectée par *P. aeruginosa*, les souches mutées pour le système du quorum-sensing (*lasI*, *lasR*, *rhlI*) présentaient également des infections cutanées moins sévères. Le double mutant *lasI* et *rhlI* était la souche la moins virulente [35]. En utilisant l'amibe *Dictyostelium discoideum*, Köhler et son équipe ont montré que la souche sauvage de *P. aeruginosa* PT5 avait un effet inhibiteur sur la croissance de l'amibe. Les mutants isogéniques déficients dans le système du quorum-sensing *rhl* étaient significativement moins virulents. [36].

Nous avons donc testé les surnageants obtenus à partir de souches mutantes pour le système du quorum-sensing. De façon surprenante, l'effet sur le courant de court-circuit et la réponse à l'amiloride sont restés similaires entre la souche PT5 et les souches mutées. Kunzelmann et al. ont récemment montré que la flagelline, un des composants majeurs de la flagelle de *P. aeruginosa*, inhibait le transport sodique via le canal ENaC sur des trachées de souris [37]. L'expression du gène *fliC*, responsable de la synthèse de flagelline ne semble pas être régulée par le système du quorum-sensing. En effet, une étude menée par S. Lory et al. a montré chez

*P. aeruginosa* que la répression de l'expression du gène *fliC*, ne dépendait pas de *lasR* ni de *rhlR* [38]. Par ailleurs, il est possible que certaines bactéries libèrent dans leur environnement de la flagelline sous forme monomérique en raison d'un « capping » inefficace lors du processus de formation de la flagelle ou par perte de sa flagelle dans l'environnement. Cette dernière ainsi libérée pourrait alors être dégradée en monomères de flagelline par des protéases ou des substances détergentes de l'hôte. Un tel phénomène a été décrit chez *Caulobacter crescentus* [39]. Nous n'avons malheureusement pas pu tester cette hypothèse, n'ayant pas pu disposer de flagelline dans nos expériences ou de méthode pour détecter la présence de cette protéine dans nos surnageants bactériens.

En comparant la réponse à l'amiloride entre la condition exposée aux produits bactériens et la condition contrôle LB, nous avons été frappé par la mesure d'une valeur d' $I_{sc}$  post-amiloride systématiquement plus élevée et d'une réponse au glibenclamide plus importante dans le contrôle LB. Ce qui a soulevé 2 hypothèses : soit un ou plusieurs composants contenus dans le milieu de culture LB stimulaient une conductance chlore, soit les produits bactériens avaient un effet inhibiteur à la fois sur la conductance sodique et sur une conductance chlore. Nous avons donc comparé les valeurs d' $I_{sc}$  après ajout d'amiloride entre le contrôle LB, et un 2<sup>ème</sup> contrôle contenant uniquement du Krebs Ringer HEPES (KRH). La valeur d' $I_{sc}$  après adjonction d'amiloride était systématiquement plus élevée dans la condition LB. Ces résultats dénotent un possible effet stimulateur du milieu de culture LB sur la sécrétion de ions chlore. Toutefois, la réponse au glibenclamide entre les mono-couches exposée au milieu LB par rapport au KRH n'a malheureusement pas été testée.

La sécrétion de ions chlore joue elle aussi un rôle important dans le maintien du volume de l'ASL. Nos expériences ont montré une réponse plus marquée lors de la stimulation de la conductance chlore CFTR-dépendante suite à l'exposition aux produits bactériens. Comme

décrit dans le précédent paragraphe, il se pourrait qu'une partie de cette différence soit due au fait que le contrôle LB stimule déjà une sécrétion chlore. La réponse aux sécrétagogues du ion chlore serait donc plus faible, les canaux chlore étant déjà stimulés par le LB. Toutefois, lors de l'utilisation de souches mutantes pour le quorum-sensing, il est apparu que la réponse à l'IBMX / FK était significativement plus faible comparé à la souche PT5. Un facteur bactérien dépendant du quorum-sensing pourrait donc être responsable d'une augmentation de la réponse de la sécrétion chlore dépendante de l'AMPC.

En résumé, nous avons montré que les produits bactériens issus de *P. aeruginosa* :

- inhibent l'absorption de sodium par les canaux ENaC.
- augmentent la sécrétion du chlore par les canaux CFTR lorsque ceux-ci sont stimulés par la voie de l'AMPC.

Il résulte de cet action que le volume de l'ASL doit théoriquement augmenter, chose que nous n'avons pas pu formellement démontrer car les techniques nécessaires auraient été bien au delà du cadre de cette étude. Malgré l'utilisation de souches bactériennes mutées, il ne nous a pas été possible d'identifier le ou les produits bactériens responsables de l'inhibition des canaux ENaC. Le rôle des rhamnolipides dans la modulation du transport ionique reste peu clair étant donné l'incertitude quant à la production de ce facteur de virulence par la souche PT5 dans nos conditions de culture. En revanche, pour ce qui est de l'augmentation de la sécrétion de chlore induite par l'AMPC un des nombreux facteurs dépendant du quorum-sensing pourrait être impliqué.

Quelles sont les implications cliniques de l'apparition d'un phénotype épithélial sécrétant suite à l'exposition aux produits bactériens de *P. aeruginosa* ? La réponse des cellules épithéliales pourrait correspondre à un mécanisme de défense. En effet, en diminuant

l'absorption d'électrolytes, l'épithélium respiratoire pourrait favoriser l'élimination et la clearance de ce pathogène. La réponse de l'épithélium en cas de mutation du gène CFTR n'a pas été étudié dans cette étude et pourrait représenter une prochaine étape intéressante. Il est possible que la réponse observée chez le sujet sain soit absente chez le patient FK.

## 5. Annexe

Je tiens à remercier chaleureusement :

- Le Professeur Thierry RoCHAT pour sa participation active, sa disponibilité, son regard critique, et sa précieuse contribution au projet.
- Le Docteur Christian Van Delden et Monsieur Thilo Köhler pour la relecture attentive de ce travail et de m'avoir apporté le goût pour la recherche fondamentale.
- Mon épouse Valérie, pour sa présence et son soutien.
- Mon frère et mes parents, qui m'ont constamment encouragé durant la rédaction de ce travail.
- Tous mes amis.

## 6. Références

1. Davis, P.B., M. Drumm, and M.W. Konstan, *Cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(5): p. 1229-56.
2. *Cystic fibrosis gene analysis consortium*. 2000.
3. Kunzelmann, K., *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. **137**: p. 1-70.
4. Pin, I., et al., [*Specific aspects and care of lung involvement in adults with cystic fibrosis*]. Rev Mal Respir, 2000. **17**(3 Pt 2): p. 758-78.
5. Mall, M., et al., *Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 487-93.
6. Cole, A.M., P. Dewan, and T. Ganz, *Innate antimicrobial activity of nasal secretions*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3267-75.
7. Tarran, R., et al., *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**(2): p. 223-36.
8. Boucher, R.C., *Human airway ion transport. Part one*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(1): p. 271-81.
9. Stutts, M.J., et al., *CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels*. Science, 1995. **269**(5225): p. 847-50.
10. Knowles, M.R., et al., *Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium*. Science, 1983. **221**(4615): p. 1067-70.
11. O'Riordan, C.R., et al., *Purification and characterization of recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from Chinese hamster ovary and insect cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 17033-43.
12. Donaldson, S.H., et al., *Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline*. N Engl J Med, 2006. **354**(3): p. 241-50.
13. Elkins, M.R., et al., *A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(3): p. 229-40.
14. Smith, J.J., et al., *Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid*. Cell, 1996. **85**(2): p. 229-36.

15. Goldman, M.J., et al., *Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis*. Cell, 1997. **88**(4): p. 553-60.
16. Tarran, R., et al., *The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches*. Mol Cell, 2001. **8**(1): p. 149-58.
17. Smith, R.S. and B.H. Iglewski, *P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(1): p. 56-60.
18. Parsek, M.R. and E.P. Greenberg, *Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8789-93.
19. Fuqua, C. and E.P. Greenberg, *Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(2): p. 183-9.
20. Van Delden, C. and B.H. Iglewski, *Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections*. Emerg Infect Dis, 1998. **4**(4): p. 551-60.
21. Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold, and A.N. Hamood, *The role of quorum sensing in the in vivo virulence of Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect, 2000. **2**(14): p. 1721-31.
22. Worlitzsch, D., et al., *Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 317-25.
23. Devor, D.C., R.J. Bridges, and J.M. Pilewski, *Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(2): p. C461-79.
24. Willumsen, N.J. and R.C. Boucher, *Sodium transport and intracellular sodium activity in cultured human nasal epithelium*. Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 1): p. C319-31.
25. Clarke, L.L. and R.C. Boucher, *Chloride secretory response to extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia*. Am J Physiol, 1992. **263**(2 Pt 1): p. C348-56.
26. Jentsch, T.J. and W. Gunther, *Chloride channels: an emerging molecular picture*. Bioessays, 1997. **19**(2): p. 117-26.
27. Matsuyama, N., et al., *Non-standard biological activities of lipopolysaccharide from Helicobacter pylori*. J Med Microbiol, 2001. **50**(10): p. 865-9.
28. Ibanez-Tallon, I., S. Gorokhova, and N. Heintz, *Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(6): p. 715-21.

29. Noone, P.G., et al., *Effect of aerosolized uridine-5'-triphosphate on airway clearance with cough in patients with primary ciliary dyskinesia*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(1): p. 144-9.
30. Knowles, M., J. Gatzky, and R. Boucher, *Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis*. N Engl J Med, 1981. **305**(25): p. 1489-95.
31. Knowles, M., et al., *Bioelectric properties and ion flow across excised human bronchi*. J Appl Physiol, 1984. **56**(4): p. 868-77.
32. Pesci, E.C., et al., *Regulation of las and rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1997. **179**(10): p. 3127-32.
33. Zulianello, L., et al., *Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3134-47.
34. Willumsen, N.J., C.W. Davis, and R.C. Boucher, *Intracellular Cl<sup>-</sup> activity and cellular Cl<sup>-</sup> pathways in cultured human airway epithelium*. Am J Physiol, 1989. **256**(5 Pt 1): p. C1033-44.
35. Schultz, B.D., et al., *Pharmacology of CFTR chloride channel activity*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S109-44.
36. Kohler, T., et al., *Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili*. J Bacteriol, 2000. **182**(21): p. 5990-6.
37. Kunzelmann, K., et al., *Flagellin of Pseudomonas aeruginosa inhibits Na<sup>+</sup> transport in airway epithelia*. Faseb J, 2006. **20**(3): p. 545-6.
38. Wolfgang, M.C., et al., *Pseudomonas aeruginosa regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6664-8.
39. Sirard, J.-C., *Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune response in mucosa*. TRENDS in microbiology, 2004. **12**(11): p. 509-517.