

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**  
**U.F.R. DE MEDECINE**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS  
CHAMPAGNE-ARDENNE**

**Discipline : Biologie Cellulaire**

Présenté par

**Delphine GRAS**

**ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES  
EPITHELIALES RESPIRATOIRES HUMAINES NORMALES ET  
MUCOVISCIDOSIQUES ET *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Thèse dirigée par : Mme le Docteur **Edith PUCHELLE**

Soutenue publiquement le 23 Novembre 2006

Composition du jury :

Mme le Professeur **Maria Cristina Plotkowski** (Rio de Janeiro, Brésil)  
M. le Docteur **Marc Merten** (Vandoeuvre-les-Nancy, France)  
Mme le Professeur **Sophie Gangloff** (Reims, France)  
M. le Docteur **Jean-Marie Zahm** (Reims, France)  
Mme le Docteur **Edith Puchelle** (Reims, France)

Rapporteur - Présidente  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de Thèse

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité UMRS INSERM 514 à Reims, dirigée par le Docteur Edith Puchelle, directeur de recherche INSERM. Je tiens à vous remercier sincèrement pour votre accueil au sein de votre laboratoire et pour avoir dirigé cette thèse. Je vous remercie pour votre rigueur et votre dynamisme scientifique ainsi que votre grande disponibilité et votre engagement dans cette thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie le Professeur Maria Cristina Plotkowski, du département de Microbiologie, Immunologie et Parasitologie de l'Université d'état de Rio de Janeiro, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit de thèse et de faire tout ce trajet depuis le Brésil pour assister à ma soutenance. Merci aussi pour le travail de collaboration autour de l'article « Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus* ».

Je remercie le Docteur Marc Merten, Maitre de Conférence Universitaire, chercheur au sein de l'Unité INSERM U724 à Vandoeuvre-les-Nancy, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit de thèse et aussi pour nous avoir fourni les lignées cellulaires MM-39 et KM-4.

Je remercie le Professeur Sophie Gangloff, du laboratoire d'Immunologie Bactériologie de la faculté de pharmacie de Reims, pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Il est loin le temps de ma soutenance de DEA...

Je remercie également le Docteur Jean Marie Zahm, ingénieur de recherche INSERM au sein de l'UMRS INSERM 514 à Reims, pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et pour les nombreuses fois où vous m'avez apporté votre aide, que ce soit en vidéomicroscopie, en statistiques, en informatique et aussi pour avoir réussi l'exploit de me trouver un verre de jus d'orange dans une maison de champagne à la soirée des J2R de 2005 !

Je tiens également à remercier le Docteur Pascal Barbry, Directeur de recherche CNRS, et le Docteur Chimène Moreilhon de l'Institut de pharmacologie Moléculaire et Cellulaire UMR 6097, CNRS de l'Université de Nice-Sophia Antipolis à Valbonne pour leur collaboration sur le travail des études transcriptionnelles sur puces à ADN. J'ai conscience que j'ai encore beaucoup de choses à apprendre...

Je remercie le Docteur Odile Bajolet, Maitre de Conférence Universitaire Praticien Hospitalier au Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Maison Blanche à Reims pour

son aide et ses encouragements lors de la correction de ce manuscrit de thèse et pour ses conseils précieux sur la culture bactérienne.

Je tiens également à remercier le Docteur Michel Abely pour son aide et ses conseils de « dernière minute » concernant la partie « clinique » de la mucoviscidose autour de ce manuscrit.

Je remercie vivement l'Association Vaincre la Mucoviscidose pour son soutien financier durant ces trois années de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité UMRS INSERM 514 de Reims pour leur accueil et leur bonne humeur générale. Les croissants du café les jours d'anniversaire vont me manquer.

Béa, non je n'ai pas oublié le temps que tu as passé avec moi sur les western blot alpha-toxine au début de ma thèse, merci pour ça. Jean-Marie Tournier merci pour tes conseils, tu as toujours été là pour quelle que question que ce soit ! Merci à Noël pour son aide sur mon dernier papier et pour sa grande gentillesse.

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>1</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>12</b>
<b>PRESENTATION GENERALE DES ETUDE.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 1 : L'APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN.....</b>	<b>15</b>
I. Structure générale .....	15
II. Structure de l'épithélium respiratoire .....	16
II.1. <i>L'épithélium respiratoire bronchique.....</i>	17
II.1.1. L'épithélium respiratoire de surface bronchique .....	17
II.1.1.1. Les cellules ciliées .....	17
II.1.1.2. Les cellules sécrétoires ou caliciformes .....	18
II.1.1.3. Les cellules intermédiaires.....	18
II.1.1.4. Les cellules basales.....	19
II.1.2. L'épithélium respiratoire bronchique glandulaire.....	19
II.1.2.1. Les cellules muqueuses.....	20
II.1.2.2. Les cellules séreuses.....	20
II.1.2.3. Les cellules myoépithéliales .....	20
II.1.3. L'épithélium respiratoire bronchiolaire.....	20
II.1.3.1. Les cellules de Clara.....	20
II.1.3.2. Les cellules neuroendocrines .....	21
II.1.4. L'épithélium respiratoire alvéolaire .....	21
<b>CHAPITRE 2 : DEFENSES INNEES.....</b>	<b>22</b>
I. Défenses mécaniques.....	22
I.1. <i>La clairance mucociliaire.....</i>	22

I.2. <i>Les molécules du mucus impliquées dans la défense innée constitutive de l'épithélium respiratoire</i> .....	23
I.2.1. <i>Les mucines</i> .....	23
I.2.2. <i>Le lysozyme</i> .....	24
I.2.3. <i>Le SLPI</i> .....	24
I.2.4. <i>La transferrine</i> .....	25
I.2.5. <i>Les peptides de défense</i> .....	25
<b>II.    Intégrité de l'épithélium respiratoire.....</b>	<b>26</b>
II.1. <i>Les jonctions serrées</i> .....	27
II.2. <i>Les jonctions intermédiaires</i> .....	28
II.3. <i>Les desmosomes</i> .....	28
II.4. <i>Les jonctions communicantes</i> .....	29
II.5. <i>Les hémidesmosomes</i> .....	29
<b>CHAPITRE 3 : LA MUCOVISCIDOSE.....</b>	<b>30</b>
<b>I.    Historique.....</b>	<b>31</b>
<b>II.   Structure et fonctions de la protéine CFTR.....</b>	<b>31</b>
II.1. <i>Structure et fonctions</i> .....	31
II.2. <i>Mutations du gène CFTR</i> .....	33
<b>III.   Pathologie respiratoire.....</b>	<b>35</b>
III.1. <i>Modifications du liquide de surface</i>	35
III.2. <i>Infections dans la mucoviscidose</i> .....	36
III.3. <i>Inflammation dans la mucoviscidose</i> .....	40
<b>CHAPITRE 4 : STAPHYLOCOCCUS AUREUS .....</b>	<b>40</b>
<b>I.    Description générale .....</b>	<b>42</b>
I.1. <i>Caractères phénotypiques et culturaux</i> .....	42
I.2. <i>Caractères structuraux</i> .....	42

<i>I.3. Habitat.....</i>	<b>44</b>
<b>II. Les facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>44</b>
<i>II.1. Les protéines de surface ou facteurs d'adhérence.....</i>	<b>45</b>
II.1.1. La protéine A (Spa) .....	47
II.1.2. La protéine de liaison au collagène (Cna) .....	47
II.1.3. Les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPA et FnBPB) .....	47
II.1.4. La protéine de liaison au fibrinogène (Clf).....	47
II.1.5. La protéine de liaison à l'élastine (EbpS).....	48
<i>II.2. Les facteurs de virulence solubles .....</i>	<b>48</b>
II.2.1. Toxines à activité membranaire .....	48
II.2.1.1. L'alpha-toxine .....	48
II.2.1.2. La bêta-toxine.....	50
II.2.1.3. La gamma-toxine et la leucocidine de Panton-Valentine .....	50
II.2.1.4. La delta-toxine.....	51
II.2.2. Les entérotoxines et TSST-1.....	51
II.2.3. Autres facteurs de virulence .....	51
<i>II.3. Régulation génique des facteurs de virulence .....</i>	<b>52</b>
<i>II.4. Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i> .....</i>	<b>54</b>
<i>II.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques.....</i>	<b>55</b>

## **CHAPITRE 5 : RECEPTEURS DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE AUX ADHESINES DE *S. AUREUS* .....54**

<b>I. Les Toll Like Récepteurs (TLR) et leurs voies de signalisation.....</b>	<b>57</b>
<i>I.1. Les Toll Like Récepteurs impliqués dans la reconnaissance de <i>S. aureus</i> .....</i>	<b>58</b>
<i>I.2. Les voies de signalisation activées par TLR2.....</i>	<b>58</b>
<b>II. TNF- <math>\alpha</math> receptor 1 (TNFR1) .....</b>	<b>61</b>
<b>III. Les protéines Nod.....</b>	<b>61</b>
<b>IV. Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane.....</b>	<b>62</b>

<b>CHAPITRE 6 : REONSE DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE A L'INFECTION BACTERIENNE.....</b>	<b>62</b>
<b>I. L'inflammation .....</b>	<b>63</b>
<i>I.1. Les cytokines.....</i>	<i>63</i>
I.1.1. Les fonctions des cytokines .....	67
I.1.2. Les récepteurs des cytokines .....	68
<i>I.2. Les voies de transduction du signal.....</i>	<i>69</i>
I.2.1. NF- $\kappa$ B .....	69
I.2.2. Les MAPKs .....	72
I.2.3. JAK/STAT .....	74
<b>II. Modèles d'étude <i>in vivo</i> de la mucoviscidose .....</b>	<b>77</b>
<i>II.1. Modèles d'infections <i>in vivo</i> dans la mucoviscidose .....</i>	<i>77</i>
<i>II.2. Modèle <i>in vivo</i> de xénogreffe bronchique humanisée.....</i>	<i>79</i>
<i>II.3. Lésions et remodelage de l'épithélium respiratoire après infection bactérienne : étude dans les xénogreffes bronchiques humanisées.....</i>	<i>80</i>
<b>BUTS DES ETUDES.....</b>	<b>84</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>86</b>
ARTICLE 1: Dynamic interaction between airway epithelial cells and <i>Staphylococcus aureus</i> .....	86
ARTICLE 2: Live <i>Staphylococcus aureus</i> and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells.....	88
ARTICLE 3: Differential responses of normal and cystic fibrosis human airway cells to <i>Staphylococcus aureus</i> virulence factors.....	91
<b>DISCUSSION PERSPECTIVES.....</b>	<b>134</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>140</b>

## **LISTE DES PUBLICATIONS**

Differential responses of normal and cystic fibrosis human airway cells to *Staphylococcus aureus* virulence factors

**Gras D**, Moreilhon C, Zahm JM, Puchelle E, Barbry P.

En cours de soumission

Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells.

Moreilhon C, **Gras D**, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, Magnone V, Merten M, Groux H, Puchelle E, Barbry P.

Physiol Genomics. 2005 Feb 10; 20(3):244-55.

Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*.

da Silva MC, Zahm JM, **Gras D**, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, Milliot M, de Assis MC, Hologne C, Bonnet N, Merten M, Plotkowski MC, Puchelle E.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Sep; 287(3):L543-51.

## **LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHE**

### **2006:**

Human airway epithelial cell response to *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors preceded or not by *Staphylococcus aureus*.

**Gras D**, Zahm JM, Bajolet O, Abely M, Puchelle E.

29<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference 2004, 2-6 septembre 2006, Munich, Allemagne

Réponse des cellules épithéliales respiratoires mucoviscidosiques aux facteurs de virulence solubles de *Pseudomonas aeruginosa* précédés ou non de *Staphylococcus aureus*.

**Gras D**, Zahm JM, Bajolet O, Puchelle E.

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53, 13 juin 2006, Reims

Priming effect of *Staphylococcus aureus* virulence factors on *Pseudomonas aeruginosa*-induced inflammation and injury of CF human airway epithelial cells

**Gras D**, Zahm JM, Bajolet O, Abely M, Puchelle E.

Euroconférences de l’Institut Pasteur: Infections et Maladies Pulmonaires, 8-9 juin 2006, Paris

**2004 :**

Réponse des cellules épithéliales respiratoires à l’infection par *Staphylococcus aureus*.

**Gras D**, Da Silva M, Zahm JM, Milliot M, Maouche K, Merten M, Bajolet O, Plotkowski MC, Puchelle E.

5<sup>ème</sup> colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, 13 mai 2004, Paris

Time and concentration-dependent effect of *Staphylococcus aureus* on airway epithelial cells

Gras D, Da Silva M, Milliot M, Zahm JM, Bajolet O, Plotkowski MC, Puchelle E.

18<sup>th</sup> annual North American Cystic Fibrosis Conference, 14-17 octobre 2004, St Louis, USA

*Staphylococcus aureus* and airway epithelial cell interaction

**Gras D**, Da Silva M, Milliot M, Zahm JM, Bajolet O, Plotkowski MC, Puchelle E.

European Respiratory Search annual congress, 4-8 septembre 2004, Glasgow, Ecosse

Time-dependent response of airway epithelial cells to *Staphylococcus aureus*

**Gras D**, Da Silva M, Milliot M, Zahm JM, Bajolet O, Plotkowski MC, Puchelle E.

27<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference 2004, 13–17 juin 2004, Birmingham, Royaume uni

**LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES**

**2006 :**

Réponse des cellules épithéliales respiratoires mucoviscidosiques aux facteurs de virulence solubles de *Pseudomonas aeruginosa* précédés ou non de *Staphylococcus aureus*.

**Gras D**, Zahm JM, Bajolet O, Abely M, Puchelle E.

7<sup>ème</sup> colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, 06 avril 2006, Paris

**2004 :**

Réponse des cellules épithéliales respiratoires à l'infection par *Staphylococcus aureus*

**Gras D**, Da Silva M, Milliot M, Zahm JM, Bajolet O, Plotkowski MC, Puchelle E.

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53, 28 juin 2004, Reims

Time-dependent response of airway epithelial cells to *Staphylococcus aureus*

**Gras D**, Da Silva M, Milliot M, Zahm JM, Bajolet O, Plotkowski MC, Puchelle E.

27<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference 2004, 13–17 juin 2004, Birmingham, Royaume uni

ABC	ATP Binding Cassette
ACP	Accessory Protein
ADN	Acide Désoxiribonucléique
aG <sub>M1</sub>	Asialo Ganglioside M1
Agr	accessory gene regulator
AM	Macrophage alvéolaire
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
APRE	Elément de Réponse de la Phase Aigüe
APRF	Facteur de Réponse de la Phase Aigüe
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ASK	Apoptosis Stimulating Kinase
ATP	Adénosine Triphosphate
CaCC	Canal Cl <sup>-</sup> "alternatif" activé par le Ca <sup>+</sup>
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CFU	Colony Forming Unit
COX-2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENaC	Canal Na <sup>+</sup> Epithélial
ERKs	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FGF	Fibroblast Growth Factor
FV	Facteurs de Virulence
g	gramme
GAS	Gamma Activated Site
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPCR	G Proteins Coupled Receptors
H	Heure
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
IκB	Inhibitor protein of NF-κB
IFN-γ	Interferon-γ
IKK	IγB Kinase

IL	Interleukine
IL-1R	IL-1 Receptor
IRAK	IL-1R Associated Kinase
JAK	Janus Kinase proteins
JNK/SAPK	<i>c-jun</i> terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase
LB	Lame Basale
LMWG	Low Molecular Weight GTP-binding
LPS	Lipopolysaccharide
LPV	Leucocidine de Panton-Valentine
LRR	Leucin-Rich Repeat
LTA	Lipoteichoïc Acidé
LTB4	Leukotriène B4
MAPKKKKs	MAPKKK Kinases
MAPKKKs	MAPKK Kinases
MAPKKs	MAPK Kinases
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
MDP	Muramyl Dipeptide
MDR	Multi Drug Resistance protein
MEKK	MAPK/ERK Kinases
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MIP	Protéine Inflammatoire des Macrophages
mL	millilitre
MLK	Mixed Lineage Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinases
MRP	Multi drug Resistance associated Proteins
MSCRAMM	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MUC	Mucine
MyD88	Myeloïde Differentiation protein
NBD	Nucleotide Binding Domain
NF-κB	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NLS	Nuclear Localisation Sequence
nm	nanomètre
Nod	Nucleotide-binding oligomerization domain protein

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PDZ	PSD-95/SAP-90, Discs-large, ZO-1 homologous domain
PGE2	Prostaglandine E 2
PGRPs	Peptidoglycan Recognition Proteins
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STATs
PKA	Proteïnes Kinases A
PMN	Polynucléaire neutrophile
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RAP	RNAIII-Activating Protein
RHR	Rel Homologous Region
RIP	Receptor-Interacting Protein
RTKs	Receptor Tyrosin Kinases
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sar	staphylococcal accessory gene regulator
SLPI	Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor
SOCS	Suppressors Of Cytokine Signaling
STAM	Signal Transducing Adaptor Molecule
STAT	Signal Transducer and Activators of Transcription
SvrA	Staphylococcal virulence regulator A
TAK1	Transforming growth factor Activated Kinase
TGF	Transforming Growth Factor
TIR	Toll/IL-1 Receptor
TIRAP	TIR Associated Protein
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Receptor
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain
TRAF	TNFR-Associated Factor
TRAP	Target of RNAIII-Activating Protein
ZO-1	<i>zonula occludens</i> 1

- Figure 1 : Structure générale de l'appareil respiratoire humain
- Figure 2 : Les différents types d'épithélia respiratoires de surface
- Figure 3 : Histologie de l'épithélium bronchique
- Figure 4 : Cellules ciliées observées en microscopie électronique à balayage
- Figure 5 : Histologie de l'épithélium glandulaire
- Figure 6 : Représentation schématique de la couche de mucus recouvrant l'épithélium respiratoire de surface
- Figure 7 : Organisation des complexes jonctionnels des cellules épithéliales
- Figure 8 : Espérance de vie des patients mucoviscidoses
- Figure 9 : Gène CFTR et protéine correspondante
- Figure 10 : Structure de CFTR
- Figure 11 : Différentes classes de mutation de CFTR
- Figure 12 : Modèles hypotonique et isotonique de transport d'ions
- Figure 13 : Prévalence bactérienne en fonction de l'âge
- Figure 14 : La diminution d' $O_2$  dans le mucus favorise l'infection à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose
- Figure 15 : Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie optique et en microscopie électronique
- Figure 16 : La paroi bactérienne de *S. aureus*
- Figure 17 : Invasion tissulaire par *S. aureus*
- Figure 18 : Structure et expression de facteurs de virulence de *S. aureus*
- Figure 19 : Organisation structurale des protéines de surface de *S. aureus*
- Figure 20 : Modèle en quatre étapes de formation des pores par l'alpha-toxine
- Figure 21 : Schéma du système *agr* et son interaction avec le système TRAP
- Figure 22 : Les différents composés de *S. aureus* et leurs récepteurs
- Figure 23 : Voies de signalisation des TLR
- Figure 24 : Voies de signalisation induites par *S. aureus* via TLR2
- Figure 25 : Régulation de la production des chimiokines par les cellules épithéliales respiratoires bronchiques
- Figure 26 : Les réponses cellulaires aux cytokines
- Figure 27 : Modèle d'activation de NF- $\kappa$ B
- Figure 28 : Voie de signalisation des MAPKs
- Figure 29 : Signalisation de l'IL-6 via la voie gp130/JAK/STAT
- Figure 30 : Les différents mécanismes d'inhibition de la voie JAK/STAT

Figure 31 : Régénération de l'épithélium respiratoire bronchique humain dans le modèle de xénogreffe

Figure 32 : Lésion de l'épithélium respiratoire provoquée par *S. aureus*

Figure 33 : Interaction de *S. aureus* avec l'épithélium respiratoire au cours des étapes de régénération

Tableau 1 : Principales protéines de surface de *S. aureus*

Tableau 2 : Principales protéines secrétées par *S. aureus*

Tableau 3 : Principales études d'infections respiratoires à *P. aeruginosa* et à *S. aureus* dans le modèle murin CF

La mucoviscidose (CF) est une maladie autosomale récessive qui est due à une mutation du gène qui code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Cette maladie est caractérisée par des atteintes digestives, des manifestations allergiques, cardiovasculaires et génitales, et par des infections respiratoires. Les manifestations respiratoires, caractérisées par une inflammation respiratoire chronique et des infections bactériennes représentent une des causes majeures de morbidité et de mortalité des patients CF.

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est un pathogène commensal de l'épithélium nasal mais c'est aussi un des premiers pathogènes à coloniser l'appareil respiratoire des patients mucoviscidosiques. Sa pathogénie est due en partie à ses protéines de surface qui vont lui permettre d'adhérer aux cellules épithéliales respiratoires et de coloniser l'hôte mais elle est également due à sa capacité à secréter de nombreux facteurs de virulence solubles. *S. aureus* précède généralement la colonisation chronique de l'épithélium respiratoire par *P. aeruginosa*.

Il existe un équilibre entre les mécanismes de défense de la cellule épithéliale respiratoire et les mécanismes lésionnels induits par une bactérie comme *S. aureus*. Cependant, le rôle spécifique de *S. aureus* dans la progression de la mucoviscidose a encore été très peu étudié.

Le but de ce travail était de comprendre et d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF ou CF et *S. aureus* vivant ou ses facteurs de virulence solubles.

Ce mémoire de thèse est articulé autour d'une introduction générale suivie de la présentation des résultats et d'une discussion générale et des perspectives.

L'introduction générale décrit l'appareil respiratoire humain, les défenses innées, la mucoviscidose, *Staphylococcus aureus*, les récepteurs de l'épithélium respiratoire aux adhésines bactériennes de *S. aureus* ainsi que les réponses de l'épithélium respiratoire à l'infection bactérienne.

Les résultats décrivent, dans un premier temps, l'interaction dynamique entre les cellules épithéliales respiratoires humaines et *S. aureus*. Nous avons plus particulièrement analysé l'effet du temps d'interaction et de la concentration bactérienne sur l'adhérence,

l'internalisation et les dommages cellulaires associés à *S. aureus* sur les cellules épithéliales respiratoires.

Nous avons, dans un deuxième temps, analysé les réponses transcriptionnelles des cellules épithéliales respiratoires humaines en interaction avec *S. aureus* vivant ou ses facteurs de virulence solubles. Cette étude a plus particulièrement analysé l'apparition des phénomènes d'altération de la perméabilité membranaire et d'apoptose ainsi que la régulation des gènes impliqués dans les phénomènes d'inflammation, d'apoptose et de transcription, ainsi que la régulation de la sécrétion de différentes cytokines.

Nous avons, dans un troisième temps, analysé les réponses transcriptionnelles des cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF ou CF en interaction avec les facteurs de virulence solubles de *S. aureus*. Cette étude a plus particulièrement analysé la régulation des gènes impliqués dans les phénomènes d'inflammation, d'apoptose et de transcription, ainsi que la régulation de la sécrétion de différentes cytokines.

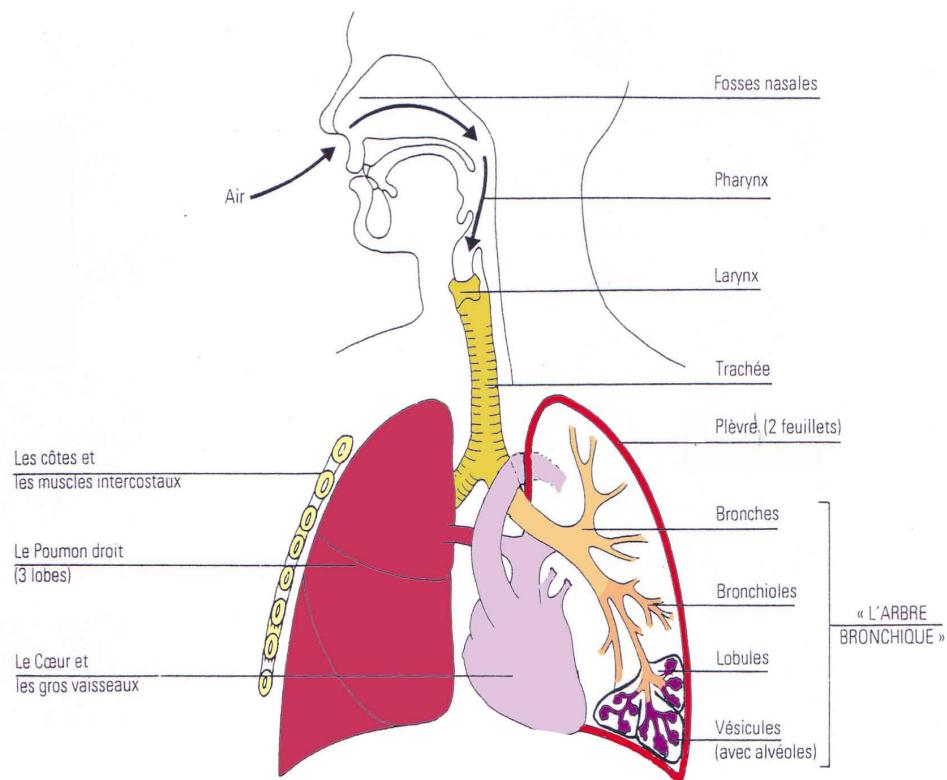
La discussion et les perspectives nous ont permis d'argumenter les résultats obtenus lors de cette thèse et de décrire les perspectives de ces travaux.

# CHAPITRE 1 : L'APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN

## I. Structure générale

Le poumon humain est un organe complexe dont la principale fonction est de conduire l'air extérieur jusqu'aux alvéoles pulmonaires et ainsi permettre les échanges gazeux entre l'air et le sang. L'appareil respiratoire se subdivise en trois parties : le rhino-larynx, l'arbre trachéo-bronchique allant de la trachée jusqu'aux bronchioles et une partie distale incluant les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (Figure 1). Les voies aériennes humaines sont extrêmement ramifiées. A partir de la trachée, l'arbre respiratoire se divise en branches de longueur et de diamètre inégaux.

Outre son rôle de conduction de l'air vers les poumons, l'arbre trachéo-bronchique développe d'autres fonctions, toutes liées à la décontamination de l'air intrapulmonaire inspiré et joue ainsi un rôle déterminant dans la défense de l'organisme vis-à-vis des bactéries, virus, particules toxiques et gaz inhalés.



**Figure 1 : Structure générale de l'appareil respiratoire humain**

*L'appareil respiratoire est composé successivement des fosses nasales, du pharynx, du larynx, de la trachée, des bronches, des bronchioles et des alvéoles.*

## II. Structure de l'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire humain est un épithélium cylindrique pseudo-stratifié, cilié et comprend des cellules caliciformes sécrétant du mucus. Au fur et à mesure que les bronches diminuent en taille, il existe une transition vers un épithélium cilié cylindrique simple puis cubique simple et une diminution du nombre de cellules caliciformes. L'épithélium respiratoire se divise en trois types : l'épithélium respiratoire bronchique, l'épithélium respiratoire bronchiolaire et l'épithélium respiratoire alvéolaire (figure 2).

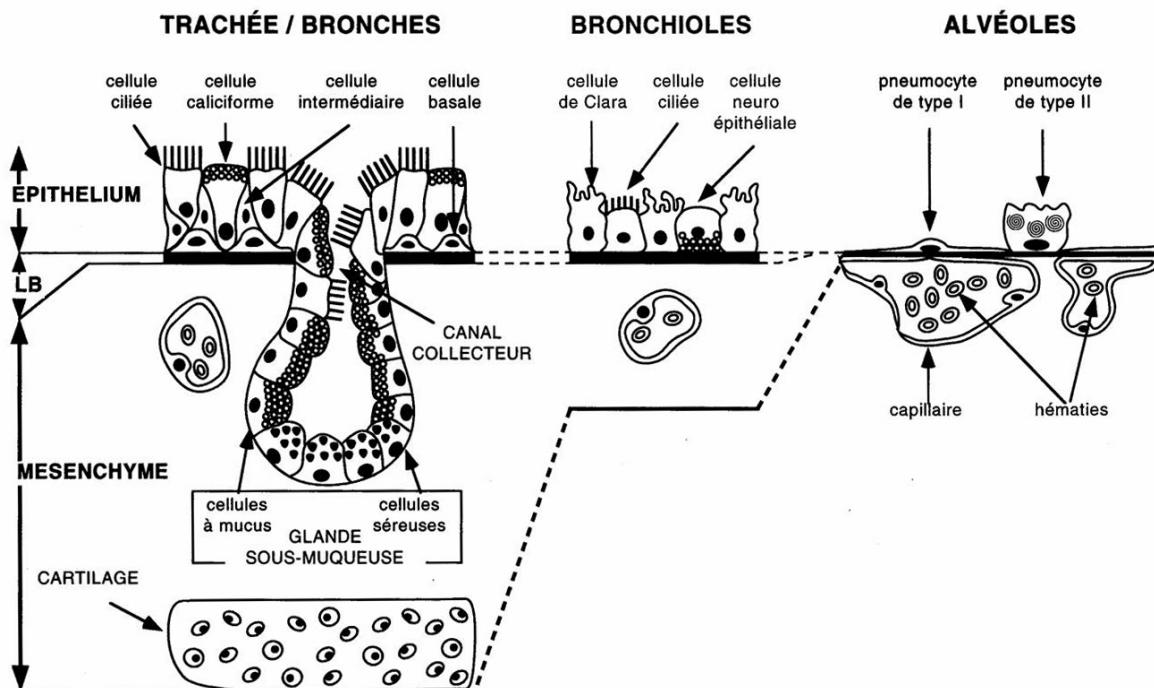


Figure 2 : Les différents types d'épithélia respiratoires de surface

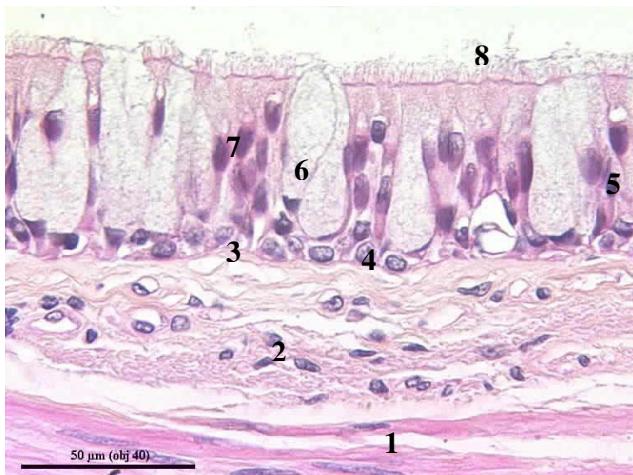
L'épithélium respiratoire est identique dans la trachée et les bronches. Il est pseudostratifié au niveau de l'épithélium respiratoire de surface qui est composé de quatre types cellulaires (cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires et basales). L'épithélium glandulaire est composé de trois types cellulaires (les cellules à mucus, séreuses et myoépithéliales). L'épithélium respiratoire des bronchioles est de type monostratifié et composé de trois types cellulaires (cellules ciliées, neuroépithéliales et de Clara). L'épithélium respiratoire des alvéoles est de type monostratifié et composé de deux types cellulaires (pneumocytes de type I et II).

## **II.1. L'épithélium respiratoire bronchique**

L'épithélium respiratoire bronchique se divise en deux types : l'épithélium respiratoire de surface et l'épithélium respiratoire glandulaire, qui sont séparés par la lame basale (LB).

### **II.1.1. L'épithélium respiratoire de surface bronchique**

L'épithélium respiratoire de surface est composé de quatre types cellulaires différents : les cellules ciliées, les cellules caliciformes muqueuses, les cellules intermédiaires et les cellules basales (figure 3).

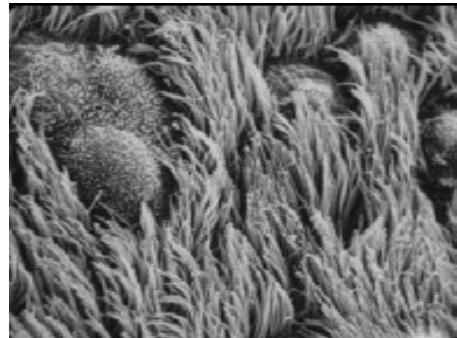


1. cellules musculaires lisses
2. tissu conjonctif
3. lame basale
4. cellules basales
5. cellules intermédiaires
6. cellules caliciformes
7. cellules ciliées
8. cils

**Figure 3 : Histologie de l'épithélium bronchique**

#### **II.1.1.1. Les cellules ciliées**

Les cellules ciliées sont ancrées à la lame basale et s'étendent jusqu'à la lumière trachéo-bronchique. Leur rôle est d'assurer la clairance mucociliaire qui permet d'éliminer les aéro-contaminants et les micro-organismes qui pénètrent dans les voies respiratoires (figure 4). Cette fonction est assurée par les cils situés au pôle apical des cellules (200 à 300 par cellule). La longueur des cils varie selon la localisation des cellules dans l'appareil respiratoire et peut atteindre 6 à 7 µm. Les cils sont composés d'une paire centrale de microtubules entourés par neuf doublets. Les cellules ciliées permettent les échanges d'ions entre le fluide extracellulaire et le cytoplasme intracellulaire. Les cellules ciliées sont des cellules matures différenciées qui ont pour origine les cellules basales ou sécrétoires. Elles sont particulièrement sensibles aux lésions provoquées par les irritants inhalés.



**Figure 4 : Cellules ciliées observées en microscopie électronique à balayage**

#### *II.1.1.2. Les cellules sécrétaires ou caliciformes*

Ces cellules sont caractérisées par la présence de granules clairs aux électrons en microscopie électronique à transmission. Ces granules sécrétaires mesurent 800 nm de diamètre en moyenne et contiennent généralement des mucines qui sont acides, en raison de la présence de sulfates ou d'acide sialique. Ainsi, les granules contiennent en majorité des sulfomucines ou des sialomucines selon la localisation des cellules dans l'appareil respiratoire. La production et la sécrétion régulée de mucus par ces cellules à la surface de l'épithélium est importante pour le bon fonctionnement de l'appareil mucociliaire qui piège les particules inhalées potentiellement délétères, pour ensuite les évacuer. Le nombre de ces cellules augmente dans certaines pathologies respiratoires telles que les bronchites chroniques et la mucoviscidose. Au niveau des bronchioles respiratoires et terminales de l'homme, les cellules caliciformes sont remplacées par des cellules sécrétaires aux granules denses aux électrons, appelées cellules de Clara.

#### *II.1.1.3. Les cellules intermédiaires*

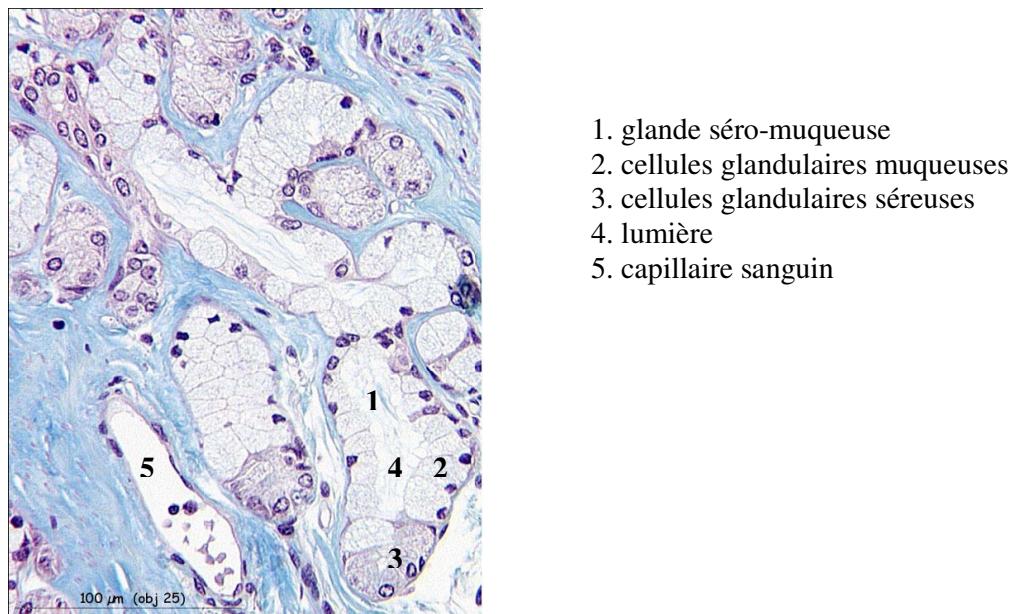
Les cellules intermédiaires sont ancrées à la lame basale, de forme allongée, elles n'atteignent pas la lumière des voies respiratoires. Selon Jeffery et Li, ces cellules seraient des cellules issues de la division des cellules caliciformes au cours d'un processus de stratification (Jeffery *et al.*, 1997).

#### *II.1.1.4. Les cellules basales*

Les cellules basales sont très petites et aplatis. Attachées à la membrane basale elles n'atteignent pas la lumière trachéo-bronchique. Les cellules basales ont un faible rapport cytoplasme/noyau et le cytoplasme est avant tout rempli de filaments intermédiaires. De nombreux desmosomes attachent les cellules basales aux cellules épithéliales qui les entourent. Le rôle principal des cellules basales est d'ancrer les cellules ciliées à la membrane basale mais elles sont également impliquées dans la régénération des autres types cellulaires de l'épithélium respiratoire de surface (Ayers *et al.*, 1988).

#### II.1.2. L'épithélium respiratoire bronchique glandulaire

L'épithélium respiratoire glandulaire, présent dans la sous-muqueuse bronchique, est situé entre l'épithélium de surface et le cartilage. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche contenant les glandes sécrétaires mixtes, elles même constituées de trois types cellulaires : les cellules muqueuses, les cellules séreuses et les cellules myoépithéliales (figure 5).



**Figure 5 : Histologie de l'épithélium glandulaire**

#### *II.1.2.1. Les cellules muqueuses*

Les cellules muqueuses sont caractérisées par un cytoplasme dense aux électrons et par des granules sécrétaires apicaux petits et nombreux qui sont électron-clairs en microscopie électronique et riches en mucines.

#### *II.1.2.2. Les cellules séreuses*

Les cellules séreuses sont caractérisées par des granules denses aux électrons de 600 nm de diamètre environ. Ces granules sécrétaires sont situés dans la partie apicale du cytoplasme et contiennent des mucines neutres. Ce sont ces cellules qui produisent la majeure partie du liquide de sécrétion glandulaire ainsi que des protéines et des peptides à activité antibactérienne tel que le lysozyme. Le lysozyme est par ailleurs considéré comme étant un marqueur spécifique de l'activité sécrétoire des cellules glandulaires séreuses (Franken *et al.*, 1989).

#### *II.1.2.3. Les cellules myoépithéliales*

Les cellules myoépithéliales ont des propriétés contractiles qui facilitent la libération des granules sécrétaires des cellules glandulaires. En effet, ces cellules allongées sont en contact avec la lame basale mais aussi en contact direct avec les cellules sécrétaires glandulaires trachéobronchiques.

### **II.1.3. L'épithélium respiratoire bronchiolaire**

L'épithélium respiratoire bronchiolaire est composé de trois types cellulaires différents qui sont les cellules ciliées, les cellules de Clara et les cellules neuroendocrines. Les cellules ciliées de l'épithélium bronchiolaire ont la même morphologie et les mêmes propriétés que dans l'épithélium bronchique (voir paragraphe 1.1.1.).

#### *II.1.3.1. Les cellules de Clara*

Les cellules de Clara ont des granules caractéristiques qui sont denses aux électrons, de forme ovoïde et situés dans la partie apicale du cytoplasme. La majeure partie du cytoplasme est

remplie par des organelles dont le noyau qui est le composé le plus volumineux. Leur fonction principale est la production et la sécrétion de nombreuses molécules telles que des glycoprotéines et lipides (Widdicombe *et al.*, 1982). Les cellules de Clara sont également des progénitrices des cellules ciliées et d'autres cellules de Clara dans les bronchioles (Plopper et Dungworth, 1987).

#### *II.1.3.2. Les cellules neuroendocrines*

Les cellules neuroendocrines ont de nombreux granules qui sont de forme ronde à ovoïde. Elles sont situées au niveau de la lame basale mais elles ont des prolongements cytoplasmiques qui atteignent la lumière des voies respiratoires. Ces cellules peuvent être isolées les unes des autres ou être sous forme de « cluster », elles sont alors appelées corps neuroendothélial. Ces cellules possèdent différentes fonctions physiologiques dont une fonction de chemorécepteur (Lauweryns *et al.*, 1983).

#### II.1.4. L'épithélium respiratoire alvéolaire

L'épithélium respiratoire alvéolaire est monostratifié et composé de deux types cellulaires différents qui sont les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. Les pneumocytes de type I sont des cellules aplatis impliquées dans les échanges gazeux. Les pneumocytes de type II sont des cellules qui prolifèrent afin de re-épithélialiser les surfaces alvéolaires dissociées puis qui sont transformées en pneumocytes de type I (Fuchs *et al.*, 2003). Les pneumocytes de type II sont également impliqués dans les mécanismes de défense de l'hôte *via* la production du surfactant pulmonaire (Rooney *et al.*, 1994).

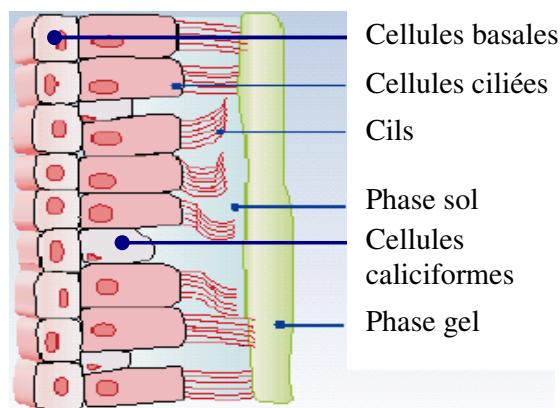
## CHAPITRE 2 : DEFENSES INNEES

### I. Défenses mécaniques

#### I.I. La clairance mucociliaire

A l'état normal chez l'adulte, un film de mucus dont l'épaisseur varie entre 0,5 et 2 µm recouvre l'épithélium respiratoire de surface depuis les voies aériennes supérieures jusqu'aux bronchioles terminales. Ce film constitue, à la surface de la muqueuse respiratoire, un véritable tapis roulant piégeant en permanence les particules et bactéries. Ces particules seront alors entraînées, grâce aux mouvements ciliaires engendrés par les cellules ciliées de l'épithélium pseudostratifié de surface, des petites bronchioles jusqu'à la trachée et le pharynx où elles seront normalement dégluties (Rayner, 1997).

Le mucus est constitué de deux phases : une phase aqueuse, dite périciliaire ou phase « sol », de faible viscosité, proche de celle de l'eau, et une phase superficielle, ou phase « gel » caractérisée par une viscosité et une élasticité élevée (figure 6). Au cours du battement ciliaire, le cil pénètre avec une très grande vitesse (800 µm/sec) à l'intérieur de la phase gel du mucus. C'est la phase active pendant laquelle le cil se déploie et entre en contact avec le mucus. La seconde phase est une phase passive pendant laquelle le cil se replie dans la phase sol selon un mouvement de rotation (Sleigh *et al.*, 1988). Les mouvements des cils, la sécrétion des mucines et des autres macromolécules, et la sécrétion de fluide sont trois facteurs qui conditionnent l'efficacité de la clairance mucociliaire.



**Figure 6 : Représentation schématique de la couche de mucus recouvrant l'épithélium respiratoire de surface**

*Le mucus est constitué de deux phases : une phase aqueuse, la phase sol (en bleu-vert) dans laquelle battent les cils des cellules ciliées et une phase visqueuse et élastique, la phase gel (en vert) qui piège les particules toxiques et microorganismes pathogènes.*

## **I.2. Les molécules du mucus impliquées dans la défense innée constitutive de l'épithélium respiratoire**

Si la clairance mucociliaire élimine la majorité des pathogènes et particules inhalées par une action mécanique, le mucus comporte de nombreuses molécules qui participent à la protection des voies respiratoires *via* la neutralisation des microorganismes.

### **I.2.1. Les mucines**

La famille des mucines se divise en deux classes, les mucines sécrétées et les mucines membranaires. Les mucines membranaires sont ancrées à la membrane cytoplasmique et se projettent loin à l'extérieur de la cellule. Les mucines sécrétées par les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et les cellules muqueuses des glandes sous-muqueuses sont le constituant macromoléculaire majoritaire du mucus.

Ce sont des macromolécules hautement glycosylées ( $\geq 50\%$  hydrates de carbone, poids/poids) et viscoélastiques qui sont difficiles à isoler et purifier (Rose *et al.*, 1989). Les mucines sont caractérisées par de nombreuses répétitions de séquences contenant des prolines et un taux élevé de résidus sérine et/ou thréonine. Les mucines de l'appareil respiratoire se présentent typiquement comme des structures filamenteuses et flexibles qui, une fois agrégées, forment un réseau entrelacé caractéristique. Chaque mucine a une taille, une forme et une masse différente, ce qui va contribuer aux propriétés biophysiques et biologiques du mucus qui sera alors plus ou moins visqueux.

Dans l'appareil respiratoire humain inférieur, l'expression d'au moins 12 gènes de mucines a été observée en ARNm dans les tissus de patients sains : *MUC1* et *MUC4*, qui sont les gènes des mucines membranaires, *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC7*, *MUC8* et *MUC19* qui sont les gènes des mucines sécrétoires et *MUC11*, *MUC13*, *MUC15*, et *MUC20* qui sont les gènes de mucines dont la localisation n'est pas encore connue (Voynow *et al.*, 2006). *MUC5AC* est la mucine prédominante normalement exprimée dans les cellules caliciformes et *MUC5B* et *MUC19* sont typiquement restreintes aux cellules glandulaires. L'expression des produits du gène *MUC5B* dans les cellules caliciformes humaines adultes de l'épithélium de l'appareil respiratoire inférieur est atypique et pourrait être un marqueur de pathologie.

Des toxines environnementales, allergènes et pathogènes infectieux activent les médiateurs de la réponse inflammatoire/immunitaire qui vont initier l'hypersécrétion des mucines. Une cascade de sécrétion, résultant en une libération rapide (quelques minutes) de mucines des

granules sécrétoires des cellules caliciformes de l'épithélium de surface et/ou des cellules muqueuses des glandes, est alors activée. Ces mucines hypersécrétées, ainsi que les mucines membranaires, contribuent au système de défense muqueux inné en protégeant l'épithélium respiratoire. Les particules sont piégées par le gel viscoélastique de mucus ou peuvent se lier à des récepteurs des cellules immunitaires. La régulation des gènes des mucines activés par les médiateurs des réponses inflammatoires/immunes, avec l'hypersécrétion de mucus, caractérisent différentes maladies respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose, l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (Rubin *et al.*, 1990). Les mucines des patients mucoviscidosiques infectés par différentes bactéries possèdent un taux élevé d'acide sialique or des études sur cellules épithéliales respiratoires glandulaires humaines ont montré qu'il existe une régulation de la sialylation par la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (Delmotte *et al.*, 2001).

### I.2.2. Le lysozyme

Le lysozyme humain présent au niveau de l'appareil respiratoire est une enzyme antibactérienne sécrétée en grandes quantités (environ 10 à 20 mg de lysozyme sont sécrétés quotidiennement) essentiellement par les glandes de la sous-muqueuse de la trachée, l'épithélium de surface et les macrophages alvéolaires pulmonaires (Konstan *et al.*, 1982). Le lysozyme est considéré comme étant un marqueur des cellules séreuses des glandes sous-muqueuses respiratoires. C'est une protéine basique de 15 kDa capable de dégrader les peptidoglycanes des parois bactériennes.

### I.2.3. Le SLPI

Le « Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor » (SLPI), également dénommé antileucoprotéase ou inhibiteur bronchique, est un inhibiteur de sérines-protéases produit localement dans l'appareil respiratoire par les cellules glandulaires de la sous-muqueuse bronchique et par les cellules épithéliales non-ciliées. Le gène du SLPI de 2,65 kb peut être modulé à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel (Kikuchi *et al.*, 1997). C'est une protéine cationique non glycosylée de 12 kDa, constituée de 107 acides aminés, qui comprend deux domaines. Le SLPI contient seize résidus cystéines qui forment huit ponts disulfures. Sa fonction principale est d'inhiber l'élastase neutrophile. Le SLPI est sécrété en grandes quantités dans le liquide épithélial de surface mais principalement sous forme inactive,

incapable de dégrader l'élastase du neutrophile (Vogelmeier *et al.*, 1991). Le SLPI possède également une activité antibactérienne à la fois dirigée contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Cette activité antibactérienne est localisée dans le premier domaine terminal NH<sub>2</sub> du SLPI alors que l'activité d'inhibition de l'élastase est localisée dans le second domaine terminal COOH (Hiemstra *et al.*, 1996). La production de SLPI par les macrophages peut être augmentée par le lipopolysaccharide (LPS) (Jin *et al.*, 1998) et l'addition de SLPI recombinant aux monocytes humains ainsi que la transfection de macrophages par le SLPI, diminuent la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tel que le TNF due à une stimulation par le LPS (Zhang *et al.*, 1997). Ces résultats confirment l'activité antimicrobienne du SLPI mais les mécanismes d'action ne sont toujours pas connus.

#### I.2.4. La transferrine

La transferrine, aussi appelée lactoferrine, est une glycoprotéine cationique de 80 kDa capable de se lier au fer. Elle est à la fois anti-microbienne (bactéricide et bactériostatique) et anti-inflammatoire. La transferrine présente une activité bactéricide directe en altérant la perméabilité membranaire des bactéries à Gram négatif en se liant à la membrane externe et une activité bactéricide indirecte par sa capacité à lier le fer, facteur de croissance essentiel pour les microorganismes. Les propriétés bactéricides directe de la transferrine ont été prouvées sur des souches cliniques d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients mucoviscidosiques (Travis *et al.*, 1999). Elle agit en synergie avec d'autres protéines de l'immunité innée telles que le lysozyme et le SLPI (Ellison, III *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 2000). Elle est retrouvée en grandes quantités dans les larmes, les sécrétions vaginales et intestinales, la salive, les sécrétions exocrines et les sécrétions respiratoires (Rogan *et al.*, 2006).

#### I.2.5. Les peptides de défense

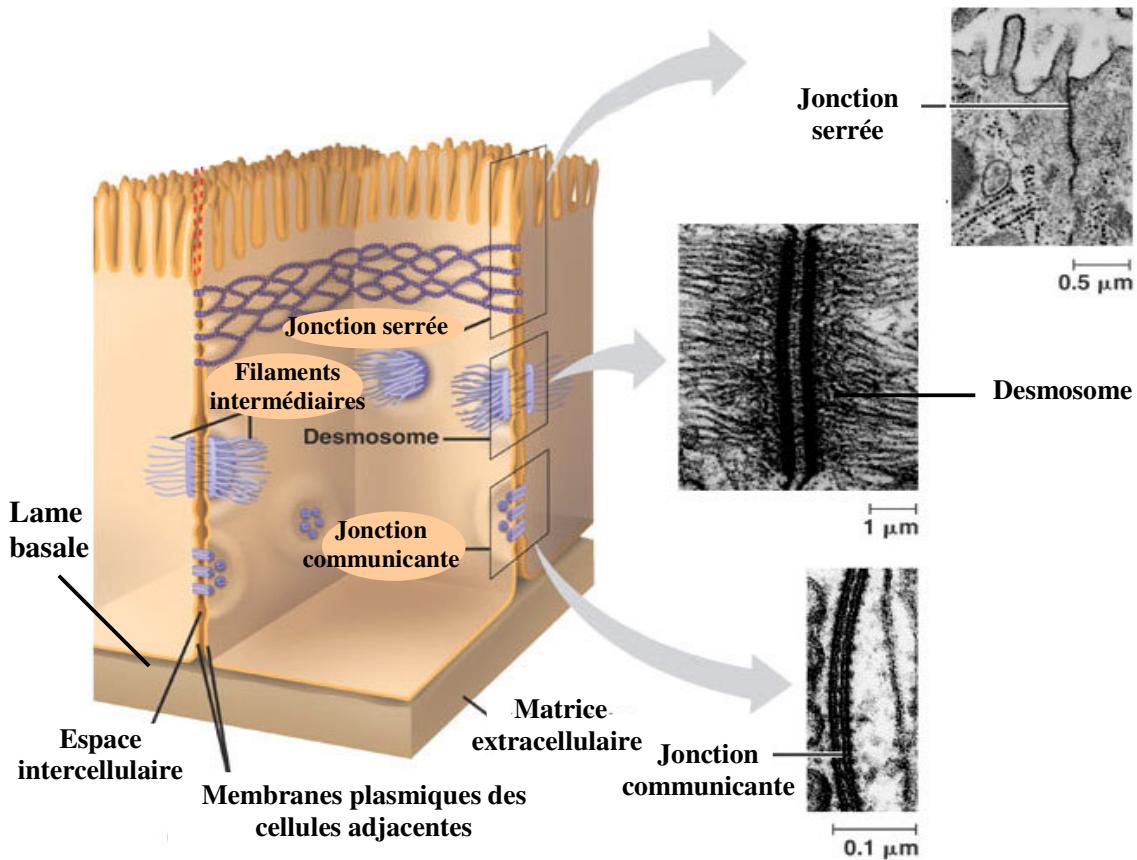
Les défensines sont des peptides de 3 à 5 kDa, membres d'une large famille aux caractéristiques de repliement tridimensionnel comprenant six cystéines formant des ponts disulfures. Les défensines ont une activité cytotoxique contre les bactéries, les levures, les parasites, les virus et certaines cellules hôtes (Martin *et al.*, 1995). Elles se subdivisent en différentes classes qui comportent les alpha- et beta-défensines. Les alpha-défensines sont aussi connues sous le nom de peptide neutrophile humain. Les alpha-défensines 1 à 4 sont

présentes dans les granules azurophiles des neutrophiles où elles constituent 50% des protéines totales (Harwig *et al.*, 1994) et les alpha-défensines 5 et 6 ont été identifiées au niveau des cellules de Paneth dans les cryptes de la muqueuse intestinale et dans l'appareil génital féminin. Les alpha-défensines possèdent une grande variété d'action comme des propriétés mitogènes et chémo-attractantes (Murphy *et al.*, 1993; Chertov *et al.*, 1996) et contribuent au remodelage épithelial de l'appareil respiratoire en activant la prolifération des cellules épithéliales (Aarbiou *et al.*, 2002).

Les béta-défensines diffèrent des alpha-défensines par l'espacement et la connectivité des cystéines. Les béta-défensines 2 et 3 sont secrétées en réponse au LPS et aux cytokines (TNF-alpha, IL-1 béta) et sont actives contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Les béta-défensines 1 à 3 ont été identifiées dans l'appareil respiratoire humain et sont secrétées par les cellules épithéliales respiratoires, elles agissent en synergie avec d'autres protéines de l'immunité innée pour éliminer les bactéries. Chaque béta-défensine possède sa propre activité antimicrobienne. *S. aureus* par exemple est résistante aux béta-défensines 1 et 2 mais sensible à la béta-défensine 3 (Harder *et al.*, 2001). Les béta-défensines 2 et 3 peuvent subir un clivage protéolytique par les cathepsines à cystéines qui sont présentes en concentration élevée dans la mucoviscidose (Greene *et al.*, 2003).

## **II. Intégrité de l'épithélium respiratoire**

De nombreux types cellulaires relarguent leurs médiateurs dans la lumière de l'appareil respiratoire et la perméabilité de l'épithélium vis-à-vis de ces médiateurs affecte la réponse des tissus sous-jacents. La plupart des petites molécules chargées et hydrophiles passent entre les cellules épithéliales via la route « para-cellulaire », constituée par les jonctions serrées et les espaces latéraux intercellulaires. L'épithélium respiratoire constitue cependant une barrière physique vis à vis des particules inhalées et pathogènes, du fait de son architecture pseudostratifiée et son ancrage à la lame basale et des différents types de jonctions assurant la cohésion et régulant l'imperméabilité de cet épithélium (figure 7).



**Figure 7 : Organisation des complexes jonctionnels des cellules épithéliales**

Les cellules épithéliales forment une barrière jonctionnelle grâce aux jonctions serrées situées à la partie la plus apicale de la membrane basolatérale de la cellule et grâce aux desmosomes. Les cellules épithéliales communiquent entre elles grâce aux jonctions communicantes qui permettent le passage de petites molécules intervenant dans la communication intercellulaire.

### II.1. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées forment un réseau à la partie la plus apicale de la membrane basolatérale des cellules ciliées. Elles sont associées à différentes protéines telles que la *zonula occludens* 1 (ZO-1), l'occludine et les claudines. ZO-1 est une protéine cytoplasmique de 225 kDa située aux points de fusion des filaments du cytosquelette d'actine. L'occludine est une protéine cytoplasmique de 65 kDa située aux points de contact entre les membranes. Les jonctions serrées ont pour rôle d'assurer l'imperméabilité de l'épithélium grâce à un cloisonnement étanche des espaces intercellulaires (fonction « gate ») mais permettent dans un même temps la diffusion des petites molécules chargées et hydrophiles tels que les ions (fonction

« fence »). Ces jonctions constituent une barrière physique de diffusion évitant ainsi la pénétration des bactéries dans la muqueuse respiratoire (Godfrey *et al.*, 1992). Coraux *et al.*, ont montré, dans le laboratoire, que les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* induisent une dégradation de la protéine ZO-1 des cellules épithéliales respiratoires primaires humaines qui débute de façon très précoce (après 30 min d'incubation) et qui est presque complète après 3h d'incubation. Cette dégradation est inhibée par un prétraitement des cellules avec le salmétérol (agoniste des récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques) qui augmente l'expression de ZO-1 et qui agit de façon spécifique puisque partiellement inhibé par un antagoniste des récepteurs  $\beta 2$  (Coraux *et al.*, 2004).

### ***II.2. Les jonctions intermédiaires***

Les jonctions intermédiaires sont situées sous les jonctions serrées et forment des complexes jonctionnels le long de la membrane baso-latérale des cellules cylindriques. Ces complexes d'adhérence confèrent un potentiel contractile aux cellules épithéliales grâce à leur ancrage au cytosquelette d'actine. Les plaques intracellulaires de ces jonctions sont composées d'actine  $\alpha$ , de tropomyosine, de myosine II, de zyxine, de vinculine et de radixine (Franke *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1997). Ces protéines de la plaque sont liées aux complexes protéiques intracellulaires de caténines qui sont elles-mêmes liées aux cadhérines. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui permettent l'adhérence des cellules épithéliales adjacentes. L'expression de ces différentes protéines varie en fonction de l'état de différenciation des cellules.

### ***II.3. Les desmosomes***

Les desmosomes sont des complexes jonctionnels liant les cellules ciliées aux cellules basales, et aux cellules ciliées adjacentes (Leube *et al.*, 1991). Les desmosomes sont constitués de desmplakines et de glycoprotéines transmembranaires formant une plaque cytoplasmique dense. Les plaques intracellulaires de ces complexes jonctionnels sont liées aux protéines des filaments intermédiaires de type cytokératine. Les desmosomes sont des marqueurs caractéristiques de la différenciation épithéliale.

#### ***II.4. Les jonctions communicantes***

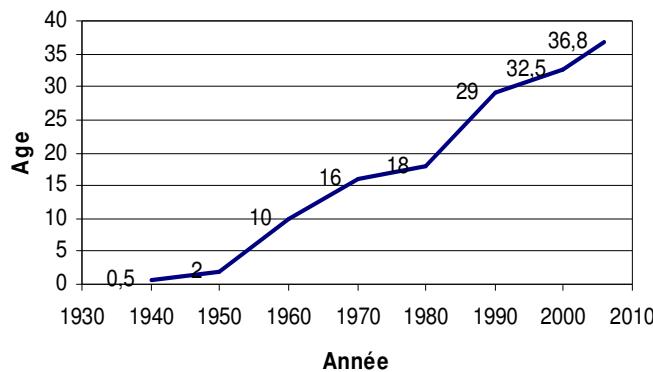
Les jonctions communicantes sont constituées de molécules transmembranaires, les connexines, organisées en hexamères, les connexons. Chaque connexon s'associe avec un connexon d'une cellule adjacente formant ainsi des canaux de 2 à 4 nm de diamètre situés sur la membrane baso-latérale des cellules épithéliales. Les canaux sont distribués en agrégats et forment des plaques de jonctions communicantes. L'incompatibilité entre des paires de connexons participe à la formation de barrière entre cellules et évite le couplage entre des cellules de fonctions différentes (Bruzzone *et al.*, 1996). Les cytoplasmes des cellules adjacentes sont alors en contact direct, ce qui permet des échanges intercellulaires par diffusion passive de molécules dont la taille est inférieure à 1 kDa. Les jonctions communicantes permettent ainsi la diffusion de messagers qui vont coordonner les activités cellulaires comme le contrôle de la fréquence de battement ciliaire des cellules ciliées en réponse à des stimuli.

#### ***II.5. Les hémidesmosomes***

Les hémidesmosomes sont présents au pôle basal des cellules basales et permettent leur attachement à la lame basale sous-jacente (Green *et al.*, 1996). Ils sont constitués d'une plaque cytoplasmique qui est en fait un épaississement de la membrane constitué par l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  et les protéines BP180, et d'une plaque intracellulaire dense, elle-même constituée de desmoplakines. Les filaments de cytokératine du cytosquelette convergent au niveau de cette plaque. Face à cet ensemble se trouve la plaque sous-basale, très fine, dans la partie haute de la lame basale sous-épithéliale. Les cellules sont alors ancrées à la laminine de la lame basale, ce qui assure la liaison entre les éléments du cytosquelette cellulaire et de la matrice extracellulaire.

## CHAPITRE 3 : LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive létale la plus répandue dans la population caucasienne avec 1 naissance sur 3 000. Plus de 50 000 personnes sont atteintes par cette maladie à travers le monde. L'espérance de vie des patients ne cesse d'augmenter (figure 8) grâce à la prise en charge précoce de la maladie, notamment l'utilisation régulière et précoce de la kinésithérapie et l'application d'une antibiothérapie dirigée vers *P. aeruginosa*. Les études cliniques multicentriques ont permis de mieux définir les stratégies à adopter de façon précoce chez les enfants atteints de mucoviscidose. On peut logiquement espérer que grâce au diagnostic néo-natal et au suivi très précoce des enfants mucoviscidosiques, l'espérance de vie continuera à croître.



**Figure 8 : Espérance de vie des patients mucoviscidosiques** (d'après Orenstein *et al.*, 2002)

L'espérance de vie des patients CF qui était de 2 ans en 1950 est de 36,8 ans en 2006.

Cette maladie est caractérisée par une atteinte de l'appareil respiratoire, du tube digestif et ses annexes (pancréas, foie et voies biliaires), mais également des glandes sudoripares et du tractus génital. Les infections respiratoires sont responsables actuellement de plus de 90% de la morbidité et de la mortalité des patients atteints par la mucoviscidose.

Cette pathologie est caractérisée par l'inflammation massive et l'infection chronique des voies aériennes avec un influx de neutrophiles et une colonisation bactérienne par des microorganismes particuliers comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. L'inflammation et l'infection conduisent progressivement à une bronchectasie, une destruction pulmonaire et une insuffisance respiratoire. Le traitement de la mucoviscidose est un traitement symptomatique. Une kinésithérapie respiratoire avec drainage bronchique et accélération du flux expiratoire est effectuée quotidiennement. La viscosité du mucus bronchique peut être réduite par l'utilisation d'aérosols de RhDNase. L'infection bronchique

par certains pathogènes tels que *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* justifie de cures antibiotiques récurrentes. La prise en charge nutritionnelle associe l'apport d'extraits pancréatiques en cas d'insuffisance pancréatique externe et alimentation hypercalorique, hyperprotidique sans restriction lipidique.

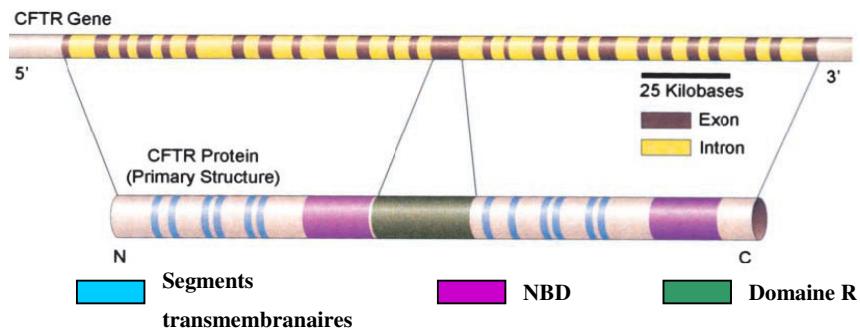
## I. Historique

C'est en 1949 que Lowe *et al.*, se basant sur l'hérédité autosomique récessive de la maladie, ont postulé que la mucoviscidose ou cystic fibrosis (CF), devait être due à un défaut dans un gène unique. Un taux élevé de sel dans la sueur des patients mucoviscidosiques suggéra des anomalies dans les transports de fluides et d'électrolytes dans les glandes sudoripares et Quinton établit que les canaux sudoripares chez ces patients étaient imperméables au chlore (Quinton *et al.*, 1986). Peu de temps après la découverte d'un transport anormal de chlore dans la mucoviscidose, Collins, Riordan, Tsui et coll ont identifié le gène responsable de la maladie, indépendamment de la connaissance de la structure de la protéine correspondante (Riordan *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Cette protéine a donc été appelée « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator » (CFTR) du fait de sa séquence et de la prédiction de sa fonction.

## II. Structure et fonctions de la protéine CFTR

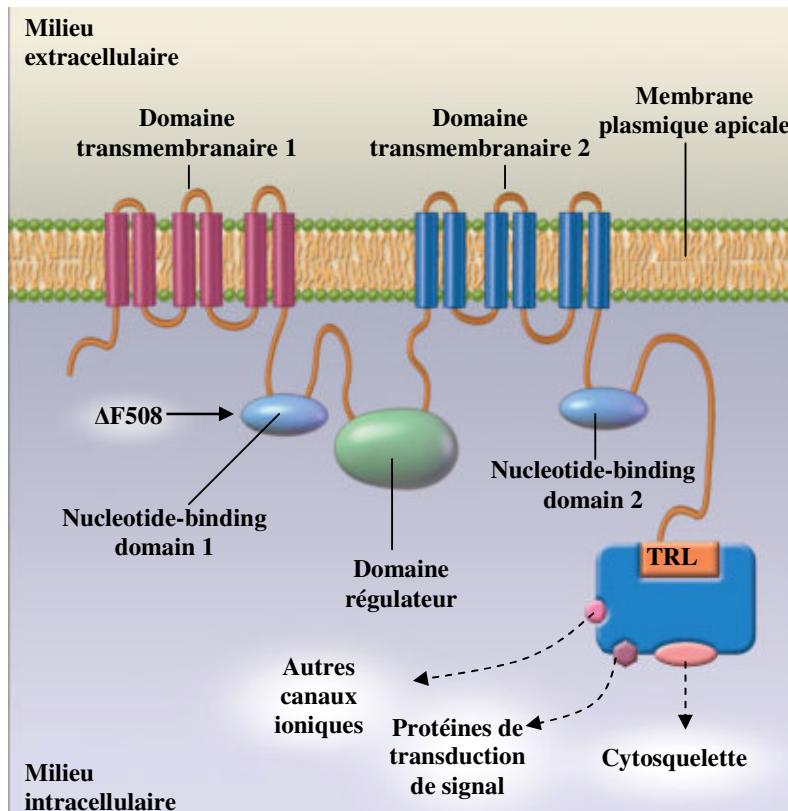
### II.1. Structure et fonctions

CFTR est une protéine membranaire de 170 kDa codée par un gène de 250 kb d'ADN (figure 9), situé sur le bras long du chromosome 7 (Riordan *et al.*, 1989). CFTR est un canal chlore appartenant à la famille des protéines transporteuses ABC (ATP Binding Cassette). CFTR est constitué de 1480 acides aminés comportant deux domaines transmembranaires à six hélices hydrophobes, ainsi qu'une partie cytosolique formée de deux domaines hydrophiles NBD1 et NBD2 (Nucleotide Binding Domain) qui sont les sites de fixation de l'ATP, et d'un domaine régulateur R. Ce domaine R est constitué de 241 acides aminés et contient les sites potentiels de phosphorylation des protéines kinases A et C (Ostedgaard *et al.*, 2001) (figure 10).



**Figure 9 : Gène CFTR et protéine correspondante** (d'après Gibson *et al.*, 2003)

Le gène CFTR humain est localisé sur le bras long du chromosome 7 et il est constitué de 27 exons qui codent les 1 480 acides aminés de la protéine CFTR.



**Figure 10 : Structure de CFTR** (d'après Rowe *et al.*, 2005)

La protéine CFTR contient deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD) qui lient et hydrolysent l'ATP, deux domaines transmembranaires qui forment le canal et un domaine régulateur (R) central. Le domaine R, propre à CFTR, contient de nombreux sites de phosphorylation pour les kinases A ou C. L'extrémité C terminale est ancrée au cytosquelette via une interaction de type PDZ.

Les protéines ABC fonctionnent comme médiateurs de transports de solutés organiques et incluent entre autres les protéines MDR (Multi Drug Resistance proteins) et les protéines MRP (Multi drug Resistance associated Proteins), ces dernières étant des protéines de détoxicification cellulaire (Lallemand *et al.*, 1997).

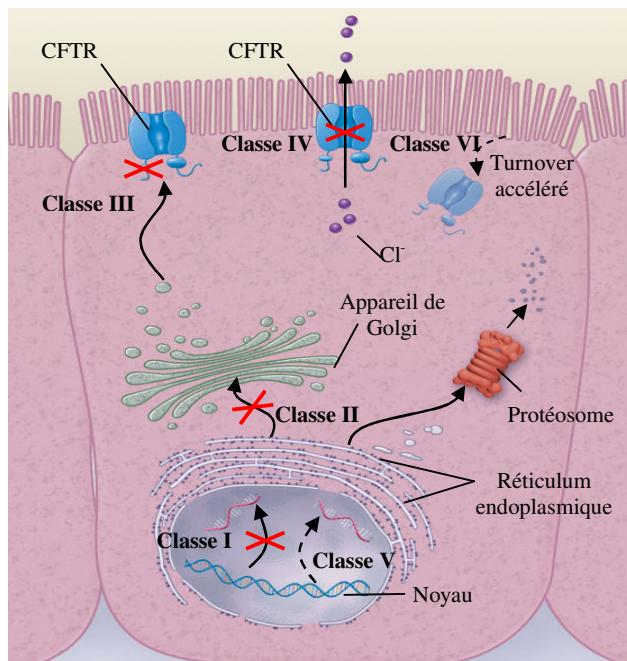
CFTR conduit le chlore à travers la membrane cellulaire et est régulée par les protéines kinases A (PKA) de façon AMPc-dépendante. Les sites PKA de la protéine servent de cible pour la phosphorylation. L'hydrolyse de l'ATP est médiée par NBD1 et 2 dans l'intégralité du canal ionique. De nombreuses autres fonctions ont été attribuées à CFTR comme la régulation négative du transport sodique transépithélial et la régulation des canaux chlore et potassium activés par le calcium (Knowles *et al.*, 1983). CFTR a également un rôle important dans les fonctions d'exocytose et la formation de complexes moléculaires dans la membrane plasmique (Bertrand *et al.*, 2003).

Au niveau de la membrane apicale, CFTR fait partie d'un assemblage de plusieurs protéines. Les trois acides aminés terminaux ancrent CFTR aux récepteurs de type PDZ (PSD-95/SAP-90, Discs-large, ZO-1 homologous domain), à proximité de nombreux récepteurs membranaires, canaux ioniques et du cytosquelette (Short *et al.*, 1998). Le rôle de CFTR dans les cellules épithéliales ne se restreint donc pas à la seule perméabilité du chlore. Chez les patients mucoviscidoses, l'absence de CFTR influence l'expression d'autres molécules telles que les protéines ayant un rôle important dans la réponse inflammatoire, les processus de maturation, les transports ioniques et la signalisation cellulaire. Ces différents gènes (sens modificateurs) et protéines vont potentiellement modifier le phénotype CF ce qui peut expliquer les différences de sévérité clinique observées chez les patients porteurs de la même mutation de *CFTR*.

## ***II.2. Mutations du gène CFTR***

Le gène *CFTR* comporte environ 180 000 paires de bases et 1523 mutations ont été décrites à ce jour (le 27/09/2006) (<http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>) dans la séquence codante, les signaux d'épissage des ARN messagers, et d'autres régions. Ces mutations peuvent être répertoriées en six classes selon le mécanisme par lequel elles vont provoquer la maladie (figure 11). Les mutations de classe I affectent la production de la protéine. Il y a alors absence totale ou partielle de la protéine liée à des mutations non-sens (G542X), des mutations d'épissage (1717 :1G→1A) et des mutations entraînant un déphasage du cadre de lecture (3905insT) situées sur l'ARN messager codant pour la protéine CFTR.

Les mutations de classe II affectent la maturation cellulaire de la protéine CFTR comme pour la mutation  $\Delta F508$ , où les anomalies de glycosylation conduisent à un défaut du trafic intracellulaire et à une absence ou à un faible taux d'expression de la protéine au niveau du pôle apical de la cellule. Les mutations de classe III affectent la régulation du canal chlore. Ce sont des mutations faux-sens au niveau des sites de liaison de l'ATP (NBD1 et 2) ou dans le domaine R qui aboutissent à une altération de la fonction de la protéine CFTR, régulée par la concentration en ATP cytosolique. Les mutations de classe IV perturbent la perméabilité du canal chlore en affectant la sélectivité de ce dernier. Elles incluent les mutations dans les domaines transmembranaires. Les mutations de classe V réduisent le nombre de transcrits de CFTR. Les mutations de classe VI affectent la stabilité de CFTR à la surface cellulaire.



**Figure 11 : Différentes classes de mutations de CFTR** (d'après Rowe *et al.*, 2005)

*Les différentes classes de mutations du gène cftr sont l'absence de synthèse (classe I) ; un défaut de maturation et une dégradation prématurée (classe II) ; une mauvaise régulation telle qu'une diminution de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP (classe III) ; un défaut de la conductance du chlore ou une fermeture du canal (classe IV) ; une diminution du nombre de transcrits due à une anomalie du promoteur ou de l'épissage (classe V) ; et un turnover accéléré de la surface cellulaire (classe VI).*

Dans la population caucasienne, la mutation la plus répandue est la mutation  $\Delta F508$  (70% de chromosome muté) : 50% des malades sont homozygotes pour cette mutation. Elle consiste en une délétion de trois paires de bases dans l'exon 10 du gène, entraînant l'absence d'une

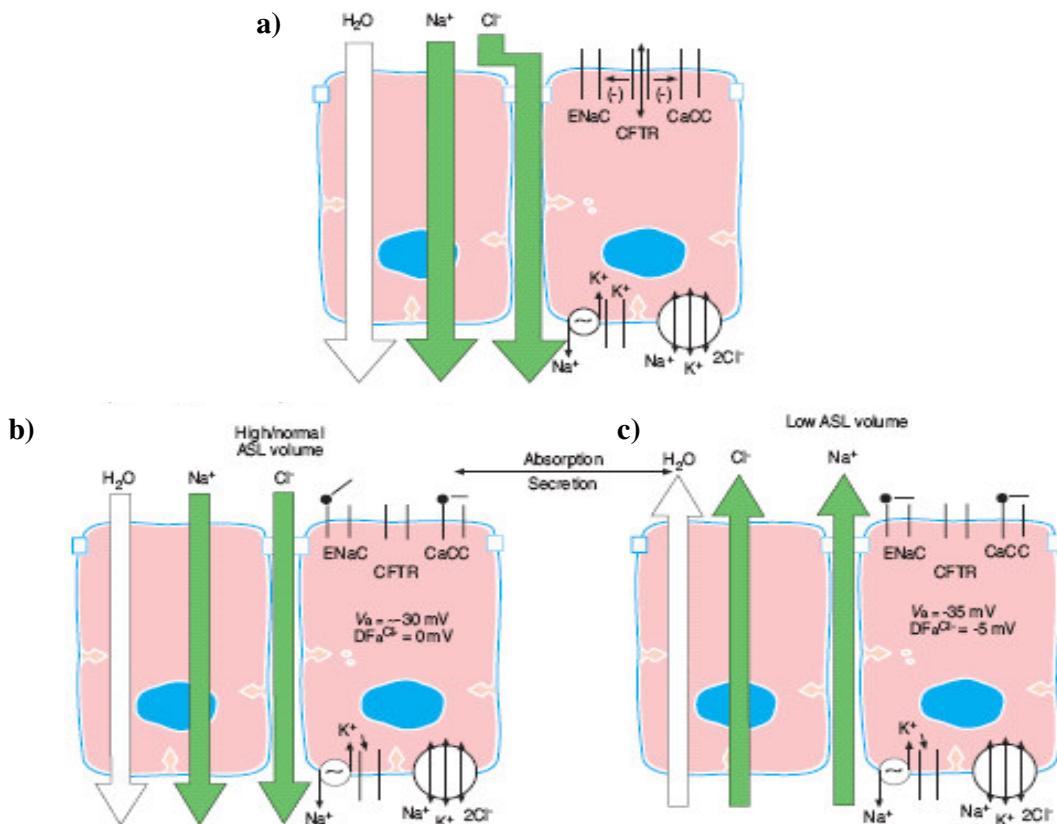
phénylalanine en position 508 de la protéine. Cette protéine possède encore une fonction de canal chlore dans les membranes lipidiques libres. Lorsqu'elle est synthétisée au niveau de la cellule, cette protéine est rapidement reconnue comme étant anormale, elle est alors dégradée rapidement après sa synthèse avant même d'atteindre son site d'action à la membrane apicale de la cellule. Sermet-Gaudelus *et al.*, ont montré qu'il existe une activité résiduelle de conductivité des anions régulée par la voie de l'AMP cyclique (AMPc), chez les cellules épithéliales ciliées nasales ΔF508, similaire à celle décrite chez les cellules exprimant le canal CFTR normal et chez les sujets sains. Ceci suggère que les phénotypes peu sévères observés chez certains patients homozygotes pour la mutation ΔF508 pourraient être liés à une fonction résiduelle de CFTR dans les tissus respiratoires (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2002).

### **III. Pathologie respiratoire**

La pathologie respiratoire est majoritairement responsable de la morbidité et de la mortalité des patients atteints par la mucoviscidose. CFTR joue un rôle essentiel dans cette pathologie *via* son implication dans les modifications du liquide de surface respiratoire, les infections et l'inflammation observés dans la mucoviscidose.

#### ***III.1. Modifications du liquide de surface***

Il existe deux hypothèses qui tentent d'expliquer les anomalies de clairance mucociliaires observées dans la mucoviscidose. La première hypothèse suggère un taux élevé de sels dans le liquide de surface respiratoire, c'est le modèle hypotonique (figure 12b). Le liquide de surface respiratoire normal aurait un faible taux de sels due à une absorption active de sels *via* les canaux CFTR et ENaC (figure 12a). Dans la mucoviscidose, les sels seraient très peu absorbés au niveau de l'épithélium respiratoire CF d'où un excès de sels dans le liquide de surface respiratoire CF, ce qui inactiverait certains peptides antimicrobiens qui sont sensibles aux sels. La seconde hypothèse suggère une diminution du volume du liquide de surface respiratoire CF, c'est le modèle isotonique (figure 12c). Le liquide de surface respiratoire normal aurait un taux de sels équivalent à celui du plasma et CFTR inhiberait le canal épithelial sodique (ENaC) (figure 12a). Dans la mucoviscidose, l'absence de CFTR entraînerait une absence d'inhibition de ENaC, d'où une absorption isotonique anormalement élevée de fluide et une forte sécrétion de sels. Le volume du liquide de surface respiratoire serait alors diminué ce qui entraînerait une clairance mucociliaire réduite (Boucher *et al.*, 2004). Le modèle isotonique constitue cependant l'hypothèse la plus probable.



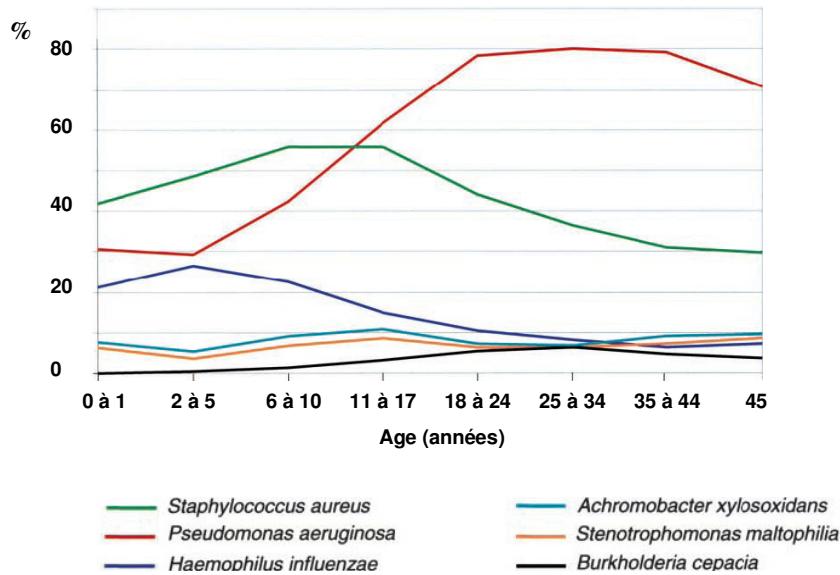
**Figure 12 : Modèles hypotonique et isotonique de transport d'ions (d'après Boucher *et al.*, 2004)**

a) Schéma décrivant les transports ioniques et d'eau de l'épithélium respiratoire normal. Les canaux ioniques situés au pôle apical de l'épithélium sont le canal épithélial sodique (ENaC), le canal CFTR et le canal chlore activé par le Ca<sup>+</sup> (CaCC). Les canaux ioniques situés au pôle basolatéral sont la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, le canal K<sup>+</sup> et le cotransporteur Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>. b) Modèle hypotonique : lorsque le liquide de surface respiratoire est présent en grande quantité, l'absorption de Na<sup>+</sup> via ENaC domine. Le Cl<sup>-</sup> est alors absorbé passivement via la voie paracellulaire c) Modèle isotonique : le volume du liquide de surface respiratoire est faible et possède un taux de sels équivalent à celui du plasma, ENaC est inhibé par CFTR.

### III.2. Infections dans la mucoviscidose

La susceptibilité des patients CF aux infections respiratoires a été identifiée et décrite dès la description de cette maladie. Concernant les bactéries identifiées et à l'origine de ces infections respiratoires, il existe une cinétique particulière à cette pathologie. En effet, les infections respiratoires dans les premières années de vie sont dues essentiellement à *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* qui sont remplacés progressivement au

cours du temps par *Pseudomonas aeruginosa* (figure 13) (Gibson *et al.*, 2003). Les raisons expliquant cette cinétique bactérienne particulière dans les voies respiratoires des patients CF ne sont pas complètement élucidées.



**Figure 13 : Prévalence bactérienne en fonction de l'âge** (d'après Gibson *et al.*, 2003)

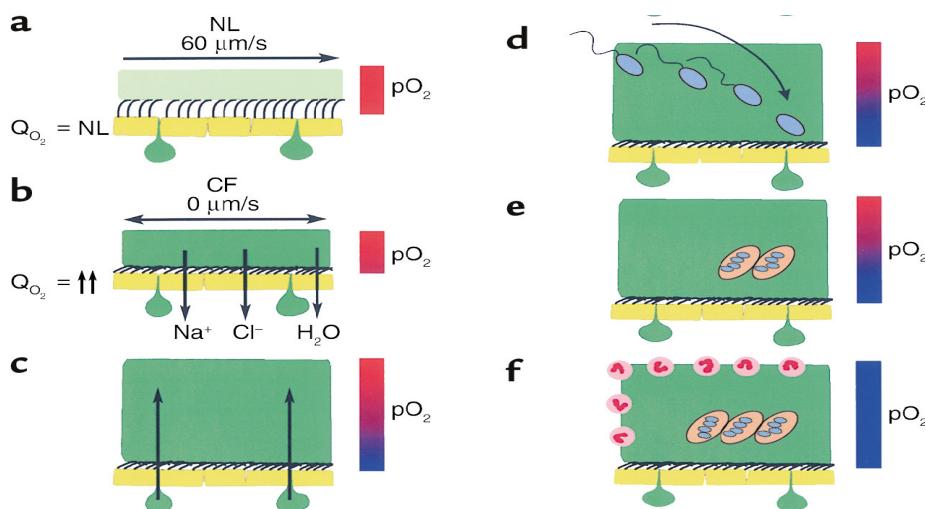
Pourcentage de patients CF qui sont positifs pour les bactéries suivantes (tous âges confondus) : *Pseudomonas aeruginosa* (ligne rouge) 58,7%, *Staphylococcus aureus* (ligne verte) 48%, *Haemophilus influenzae* (ligne bleu foncé) 15,9%, *Stenotrophomonas maltophilia* (ligne orange) 8,4%, *Achromobacter xylosoxidans* (ligne bleu clair) 4,4%, *Burkholderia cepacia* (ligne noire) 3,1%.

*S. aureus*, la première espèce bactérienne responsable d'infections respiratoires qui peut néanmoins entraîner des infections chez les sujets immunocompétents, appartient à la flore commensale tandis que les espèces bactériennes isolées au cours de l'évolution de la mucoviscidose (comme *P. aeruginosa* par exemple) sont des bactéries considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes.

Avant les avancées obtenues en matière d'antibiothérapie et de nutrition, la mortalité des patients CF était due aux infections respiratoires à *S. aureus* et aux problèmes de nutrition. Actuellement, l'espérance de vie a augmenté et la mortalité est principalement due aux infections respiratoires à *P. aeruginosa*. En effet, la stratégie consistant à utiliser une antibiothérapie agressive a permis le contrôle des infections respiratoires à *S. aureus* et *H. influenzae* mais a abouti à la sélection de souches de *P. aeruginosa* initialement sensibles aux antibiotiques qui deviennent résistantes et s'adaptent à l'environnement des bronches de sujets

CF en devenant des variants mucoïdes par exemple. Cependant, *S. aureus* aurait un rôle dans l'infection de l'appareil respiratoire des patients CF par *P. aeruginosa*. Mashburn *et al.*, ont montré par exemple que *S. aureus* est une source de fer pour la croissance de *P. aeruginosa* lors de co-cultures *in vivo* (Mashburn *et al.*, 2005).

L'infection chronique à *P. aeruginosa* observée dans la mucoviscidose est liée à la croissance de cette bactérie au niveau du mucus. L'hypersecrétion de mucus entraîne une augmentation de son épaisseur, ce qui crée un gradient d' $O_2$  qui va permettre la formation d'alginate par *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* va alors croître dans un environnement restreint en  $O_2$  et former des macrocolonies qui vont permettre une infection chronique (figure 14) (Worlitzsch *et al.*, 2002).



**Figure 14 : La diminution d' $O_2$  dans le mucus favorise l'infection à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose** (d'après Worlitzsch *et al.*, 2002)

(a) *Epithélium respiratoire normal* (b) *Perte excessive du liquide de surface* (c) *Hypersecrétion persistante de mucus* (d) *La bactérie pénètre dans une atmosphère hypoxique* (e) *P. aeruginosa s'adapte aux niches en hypoxie via la formation d'alginate et l'augmentation de la densité des macrocolonies* (f) *Les macrocolonies résistent aux défenses secondaires telle que l'afflux de neutrophiles qui favorise l'infection chronique.*

Il a été proposé par Pier *et al.*, que CFTR est un récepteur de différentes bactéries telle que *P. aeruginosa* (Pier *et al.*, 1996; Pier *et al.*, 1997). En fait il a été montré que les bactéries comme *P. aeruginosa* sont rarement endocytées *in vitro* et *in vivo*, dans les cellules épithéliales CF différenciées. Seules les cellules épithéliales CF dédifférencierées internalisent les bactéries comme *P. aeruginosa*. Plotkowski *et al.*, ont montré que l'internalisation de *P.*

*aeruginosa* ne dépend pas de CFTR mais dépend en premier lieu de la polarité cellulaire et de l'intégrité des complexes jonctionnels (Plotkowski *et al.*, 1999). L'hypothèse de Pier reste donc discutable. De plus, l'activité antimicrobienne des défensines de bas poids moléculaire étant inhibée par de fortes concentrations en sel, l'appareil respiratoire CF est un milieu propice à la prolifération bactérienne. Jarry et Cheung ont récemment montré que *S. aureus*, une fois internalisé dans les cellules épithéliales respiratoires CF, est localisé dans des vésicules ayant les caractéristiques des endosomes mais s'en échappe pour se retrouver dans le cytosol. Dans les cellules épithéliales respiratoires non-CF, *S. aureus* reste lié à l'endosome ce qui inhibe sa réPLICATION et entraîne sa destruction progressive par le contenu de l'endosome. Ces travaux suggèrent que la mutation ΔF508 de CFTR intervient dans l'incapacité des cellules épithéliales à contrôler la sortie de l'endosome et la dégradation de *S. aureus* internalisé, ce qui permet une réPLICATION bactérienne intracellulaire et les lésions tissulaires associées (Jarry et Cheung, 2006). De plus, Di *et al.*, ont très récemment montré que les macrophages alvéolaire de souris *Cftr*<sup>-/-</sup> présentent une acidification des phagosomes moins importante que pour les souris *Cftr*<sup>+/+</sup>. Le milieu acide des phagosomes permet une activité optimale des enzymes de dégradation et permet la dégradation de la plupart des microorganismes. Pour les souris *Cftr*<sup>-/-</sup>, cette acidification est insuffisante pour la lyse des bactéries phagocytées et cet environnement peut même favoriser la croissance bactérienne, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'activité bactéricide vis-à-vis de *P. aeruginosa*. Ces travaux montrent que CFTR participe directement au contrôle du pH des phagosomes après ingestion bactérienne (Di *et al.*, 2006). Il reste à démontrer si ce défaut d'acidité des phagosomes lié à la mutation de CFTR est également observé dans les cellules épithéliales respiratoires après internalisation de *S. aureus*.

Même si *P. aeruginosa* est l'une des bactéries les plus étudiées dans la mucoviscidose, il existe de nombreuses autres espèces impliquées dans cette pathologie dont *Burkholderia cepacia*. *B. cepacia* est un complexe composé de neuf espèces au génome différent (Vandamme *et al.*, 2002 ; Vandamme *et al.*, 2003). Cette bactérie est connue comme étant un pathogène opportuniste dans la mucoviscidose, de plus cette bactérie est résistante à de nombreux antibiotiques et elle se transmet d'un patient à l'autre, ce qui contraint à un isolement des patients CF infectés par *B. cepacia*. La colonisation de l'appareil respiratoire des patients CF à lieu grâce à la capacité d'adhérence des bactéries qui est en partie due à leurs pili. *B. cepacia* se lie en premier lieu aux mucines présentes dans le mucus puis adhère aux récepteurs des cellules épithéliales respiratoires. Saiman *et al.*, ont montré qu'il existerait une synergie entre la colonisation par *P. aeruginosa* et *B. cepacia* via une modification de la

surface des cellules épithéliales par les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* qui exposerait les récepteurs aux adhésines bactériennes et faciliterait l'augmentation de l'adhérence de *B. cepacia* (Saiman *et al.*, 1990). *B. cepacia* secrète de nombreux facteurs de virulences tels que des protéases, des lipases, des hémolysines et des exopolysaccharides. Cette bactérie secrète également une protéinase de 34 kDa qui a des propriétés antigéniques similaires à l'élastase de *P. aeruginosa* qui a la capacité de cliver la gélatine et le collagène mais pas les immunoglobulines humaines (Mc Kevitt *et al.*, 1989). La colonisation de l'appareil respiratoire des patients CF par *B. cepacia* accélère le déclin des fonctions respiratoires des patients CF non seulement à un stade avancé mais également à un stade précoce de la maladie (Govan *et al.*, 1993).

### ***III.3. Inflammation dans la mucoviscidose***

L'inflammation et l'infection respiratoire précoces dans la mucoviscidose peuvent être observées dans des tissus différents (nez, bronches, bronchioles) à des périodes différentes d'évolution de la maladie, ce qui complique la compréhension de la relation entre l'infection initiale et la réponse inflammatoire (Meyer *et al.*, 1997). Différentes études ont mis en évidence un désordre inflammatoire de l'appareil respiratoire à la fois chez des patients présentant une infection respiratoire et des patients ne présentant pas d'infection respiratoire (Armstrong *et al.*, 1997; Muhlebach *et al.*, 1999).

Il existe donc dans la mucoviscidose une réponse inflammatoire qui semble apparaître avant toute infection. Comme l'ont montré Kammouni *et al.*, les cellules séreuses glandulaires de trachée humaine normale secrètent les cytokines IL-6 et IL-8 à l'état basal. Le LPS de *P. aeruginosa* augmente significativement la production d'IL-6 et d'IL-8 et active la production de TNF- $\alpha$ . Les cellules séreuses glandulaires de trachée humaine CF secrètent les cytokines IL-6 et IL-8 en quantité significativement plus importante que les cellules non-CF à l'état basal. Après stimulation par le LPS de *P. aeruginosa*, la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 est augmentée. La sécrétion de TNF- $\alpha$  est absente à la fois à l'état basal et après activation des cellules CF par le LPS, ce qui est due à une absence de transcription de l'ARNm (Kammouni *et al.*, 1997). Les cellules glandulaires de la sous-muqueuse bronchique isolées de patients CF homozygotes  $\Delta F508$ , secrètent à l'état basal un taux de chimiokine pro-inflammatoire, l'interleukine 8 (IL-8), plus élevé que les cellules glandulaires non-CF (Tabary *et al.*, 1998). Hubeau *et al.* ont observé un nombre plus important de macrophages infiltrés dans l'appareil respiratoire de fœtus CF comparés aux fœtus non-CF (Hubeau *et al.*, 2001). Pfeffer *et al.* ont

observé une sécrétion de Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) plus importante par les monocytes sanguins CF comparés aux non-CF (Pfeffer *et al.*, 1993).

D'autres études ont montré qu'il n'y avait pas de différence entre les taux de neutrophiles ou de médiateurs pro-inflammatoires observés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire chez des nourrissons CF et non-CF (Armstrong *et al.*, 1995; Armstrong *et al.*, 2005). La réponse inflammatoire des patients CF est en partie due au défaut de conduction du chlore de CFTR. En effet, une étude récente sur cellules épithéliales respiratoires en interface air-liquide a montré une augmentation d'IL-8, de GM-CSF et NF- $\kappa$ B à l'état basal et/ou après stimulation par la souche PAO1 de *P. aeruginosa* dans des cellules non-CF ayant subi un traitement avec l'inhibiteur CFTR<sub>inh</sub>-172 qui bloque spécifiquement la conductance du chlore de CFTR (Perez *et al.*, 2006). Toutes ces observations suggèrent qu'il existe un état pro-inflammatoire avant toute infection chez les patients CF. Il est cependant clairement établi que la réponse inflammatoire après infection bactérienne des patients CF est plus importante que celle des sujets non-CF.

La réponse inflammatoire due aux infections respiratoires entraîne des dommages tissulaires. Ces dommages sont dus aux médiateurs secrétés par les neutrophiles ayant migré vers l'épithélium respiratoire en réponse à une infection chronique. L'élimination des bactéries par antibiothérapie permet la suppression du stimulus induisant la migration des neutrophiles dans l'appareil respiratoire et ainsi peut limiter les lésions tissulaires. Les médiateurs majoritaires induisant un influx de neutrophiles sont l'IL-8, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et le leukotriène B4. L'IL-8, produit par les cellules épithéliales, les macrophages et neutrophiles stimulés, représente le « chemoattractant » des neutrophiles qui prédomine dans la mucoviscidose (Chmiel *et al.*, 2002). L'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'élastase neutrophile et le LPS peuvent, quant à eux stimuler la production d'IL-8, et ainsi favoriser l'attraction de polynucléaires neutrophiles, leur migration transépithéliale et la libération de leur contenu dans la lumière bronchique.

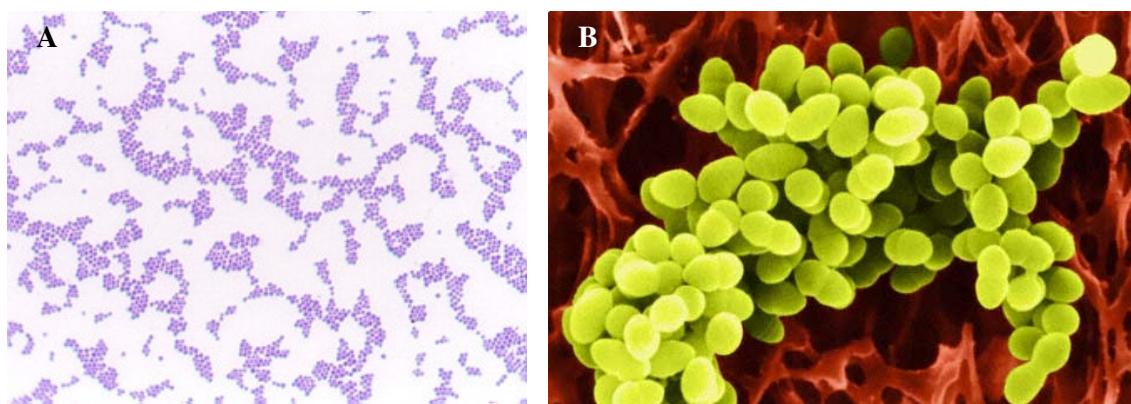
## CHAPITRE 4 : STAPHYLOCOCCUS AUREUS

*Staphylococcus aureus* est un membre de la famille des *Micrococcaceae*, qui inclut deux genres : les microcoques et les staphylocoques. Le genre *Staphylococcus* regroupe trente six espèces, dont dix huit espèces ont été retrouvées chez l'Homme parmi lesquelles *S. aureus* qui peut être responsable de nombreuses infections.

### I. Description générale

#### I.1. Caractères phénotypiques et culturaux

*S. aureus* est un cocci à Gram positif (de 0,5 à 1 µm de diamètre) groupé le plus souvent en amas (figure 15).



**Figure 15 : Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000)**

*La coloration Gram-positif (A) ainsi que la microscopie électronique (B) révèlent une croissance de *S. aureus* en amas.*

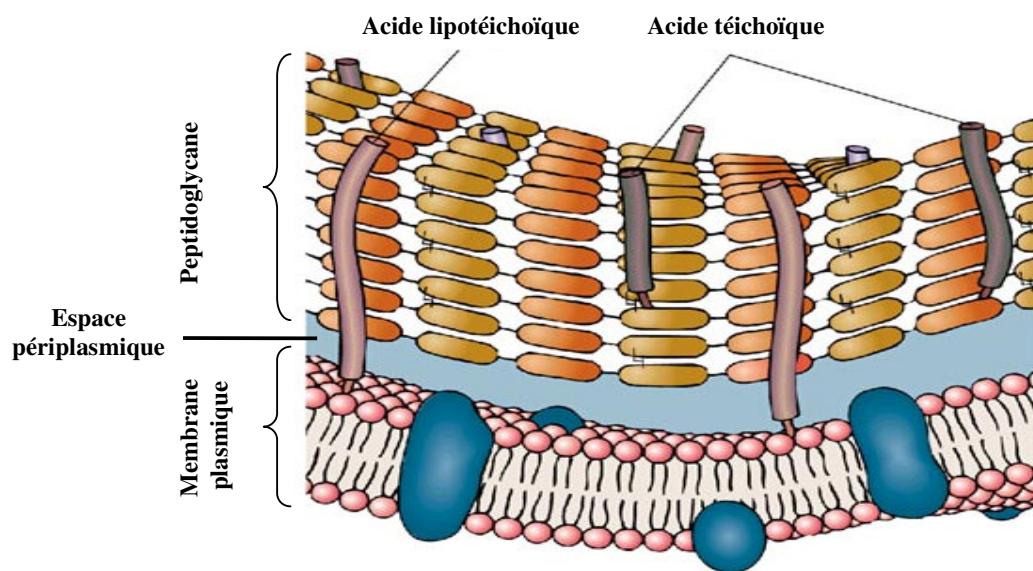
*S. aureus* se distingue des autres staphylocoques par la pigmentation doré de ses colonies et sa capacité à fermenter le mannitol et à synthétiser une coagulase et une désoxyribonucléase.

#### I.2. Caractères structuraux

La production locale par *S. aureus* d'exopolysaccharides (glycocalyx) provoque la formation d'un biofilm, engluant les bactéries, constituant ainsi une forme de résistance au site de

colonisation. Des polysaccharides capsulaires sont retrouvés chez 90% des souches cliniques de *S. aureus* et sont classés en onze sérotypes.

La paroi bactérienne de *S. aureus* est caractéristique des bactéries à Gram positif. Elle est composée d'une grande variété de molécules aux fonctions multiples (figure 16). Elle confère à la bactérie un exosquelette rigide qui la protège contre une lyse mécanique ou osmotique et permet l'immobilisation de protéines de l'environnement bactérien à sa surface. Elle est composée à 50% de peptidoglycane qui est une macromolécule composée de longues chaînes glycaniques qui va servir d'ancre à différentes macromolécules accessoires telles que les acides téichoïques, acides téchuroniques, polyphosphates et hydrates de carbone. Un second composant majeur de la paroi bactérienne est l'acide téichoïque. C'est un polymère de glycérol ou de ribitol reliés par des groupes phosphate. Il est relié au peptidoglycane ou directement aux lipides de la membrane plasmique (il est alors appelé acide lipotéichoïque (LTA)). *S. aureus* est donc capable de coloniser l'hôte grâce en partie aux LTA qui vont de se lier aux cellules épithéliales.



**Figure 16 : La paroi bactérienne de *S. aureus***

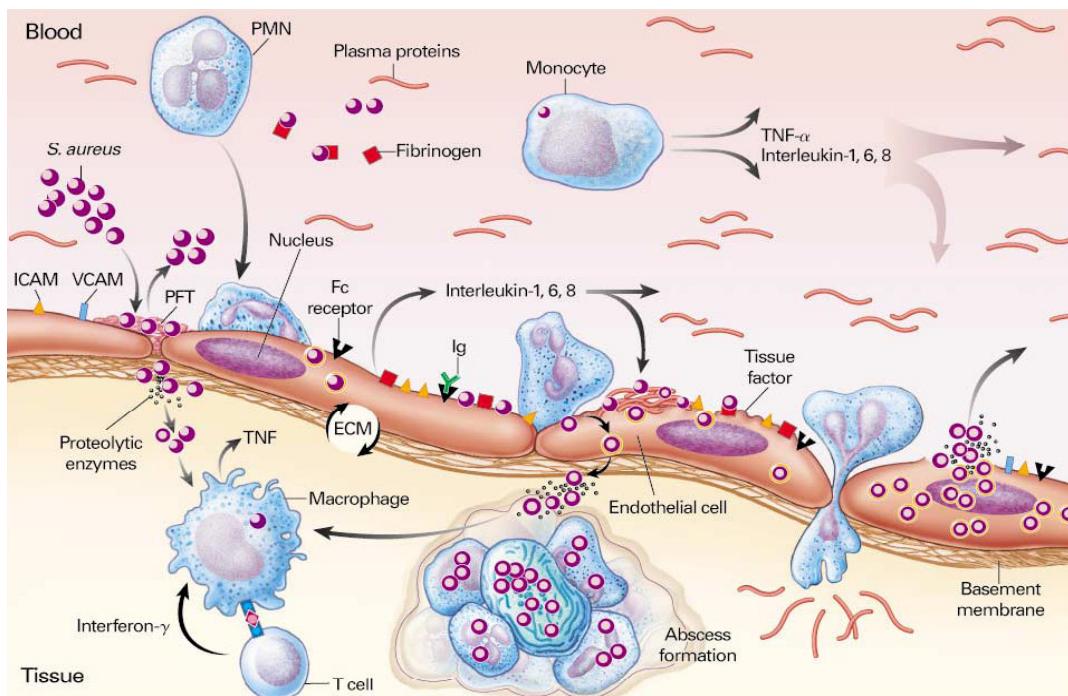
*La paroi de *S. aureus* est composée d'une membrane plasmique et d'un enchevêtrement de peptidoglycans séparés par un espace périplasmique. Cette paroi contient également de l'acide téichoïque qui est lié aux peptidoglycans mais aussi directement aux lipides de la membrane (il est alors appelé acide lipotéichoïque)*

### I.3. Habitat

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal. L'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'Homme est la muqueuse nasale avec 10 à 40% d'individus porteurs de façon permanente (et environ 60% qui hébergent *S. aureus* de façon intermittente) à une densité de  $10^3$  à  $10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> (Heczko *et al.*, 1981).

## II. Les facteurs de virulence de *S. aureus*

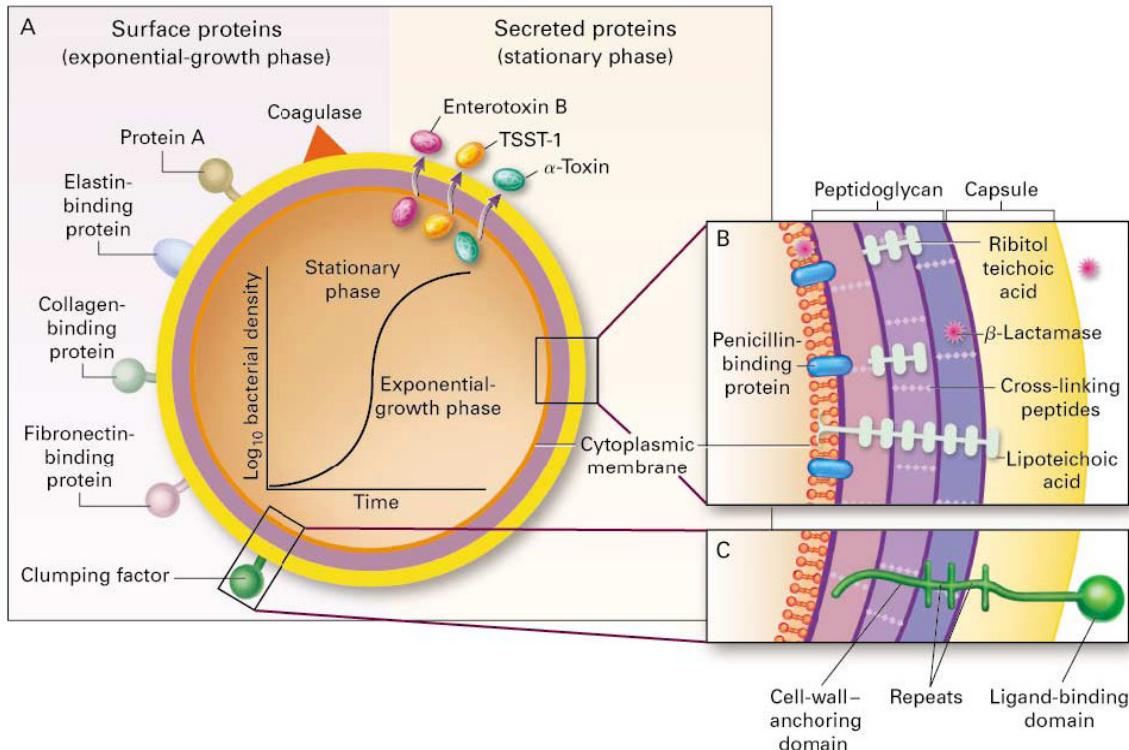
*S. aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire (figure 17). Il exerce ensuite son pouvoir pathogène qui est du, en plus de sa capacité de survie, à la synthèse de multiples facteurs de virulence.



**Figure 17 : Invasion tissulaire par *S. aureus* (d'après Lowy *et al.*, 1998)**

*S. aureus* se lie aux sites de lésions où s'accumulent les plaquettes et les fibrines (PFT). Après phagocytose par les cellules endothéliales, *S. aureus* secrète des enzymes protéolytiques qui vont faciliter la diffusion dans les tissus adjacents et le relargage de *S. aureus* dans le système vasculaire. Après phagocytose, les cellules endothéliales expriment des récepteurs Fc et des molécules d'adhésion et relarguent de l'IL-1, IL-6 et IL-8. Les leucocytes adhèrent aux cellules endothéliales, les macrophages et monocytes relarguent de l'IL-1, IL-6, IL-8 et TNF-alpha après phagocytose de *S. aureus*.

Les facteurs de virulence de *S. aureus* sont de deux types : les protéines de surface et les facteurs de virulence solubles. Ces facteurs de virulence ont chacun un rôle défini dans la colonisation et l'infection de l'hôte et sont synthétisés et/ou secrétés à des moments différents en fonction de la phase de croissance bactérienne (figure 18).



**Figure 18 :Expression de facteurs de virulence de *S. aureus* (Lowy *et al.*, 1998)**

Le schéma A montre les principales protéines de surface et secrétées de *S. aureus*. La synthèse de ces protéines est dépendante de la phase de croissance de la bactérie comme le montre le graphique au centre. Les facteurs de virulence solubles sont principalement secrétés au cours de la phase stationnaire de croissance. Les schémas B et C montrent des sections de l'enveloppe bactérienne.

### II.1. Les protéines de surface ou facteurs d'adhérence

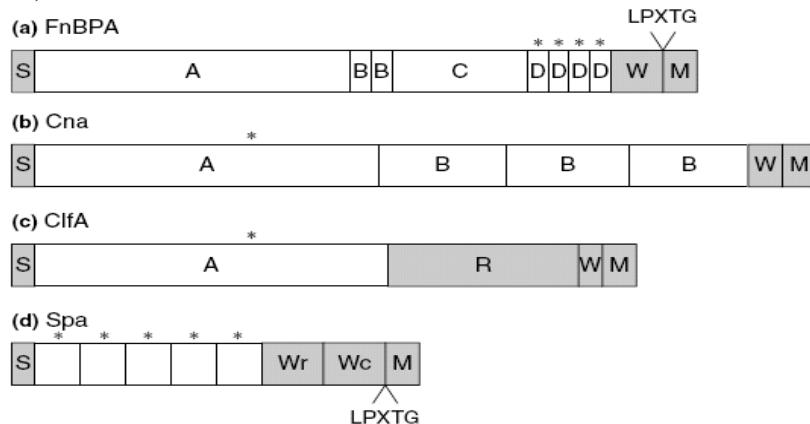
Les « Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules » (MSCRAMM) (tableau 1) qui sont en majorité ancrées aux peptidoglycans de la paroi bactérienne, vont permettre la fixation de *S. aureus* aux cellules. Cinq groupes de protéines de surface ont été caractérisés au niveau moléculaire (Foster *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1998) : Spa (protéine A), Cna (protéine de liaison au collagène), FnBP (protéine de liaison à la

fibronectine), Clf (protéine de liaison au fibrinogène) et EbpS (protéine de liaison à l'élastine).

Abbreviation	Nom complet de la protéine	Ligands
FnBP-A	Protéine de liaison à la fibronectine -A	Fibronectine Fibrinogène Elastine
FnBP-B	Protéine de liaison à la fibronectine -B	Fibronectine Elastine
ClfA	Protéine de liaison au fibrinogène -A	Chaine $\gamma$ du fibrinogène Fibrine
ClfB	Protéine de liaison au fibrinogène -B	Chaines $\alpha$ et $\beta$ du fibrinogène Cytokeratine 10 de Type I
Cna	Protéine de liaison au collagène	Collagène
EbpS	Protéine de liaison à l'élastine	Elastine
Spa	Protéine A	Facteur Von Willebrand
Bbp	Protéine de liaison à la sialoprotéine de l'os	Sialoprotéine de l'os
EbhAB	Protéine de liaison à la matrice extracellulaire	Fibronectine

**Tableau 1: Principales protéines de surface de *S. aureus***

La plupart des protéines de surface de *S. aureus* partagent une même structure, au moins en partie (Figure 19).



**Figure 19 : Organisation structurale des protéines de surface de *S. aureus* (Foster *et al.*, 1998)**

*S* : séquence signal ; *R* : répétition du dipeptide Ser-Asp ; *W* : région traversant la paroi bactérienne ; *M* : région d'ancre à la membrane et contenant des résidus chargés positivement ; *A* et *C* : domaines uniques, *B* et *D* : domaines répétés. Les astérisques indiquent les domaines peptidiques de liaison au récepteur.

### II.1.1. La protéine A (Spa)

La protéine A est la protéine de surface bactérienne la mieux caractérisée. C'est une protéine de 42 kDa présente dans plus de 90% des souches cliniques de *S. aureus*. Elle peut être liée au peptidoglycane ou secrétée. La protéine A est capable de se lier aux immunoglobulines, inhibant l'opsonisation des bactéries par les polynucléaires neutrophiles.

### II.1.2. La protéine de liaison au collagène (Cna)

La protéine de liaison au collagène (Cna) se caractérise par un poids moléculaire de 87, 110 ou 135 kDa en fonction du nombre de répétitions du motif B de 187 acides aminés. Les protéines du collagène étant des constituants majeurs de la matrice extra-cellulaire, elles représentent un site de choix pour l'ancrage de *S. aureus* aux tissus. L'attachement au collagène est d'ailleurs nécessaire et suffisant pour l'adhérence de *S. aureus* au cartilage *in vitro* (Switalski *et al.*, 1993).

### II.1.3. Les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPA et FnBPB)

*S. aureus* est une bactérie pour laquelle une adhérence spécifique à la fibronectine a été démontrée (FnBP : Fibronectin Binding Protein). FnBPA est une protéine de 108 kDa composée de 982 acides aminés (Signas *et al.*, 1989). Le récepteur FnBPA s'attache simultanément à plusieurs sites de la partie amino-terminale de la fibronectine et acquiert une structure secondaire constituant les épitopes de liaison. FnBPB possède 45% d'homologie avec FnBPA dans sa partie N terminale et plus de 95% d'homologie dans les domaines C, D (domaines de liaison à la fibronectine), W et M (Jonsson *et al.*, 1991). Grâce à ces protéines, *S. aureus* se lie à la fibronectine avec une très forte affinité et de façon quasiment irréversible. L'implication des FnBPs dans l'adhérence et l'internalisation de *S. aureus* dans des cellules épithéliales en culture primaire a été confirmée par Sinha *et al* (Sinha *et al.*, 2000).

### II.1.4. La protéine de liaison au fibrinogène (Clf)

La protéine de liaison au fibrinogène est encore appelé clumping factor (Clf). C'est un récepteur pour le fibrinogène qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. L'interaction Clf-fibrinogène est régulée par la concentration calcique et inhibée par des

concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  supérieures à 1mM. Il existe deux Clf, ClfA et ClfB codés par deux gènes distincts et reconnaissant deux régions différentes du fibrinogène.

### II.1.5. La protéine de liaison à l'élastine (EbpS)

La protéine de liaison à l'élastine de *S. aureus* (EbpS) est une protéine de 25 kDa associée à la surface cellulaire. C'est une protéine transmembranaire intégrale contrairement aux autres protéines de surfaces qui sont ancrées aux peptidoglycane via leur motif LPXTG (Downer *et al.*, 2002). Elle se lie à la région N terminale de l'élastine qui est une région toujours libre.

## II.2. *Les facteurs de virulence solubles*

Pratiquement toutes les souches de *S. aureus* sont capables de sécréter, au cours de la phase stationnaire de croissance, un groupe d'enzymes et d'exotoxines, comprenant quatre hémolysines (alpha, bêta, gamma et delta), des nucléases, des protéases, des lipases, une hyaluronidase et une collagénase (tableau 2). En plus de ces protéines, certaines souches produisent une ou plusieurs exotoxines qui ciblent spécifiquement les molécules d'adhésion cellulaires et le système immunitaire hôte.

Superantigènes	Cytotoxines	Enzymes
Entérotoxines A à E	Hémolysines ( $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ et $\gamma$ )	Protéases
Toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1)	Leukocidine de Panton-Valentine	Nucléases
Toxines exfoliatives (ET A, B et D)		Lipases Hyaluronidase Collagénase

Tableau 2 : Principales protéines secrétées par *S. aureus*

### II.2.1. Toxines à activité membranaire

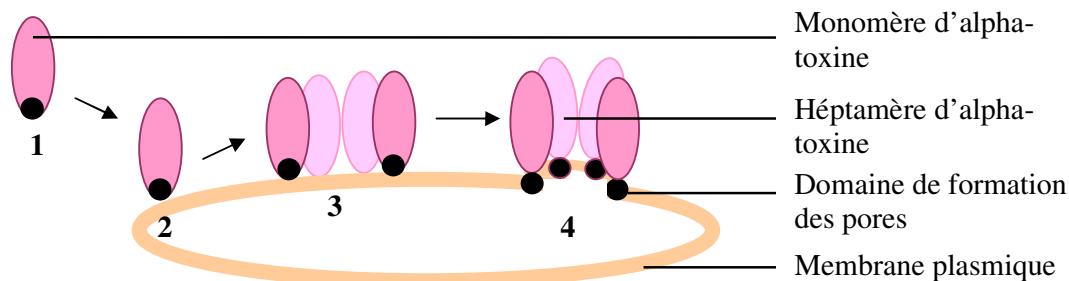
#### II.2.1.1. L'alpha-toxine

L'alpha-toxine est synthétisée par 80 à 90% des souches de *S. aureus* isolées chez l'Homme. Elle est secrétée en fin de phase exponentielle de croissance (figure 18). C'est une protéine de 33 kDa constituée de 293 acides aminés ne contenant pas de cystéine. Elle contient de

nombreuses structures en feuillets  $\beta$  (65%) et sa forme native (monomérique) est parfaitement soluble dans l'eau. Elle a cependant tendance à s'agréger en solution pour former la même structure héptamérique en anneau que dans les bicouches lipidiques (Bhakdi *et al.*, 1981).

L'alpha-toxine a la capacité de former des pores, ainsi, elle lyse les érythrocytes de lapin avec une sensibilité mille fois supérieure à celle des érythrocytes humains. Elle se lie aux érythrocytes de lapin par deux mécanismes différents. A faible concentration ( $< 50 \text{ nM}$ ) elle se lie exclusivement *via* une interaction de haute affinité avec un récepteur cellulaire encore non identifié. Il existe un phénomène de saturation de cette liaison. A des concentrations plus élevées ( $> 200 \text{ nM}$ ), l'alpha-toxine pénètre la bicoche lipidique de façon non spécifique. Cette interaction non spécifique lui permet d'agir sur des cellules qui n'ont pas de récepteur à l'alpha-toxine.

La formation des pores transmembranaires est un phénomène indépendant de l'ATP. Ce sont les changements conformationnels des molécules de toxines (l'oligomérisation) qui vont fournir l'énergie nécessaire au déplacement latéral des lipides de la membrane. La formation des pores par l'alpha-toxine a été largement étudiée et il en ressort un modèle en quatre étapes (figure 20). La première étape est la sécrétion d'un monomère natif soluble dans l'eau. La seconde étape est la liaison des monomères à la membrane plasmique des cellules. La troisième étape est la formation d'un complexe qui est un oligomère naissant ou une sorte de pré-pore avec des liaisons fortes non-covalentes entre les toxines. Le domaine de formation des pores est alors prêt à pénétrer la membrane. La quatrième et dernière étape est la formation finale du pore avec pénétration des domaines de formation des pores dans la membrane.



**Figure 20 : Modèle en quatre étapes de formation des pores par l'alpha-toxine** (d'après Bhakdi *et al.*, 1981)

*Etape 1 : sécrétion d'un monomère. Etape 2 : liaison des monomères à la membrane plasmique des cellules. Etape 3 : formation d'un complexe (pré-pore) avec des liaisons fortes non-covalentes entre les toxines. Etape 4 : pénétration des domaines de formation des pores dans la membrane d'où la formation finale du pore.*

Une fois le pore formé, il a les mêmes propriétés que les protéines membranaires intégrales et reste irréversiblement lié à la membrane. Le diamètre des pores varie selon le modèle, il est de 1 à 1,5 nm dans les membranes lipidiques et les érythrocytes et de diamètre plus petit dans les cellules nucléées où il exerce alors une sélectivité pour les ions monovalents. Il existe donc un flux sélectif d'ions monovalents dans les cellules cible de l'alpha-toxine mais la petite taille de ces pores ne permet pas de flux rapide d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Les cellules ne subissent donc pas la toxicité directe de l'alpha-toxine *via* l'action de cet ion divalent mais subissent les conséquences d'une perturbation de l'homéostase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  telle que la libération massive d'IL-1 $\beta$  par les monocytes (Walev *et al.*, 1995) et l'apoptose des lymphocytes (Jonas *et al.*, 1994).

#### *II.2.1.2. La bêta-toxine*

L'hémolysine  $\beta$  ou toxine  $\beta$  est synthétisée chez 18% seulement des souches de *S. aureus* d'origine humaine. Elle est secrétée en fin de phase exponentielle de croissance comme la plupart des exoprotéines. C'est une protéine de 39 kDa constituée de 330 acides aminés. Son extrémité N terminale est clivée immédiatement après sa sécrétion.

Elle est hémolytique pour les érythrocytes de mouton et non pour les érythrocytes de lapin. Cette protéine possède une activité phospholipase C qui nécessite la présence de  $\text{Mg}^{2+}$  et qui est spécifique de la sphingomyéline et de la lyso-phosphatidylcholine.

On ne connaît pas réellement son rôle dans les pathologies humaines où elle détruit sélectivement les monocytes et aucun autre type cellulaire. La lyse des monocytes s'accompagne d'une libération d'IL-1 $\beta$  et de récepteurs solubles de l'IL-6 (Walev *et al.*, 1996).

#### *II.2.1.3. La gamma-toxine et la leucocidine de Panton-Valentine*

L'hémolysine  $\gamma$  ou toxine  $\gamma$  est synthétisée chez 97% des souches de *S. aureus* alors que la leucocidine de Panton-Valentine (LPV) n'est synthétisée que chez 2% de ces souches.

La toxine  $\gamma$  et la LPV font partie de la famille de toxines synergo-hyménotropes (SHT). Ces toxines sont constituées de deux protéines non associées agissant en synergie et qui, séparées l'une de l'autre, n'ont qu'une faible activité biologique. Ces deux protéines sont connues sous les noms de composés S et F, pour Slow- et Fast-eluting proteins dans une colonne à échange d'ion. Leur mode d'action est leur fixation à la membrane des cellules cibles puis la formation

de canaux membranaires laissant passer des cations divalents. Ces cellules cibles sont les neutrophiles et macrophages ainsi que les érythrocytes pour la toxine  $\gamma$ .

Il existe quatre variants moléculaires de la toxine  $\gamma$  qui est hémolytique et leucotoxique *in vitro*. La LPV est leucotoxique et dermonécrotique mais non-hémolytique.

#### II.2.1.4. *La delta-toxine*

L'hémolysine  $\delta$  ou toxine  $\delta$  est un petit peptide d'environ 3 kDa, constitué de 26 acides aminés. Elle forme une hélice alpha avec un domaine hydrophobe d'un côté et un domaine hydrophile à son opposé. Elle est synthétisée par 97% des souches de *S. aureus* en phase stationnaire de croissance. Ce peptide est capable de lyser différentes cellules dont les érythrocytes ainsi que des structures subcellulaires telles que les organelles et les protoplastes mais son activité est inhibée par la présence de phospholipides. Sa tendance à former des agrégats ainsi que sa structure en hélice alpha, font qu'elle agit comme un détergent en perturbant la membrane cellulaire.

### II.2.2. Les entérotoxines et TSST-1

Les entérotoxines staphylococciques (SE A à E) et la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1) sont aussi appelées toxines superantigènes pyrogènes (PTSAgs). Ces toxines se regroupent du fait de leurs caractéristiques biologiques communes, c'est-à-dire leur activité superantigénique. Les protéines matures sont de petits polypeptides non glycosylés de 22 à 30 kDa qui possèdent jusqu'à 90% de similitude entre elles. Les super antigènes sont des molécules qui provoquent l'activation polyclonale des lymphocytes T V $\beta$ . Ils se lient directement avec une grande affinité à l'antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité qui est fixé aux cellules présentatrices de l'antigène.

### II.2.3. Autres facteurs de virulence

Parmi les autres facteurs de virulence décrits chez *S. aureus*, dont le rôle dans le pouvoir pathogène est important selon l'infection, on peut citer : les sidérophores, qui permettent à la bactérie de capter le fer et de le transporter dans la bactérie ; la coagulase, protéine extracellulaire qui se lie à la thrombine de l'hôte et forme le complexe staphylothrombine ; la

staphylokinase permettant la dissémination hématogène de *S. aureus* à partir de thrombophlébites locale.

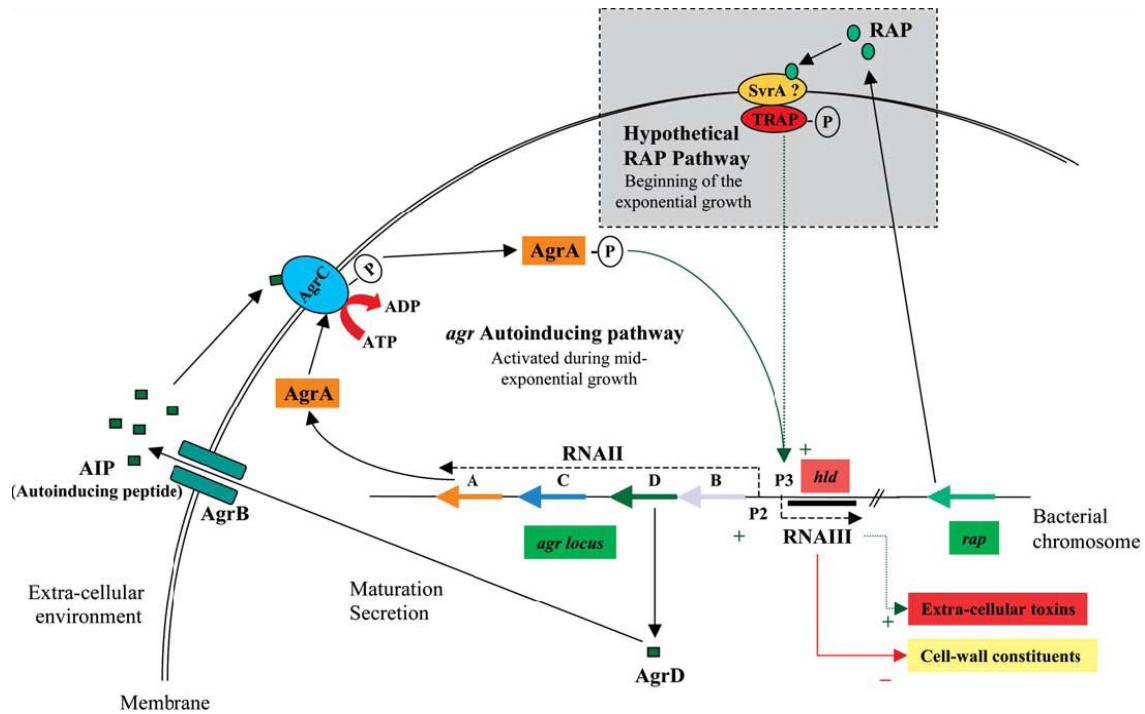
### ***II.3. Régulation génique des facteurs de virulence***

Le génome de *S. aureus* est constitué d'un chromosome circulaire d'environ 2800 paires de bases. Ce chromosome contient des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des gènes codants pour les facteurs de virulence (localisés en partie sur des éléments extra-génomiques). Les éléments extra-génomiques vont servir au transfert de gènes à d'autres bactéries à Gram positif.

L'expression coordonnée des facteurs de virulence, en fonction des signaux extracellulaires, est contrôlée en grande partie par un régulateur global qui est un système à deux composants nommé *agr* (accessory gene regulator). En début de croissance bactérienne, le système *agr* n'est pas activé, permettant la synthèse des facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence bactérienne. Puis le système *agr* diminue l'expression de ces facteurs et stimule l'expression des facteurs de virulence solubles plus en avant dans la croissance bactérienne.

Le locus *agr* est constitué de cinq gènes qui sont *agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*, et *hld*, qui codent pour deux transcripts qui sont RNAII et RNAIII eux même initiés par deux promoteurs distincts qui sont P2 et P3. RNAII code pour AgrA, AgrB, AgrC et AgrD qui sont nécessaires à la transcription de P2 et à l'activation de P3. RNAIII est la molécule effectrice qui régule positivement les exoprotéines et régule négativement les protéines de surface (Wolz *et al.*, 2000).

La régulation du locus *agr* a lieu de deux façons différentes. La première régulation se fait par auto-activation de la transcription de RNAII et RNAIII par leurs promoteurs respectifs P2 et P3. La seconde régulation est l'activation du locus *agr* par la protéine RAP (RNAIII-Activating Protein) via l'activation de la phosphorylation de TRAP (Target of RNAIII-Activating Protein) qui va alors se lier à une molécule associée à la membrane (probablement SvrA (staphylococcal virulence regulator)) (figure 21).



**Figure 21 : Schéma du système *agr* et son interaction avec le système TRAP (Bronner et al., 2004)**

Chez *S. aureus*, le locus *agr* est régulé via deux voies différentes. L'auto-activation de RNAII et RNAIII par leurs promoteurs P2 et P3. L'activation du locus *agr* par la protéine activatrice de RNAIII (RAP).

Un deuxième système de régulation indépendant du système *agr*, désigné *sar* pour « Staphylococcal Accessory gene Regulator », a été identifié par des expériences de mutagénèse (Cheung et al., 1994). Le système régulateur *sar* comporte au minimum trois promoteurs différents (P1, P2 et P3) conduisant à la synthèse de trois transcrits désignés respectivement *sarA*, *sarB* et *sarC*. Les transcrits *sarA* et *sarB* sont principalement exprimés en phase exponentielle de croissance et le transcrit *sarC* est principalement exprimé en phase post-exponentielle de croissance (Bayer et al., 1996). Les mutants *sar*<sup>-</sup> présentent un déficit

marqué de leur fixation à la fibronectine alors que le système *agr* n'a pas d'influence sur cette fixation. Le degré d'interdépendance entre les différents gènes régulateurs *agr* et *sar* n'est pas complètement déterminé. Néanmoins, *sarA* serait un activateur transcriptionnel du promoteur P2 d'*agr*, lequel permet secondairement l'activation du promoteur P3. Il existe donc une cascade de régulation (*sar*→*agr*→gènes cibles) pour les gènes co-régulés par *sar* et *agr*.

#### ***II.4. Pouvoir pathogène de S. aureus***

*S. aureus* provoque deux types de syndromes : les toxémies staphylococciques et les infections suppuratives. Les toxémies sont dues à des toxines produites par la souche *in vivo* une fois installée chez l'hôte (TSST1 et exfoliatines) ou des toxines produites par la souche dans un environnement autre que l'hôte puis ingérées par l'organisme (entérotoxines dans les aliments). En effet, l'ingestion de toxine en dehors de toute cellule bactérienne suffit à reproduire la maladie. Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et la réponse inflammatoire locale et systémique. *S. aureus* est responsable d'infections au niveau de la peau, des articulations, des os et des systèmes vasculaire et respiratoire. Il est également responsable d'infections superficielles cutanées, sous-cutanées et muqueuses telles que les furoncles, panaris impétigo, abcès, cellulites ou lymphangites. *S. aureus* est la principale cause d'ostéomyélites, de méningites, d'endocardites infectieuses et d'arthrites septiques.

*S. aureus* est un pathogène majeur impliqué dans les infections respiratoires communautaires et nosocomiales. Il est décrit comme capable d'adhérer aux mucines respiratoires (Shuter *et al.*, 1996). L'affinité et le niveau d'expression des adhésines responsables des interactions avec les mucines varient en fonction des souches de *S. aureus* (Trivier *et al.*, 1997). *S. aureus* est le premier pathogène isolé dans le tractus respiratoire des enfants atteints de mucoviscidose. Ulrich *et al.*, ont montré que *S. aureus* adhère en priorité aux composés du mucus de l'épithélium respiratoire sans différence significative de l'adhérence de *S. aureus* sur l'épithélium respiratoire CF et non-CF (Ulrich *et al.*, 1998). Schwab *et al.*, ont montré, sur des lignées de cellules épithéliales bronchiques, que l'adhérence des souches CF de *S. aureus* est plus élevée que l'adhérence de souches non-CF (Schwab *et al.*, 1993).

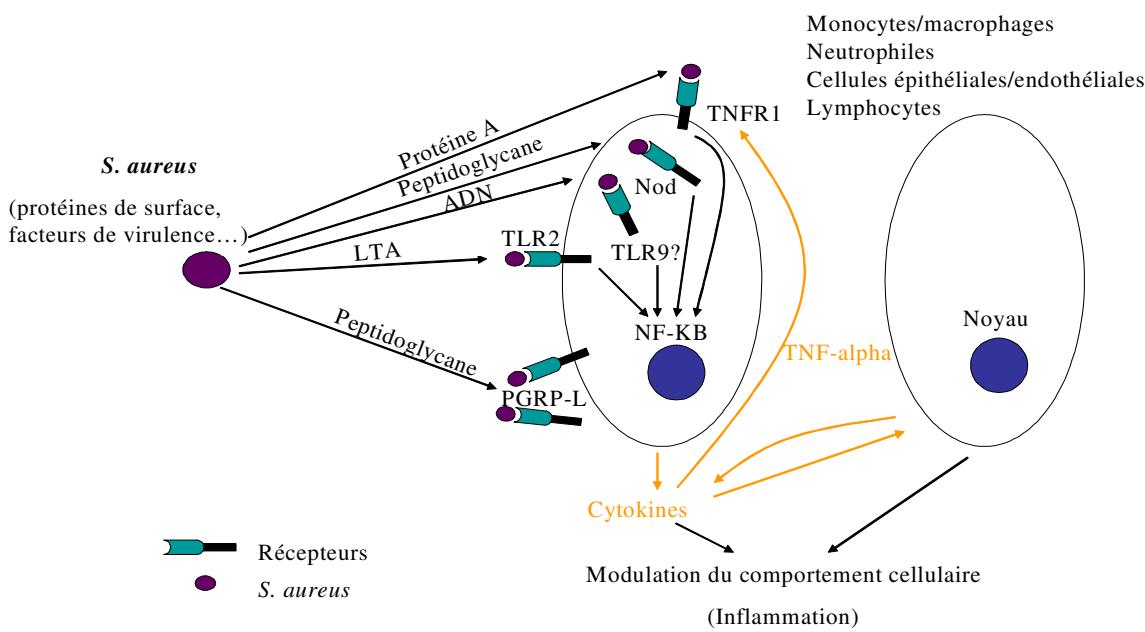
## **II.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques**

L'émergence de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques constitue un problème préoccupant de santé publique, compte-tenu de la fréquence des infections à *S. aureus*. Le support génétique de la résistance aux antibiotiques peut être plasmidique ou chromosomique. Actuellement, plus de 90% de *S. aureus* sont résistants à la pénicilline G par production de pénicillinase d'origine plasmidique. La résistance à la méticilline a émergé en France dès 1962 et a atteint très rapidement des niveaux élevés (25 à 35% de souches de *S. aureus* isolées en milieu hospitalier). Cette résistance est le plus souvent associée à une résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques : macrolides, aminosides, fluoroquinolones. La résistance à la méticilline est le plus souvent due à une modification de la cible de la méticilline par acquisition d'une protéine de liaison à la pénicilline de faible affinité : la PLP2a codée par un gène chromosomique, le gène *mecA*.

L'antibiothérapie dirigée contre *S. aureus* lors d'infections respiratoires chez les patients CF pourrait favoriser l'émergence de *P. aeruginosa*. Ainsi, une étude réalisée par Stutman *et al.*, a montré que, chez des enfants CF suivis de l'âge de deux ans à l'âge de six ans, la proportion d'isolement de *P. aeruginosa* dans des cultures est plus importante si le patient reçoit une antibiothérapie antistaphylococcique (Stutman *et al.*, 2002). Le rôle de *S. aureus* et des antibiothérapies dans l'émergence de *P. aeruginosa* reste encore actuellement mal compris.

## CHAPITRE 5 : RECEPTEURS DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE AUX ADHESINES DE *S. AUREUS*

Les pathogènes provoquant une infection chez l'hôte sont contrôlés par les réponses immunitaires innée et adaptative. La reconnaissance de ces pathogènes tels que *S. aureus* par l'organisme représente la première étape de la défense immunitaire. Le système immunitaire inné est très rapide et représente la première ligne de défense de l'hôte. Les structures qu'il reconnaît sont en général essentielles pour la survie du pathogène. La reconnaissance des pathogènes par ce système, initie une séquence d'événements qui vont conduire à la production et à la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines inflammatoires, à l'activation de macrophages et monocytes et à l'initiation de l'immunité adaptative (Schnare *et al.*, 2001). La production des facteurs pro-inflammatoires est due à différents types cellulaires tels que les neutrophiles et macrophages, les plaquettes, les cellules endothéliales mais aussi les cellules épithéliales. Nous allons plus particulièrement nous intéresser aux récepteurs des cellules épithéliales respiratoires aux adhésines de *S. aureus* (figure 22).



**Figure 22 : Les différents composés de *S. aureus* et leurs récepteurs** (d'après Fournier *et al.*, 2005)

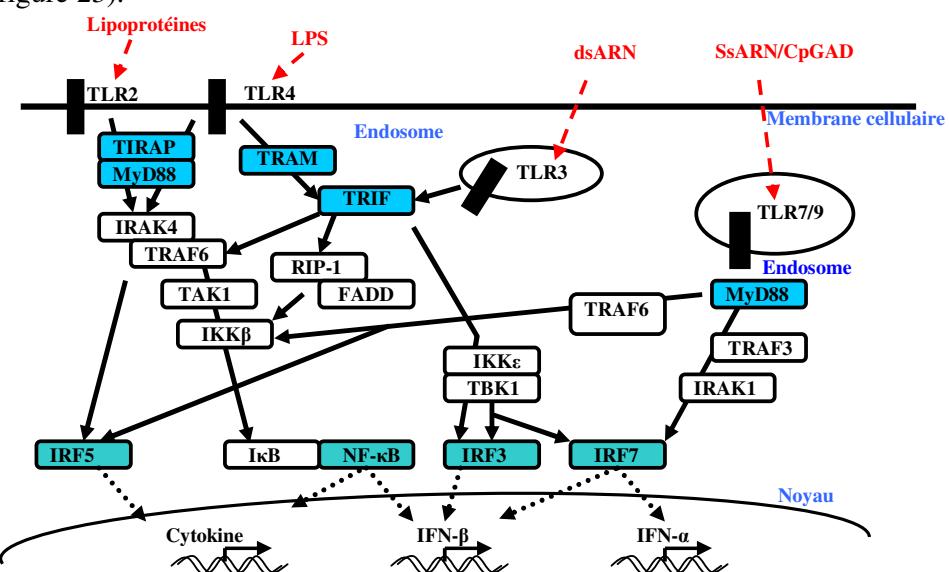
*Les protéines de surface et facteurs de virulence de *S. aureus* interagissent avec différents récepteurs des cellules épithéliales ou endothéliales ou des monocytes ou macrophages ou des neutrophiles ou des lymphocytes. Ces interactions entraînent une activation de la voie NF-κB d'où la sécrétion de cytokines qui vont moduler le comportement cellulaire et notamment induire une inflammation.*

## I. Les Toll Like Récepteurs (TLR) et leurs voies de signalisation.

Les Toll Like Récepteurs (TLR) sont impliqués à la fois dans les réponses immunitaires adaptative et innée. Ils sont capables de reconnaître les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) à la surface des pathogènes. La famille des gènes des TLR et leurs voies de signalisation sont très conservées chez les invertébrés et les vertébrés.

Dix homologues de TLR ont été identifiés chez l'Homme : TLR 1 à 10. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont localisés à la membrane plasmique des cellules alors que TLR3, TLR7 et TLR9 sont intracellulaires (Takeda *et al.*, 2005). En ce qui concerne les TLR transmembranaires, leur domaine extracellulaire comporte une structure répétitive riche en leucine impliquée dans la reconnaissance du ligand. Leur domaine intracellulaire est en grande partie identique à ceux de la famille du récepteur à l'IL-1, il est alors appelé domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor) et il est essentiel pour la transduction du signal.

Les ligands des TLR peuvent être classés en trois catégories qui sont les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Ces différents ligands vont activer des voies de signalisation conduisant à la translocation de différents facteurs de transcription et l'activation de gènes cibles (figure 23).



**Figure 23 : Voies de signalisation des TLR** (d'après Kaisho *et al.*, 2006)

Les TLRs activent les voies de signalisation via les adaptateurs contenant le domaine TIR (en bleu). TLR2 et 4 activent la voie dépendante de MyD88 qui est également dépendante de TIRAP. La voie du TLR9 est dépendante de MyD88. TLR 3 et 4 activent des voies indépendantes de MyD88 et dépendantes de TRIF. Toutes ces voies activent la translocation de différents facteurs de transcription (en vert) et l'activation de différents gènes cibles.

Greene *et al.*, ont plus spécifiquement étudié la répartition des TLRs au niveau des lignées de cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF. Ils ont ainsi démontré la présence des TLR1 à 5 et TLR 9 à la surface des cellules épithéliales CF et non-CF, trachéales et bronchiques. Muir *et al.*, ont rapporté des résultats similaires sur cellules primaires CF isolées de polyypes nasaux et sur 16HBE14<sub>0</sub><sup>-</sup> (Muir *et al.*, 2004) alors que Guillot *et al.*, ont rapporté que TLR4 n'est pas exprimé par les lignées cellulaires BEAS-2B et A549 (Guillot *et al.*, 2005) ce qui suggère une hétérogénéité d'expression entre les différentes lignées de cellules épithéliales respiratoires. Greene *et al.*, ont observé la présence d'ARNm de TLR6 dans toutes les lignées cellulaires étudiées (CFTE29<sub>0</sub><sup>-</sup>, CFBE41<sub>0</sub><sup>-</sup>, 16HBE14<sub>0</sub><sup>-</sup>) sans pouvoir détecter l'expression de la protéine TLR6 (Greene *et al.*, 2005).

### ***I.1. Les Toll Like Récepteurs impliqués dans la reconnaissance de *S. aureus****

TLR2 est le récepteur majoritairement impliqué dans la reconnaissance de *S. aureus*. Cette reconnaissance se fait essentiellement *via* l'acide lipotéichoïque (Yoshimura *et al.*, 1999).

TLR2 est une protéine transmembranaire de type I possédant un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Son domaine N terminal localisé dans la partie extracellulaire est composé de motifs riches en leucine (LRR pour Leucin-Rich Repeat). L'intégrité du domaine extracellulaire est nécessaire pour une réponse complète au peptidoglycane de *S. aureus*. Après stimulation extracellulaire, le domaine intracellulaire (le domaine TIR) s'associe à une protéine adaptatrice qui va activer une succession de protéines signals et cette cascade d'activation va entraîner la transduction du signal.

TLR2 est capable de reconnaître de nombreux ligands grâce à sa coopération, *via* la formation d'hétérodimères fonctionnels, avec TLR1 et/ou TLR6. TLR6, associé à TLR2, participe à la reconnaissance de *S. aureus* (Ozinsky *et al.*, 2000).

### ***I.2. Les voies de signalisation activées par TLR2***

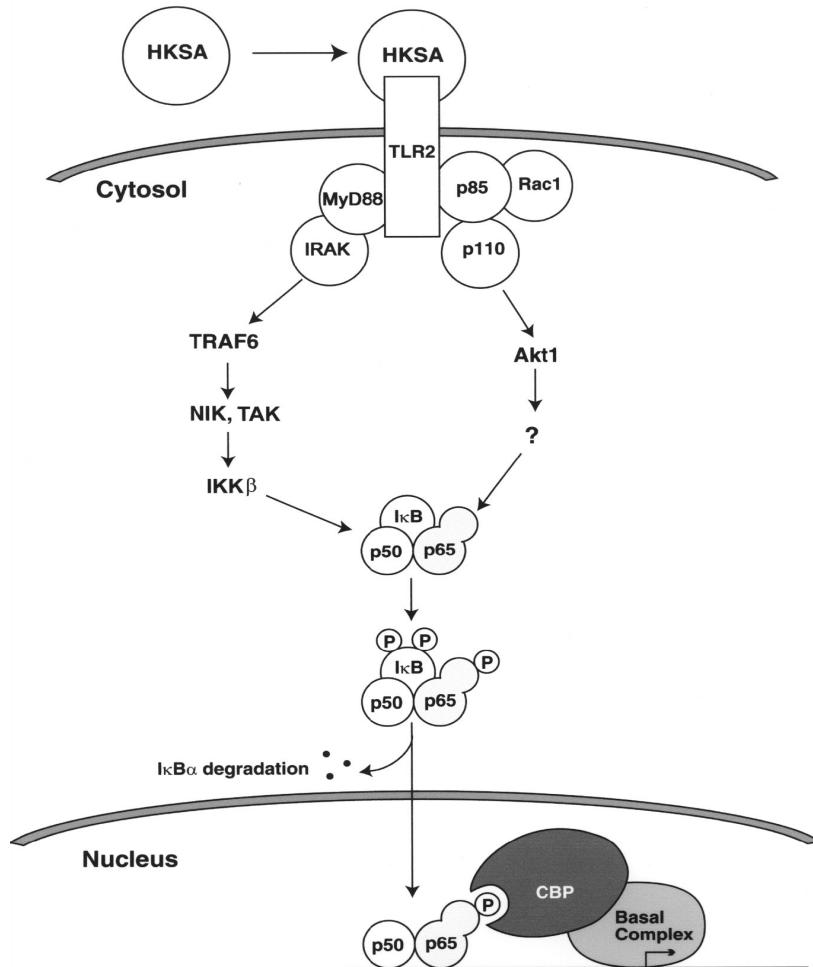
Les voies de signalisation activées par TLR2 sont médiées par les adaptateurs MyD88 (protéine de Différentiation du Myéloïde) et TIRAP (Protéine Associée à TIR) qui régulent la voie de signalisation NF-κB. C'est à partir de ces adaptateurs qu'une cascade d'évènements impliquant différents médiateurs tels que IRAK (Kinase Associée à l'IL-1R), TRAF6 (Facteur Associé au Récepteur TNF 6), TAK1 (Kinase Activée par le Transforming growth factor) et IKK (Kinases IkB) va être activée (Wang *et al.*, 2001).

MyD88 possède un domaine TIR à son extrémité C terminale qui va interagir avec le domaine TIR de TLR2. L'activation de TLR2 induit la dimérisation des domaines TIR de TLR2 et MyD88 qui vont se lier. TIRAP possède également un domaine TIR à son extrémité C terminale qui interagit directement avec le domaine TIR de TLR2. Greene *et al.*, ont montré que  $\Delta$ MyD88 ( $\Delta$ MyD88 contient un domaine TIR fonctionnel mais ne possède pas le domaine nécessaire à la transduction du signal) inhibe l'expression de gènes contrôlés par NF $\kappa$ B dans les cellules épithéliales respiratoires CF en réponse aux lipopeptides (Greene *et al.*, 2005).

Le CD14 est une protéine ancrée à la membrane qui n'a pas de domaine de signalisation intracellulaire. C'est un co-récepteur de TLR4 dans la reconnaissance du LPS mais également un co-récepteur de TLR2 qui interagit avec le LTA de *S. aureus* (Dziarski *et al.*, 1998). Greene *et al.*, ont montré que l'expression de CD14 par les cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF est faible mais présente (Greene *et al.*, 2005).

L'interaction du LTA de *S. aureus* avec TLR2 induit la sécrétion de différentes cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-10) par les monocytes et macrophages (Keller *et al.*, 1992). En effet, différentes expériences avec des souris déficientes pour le TLR2 ou l'anticorps monoclonal de TLR2 ont démontré que la production de cytokines telles que IL-6 et TNF- $\alpha$ , en réponse à une stimulation par le LTA, nécessite TLR2 (Michelsen *et al.*, 2001; Esen *et al.*, 2004). Greene *et al.*, ont montré que l'activation des complexes TLR2/6 et TLR2/1 induit une réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales respiratoires CF via l'expression d'IL-8 qui augmente en fonction du temps et de la quantité de lipopeptide utilisée pour la stimulation (Greene *et al.*, 2005).

L'activation de TLR2 par *S. aureus* induit le recrutement de Rac1 et PI3K au niveau du domaine cytosolique de TLR2. La cascade de signalisation composée de Rac1, PI3K et Akt permet la transactivation de la sous-unité p65 de NF $\kappa$ B indépendamment de la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  (Arbibe *et al.*, 2000) (figure 24).



**Figure 24 : Voies de signalisation induites par *S. aureus* via TLR2** (d'après Arbibe *et al.*, 2000) (HKSA : Heat Killed *S. aureus*)

*Les bactéries à Gram-positif activent TLR2 et le recrutement d'un complexe de signalisation qui initient deux voies d'activation de NF- $\kappa$ B. L'activation de RhoGTPase Rac1 induit l'association de Rac1, p85 et le domaine cytosolique de TLR2 et régule l'activation de NF- $\kappa$ B via Akt. La dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et le relargage de NF- $\kappa$ B sont indépendants de cette voie et implique la voie de signalisation IKK.*

L'interaction du peptidoglycane de *S. aureus* avec TLR2 a été largement étudiée et cette interaction aurait lieu *via* le domaine extracellulaire de TLR2. Cependant, toutes ces études ont été réalisées grâce à des préparations commerciales de peptidoglycane de *S. aureus* qui se

sont avérées être contaminées par le LTA. De nouvelles études avec du peptidoglycane hautement purifié ont montré que ce dernier n'est en fait pas reconnu par le TLR2 (Travassos *et al.*, 2004).

## **II. TNF- $\alpha$ receptor 1 (TNFR1)**

TNFR1 est un récepteur de TNF- $\alpha$  qui est largement exprimé par les cellules épithéliales. La protéine A de *S. aureus* interagit directement avec TNFR1 et induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  par les monocytes et fibroblastes (Tufano *et al.*, 1991; Perfetto *et al.*, 2003). L'administration intraveineuse de *S. aureus* déficient pour la protéine A à des souris, provoque une plus faible mortalité que chez les souches sauvages (Palmqvist *et al.*, 2002). L'activation de TNFR1 des cellules épithéliales respiratoires (1HAE<sub>0</sub><sup>-</sup> et 16HBE) par la protéine A induit les mêmes voies de signalisation que le TNF- $\alpha$  c'est-à-dire la mobilisation et le clivage de TNFR1 dans le compartiment extracellulaire ainsi que la production d'IL-8 et le recrutement de PMN *via* l'activation de NF- $\kappa$ B (Gomez *et al.*, 2004). Le clivage de TNFR1 a des conséquences anti-inflammatoires en empêchant de futures signalisations *via* ce récepteur et la neutralisation de TNF- $\alpha$  libre.

Levine *et al.*, ont montré que le protéasome joue un rôle dans la régulation de l'expression de TNFR1 puisqu'une inhibition de ce dernier induit le clivage du domaine extracellulaire de TNFR1 des cellules épithéliales respiratoires NCI-H292 et A549 ainsi qu'une réduction du taux de protéine TNFR1 intracellulaire et du taux de TNFR1 à la surface cellulaire (Levine *et al.*, 2005).

## **III. Les protéines Nod**

Les Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein (Nod) ont un rôle dans la réponse de l'immunité innée en régulant l'induction de cytokines (par l'activation de NF- $\kappa$ B) initiée par des ligands bactériens *via* une signalisation indépendante des TLR. Ces protéines sont cytoplasmiques et au nombre de deux : Nod1 et Nod2. Nod1, exprimé de façon ubiquitaire, est principalement impliqué dans la reconnaissance des bactéries à Gram négatif et son ligand est un fragment de peptidoglycane (Girardin *et al.*, 2003a). Nod2 est principalement exprimé par les monocytes et macrophages. Cette protéine reconnaît les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif *via* leur motif qui est commun entre les deux classes bactériennes (Muramyl DiPeptide : MDP) (Girardin *et al.*, 2003b). Le motif MDP peut

induire la production de TNF- $\alpha$  indépendamment du CD14 ou TLR2 ce qui suggère qu'il est reconnu par Nod2 (Vidal *et al.*, 2001). Nod2 participe donc à la réponse immunitaire innée intracellulaire. *S. aureus* est classiquement considéré comme pathogène extracellulaire, il faut donc une lyse des bactéries afin de provoquer le relargage de MDP. Le MDP est alors internalisé dans les cellules phagocytaires et peut activer Nod2. Nod2 peut interagir avec RIP2 (Receptor Interacting Protein 2) ou TLR2.

Inohara *et al.*, ont observé la présence de Nod1 dans de nombreux tissus tels que les poumons et Uehara *et al.*, ont observé l'activation de Nod1 par des fragments de peptidoglycane dans de nombreux types de cellules épithéliales (du tractus oro-pharyngé, du colon, de l'œsophage et du cerveau) et des monocytes mais très peu d'études de Nod1 et Nod2 dans les cellules épithéliales respiratoires humaines ont été réalisées (Inohara *et al.*, 1999; Uehara *et al.*, 2006).

#### **IV. Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane**

Les Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) ont été isolées pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*. Leur nom provient du fait qu'elles sont capables d'interagir avec le peptidoglycane avec une forte affinité. Elles sont impliquées dans la résistance aux bactéries à Gram-positif (Michel *et al.*, 2001). Les PGRPs sont conservées des insectes aux mammifères et sont de quatre types: PGRP-S, PGRP-L, PGRP-I $\alpha$  et PGRP-I $\beta$  contenant chacune au moins trois domaines conservés de liaison au peptidoglycane (Girardin *et al.*, 2004).

PGRP-S qui est la plus étudiée est observée dans les granules des neutrophiles où elle diminue la croissance des bactéries à Gram-positif et induit leur mort intracellulaire. Elle agit sur les bactéries à Gram-positif de faible virulence et n'agit pas sur *S. aureus*. PGRP-L est la seule PGRP qui contient la séquence complète d'acides aminés conservés nécessaire pour une activité enzymatique, elle a donc une activité amidase. Elle est observée à la fois en tant que protéine transmembranaire et libre dans le sérum (Liu *et al.*, 2001). PGRP-L inactive l'activité pro-inflammatoire du peptidoglycane en dégradant sa structure. Elle a un rôle mineur dans la réponse immunitaire innée à *S. aureus* (Xu *et al.*, 2004). PGRP-I $\alpha$  et PGRP-I $\beta$  sont surtout exprimés dans les cellules épithéliales malpighiennes de l'œsophage ; les mécanismes de leur activité anti-microbienne sont mal connus.

La présence des PGRPs au niveau des cellules épithéliales respiratoires humaines n'a pas, à notre connaissance, encore été étudiée.

## CHAPITRE 6 : REONSE DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE A L'INFECTION BACTERIENNE

Le système immunitaire reconnaît la présence de pathogènes grâce à de nombreuses protéines qui se lient aux molécules sécrétées par les pathogènes ou ancrées à leur surface. Les cellules responsables de la réponse immunitaire sont les cellules B, les cellules T, les macrophages, les neutrophiles, les basophiles, les eosinophiles, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Ces cellules jouent différents rôles dans le système immunitaire et communiquent entre elles *via* les cytokines qui contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que les fonctions des cellules immunitaires. Ces cellules sont impliquées dans différents processus tels que l'inflammation.

### I. L'inflammation

La participation active des cellules épithéliales respiratoires à la signalisation pro-inflammatoire est connue (DiMango *et al.*, 1995; Bonfield *et al.*, 1995; Gomez *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2004; Machen *et al.*, 2006). Elles sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires, des cytokines régulatrices qui vont intervenir dans la balance inflammatoire, des chimiokines qui interviennent dans la réponse inflammatoire et des facteurs de croissance qui vont permettre, lors de lésions, de favoriser la régénération de l'épithélium respiratoire.

#### I.1. Les cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles de bas poids moléculaire qui sont produites en réponse à un stimulus et fonctionnent comme un messager chimique pour la régulation des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Elles sont produites par toutes les cellules impliquées dans les immunités innée et adaptative. L'activation des cellules productrices de cytokines les conduit à synthétiser et sécréter leurs cytokines. Ces cytokines, en retour, sont capables de se lier à des récepteurs spécifiques présents sur d'autres cellules du système immunitaire et d'influencer leur activité. Leur action peut donc être auto-, para- ou endocrine.

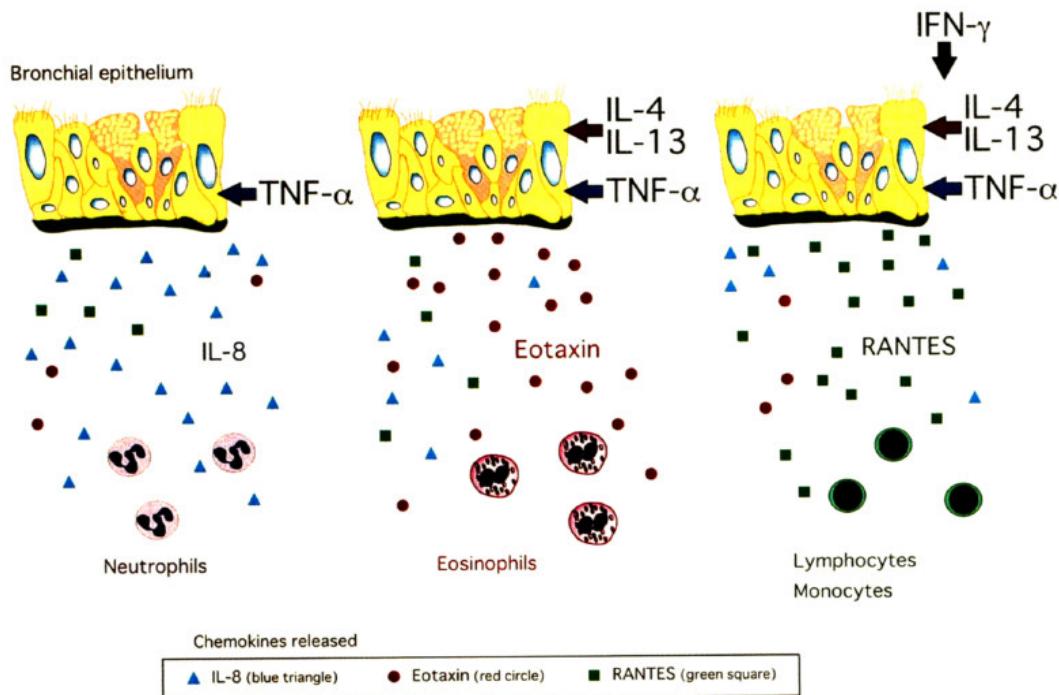
Les propriétés des cytokines sont pléiotropes puisqu'une cytokine particulière peut agir sur différents types cellulaires. Elles sont redondantes puisque différentes cytokines peuvent conduire à l'activation d'une même fonction. Elles sont également multifonctionnelles puisqu'une même cytokine peut réguler différentes fonctions.

Certaines cytokines sont antagonistes puisqu'une cytokine peut stimuler une voie de signalisation particulière alors qu'une autre cytokine va inhiber cette voie. D'autres cytokines sont au contraire synergiques.

Les cytokines ont été classifiées sur la base de leur réponse biologique en cytokines pro- et anti-inflammatoires. Elles agissent en réseaux ou cascades. Il existe plus d'une cinquantaine de cytokines réparties en sous-familles : les interleukines (IL) qui assurent les échanges d'informations entre les cellules inflammatoires, les hormones de croissance qui contrôlent la formation et l'entretien du tissu conjonctif, les interférons (IFN) qui inhibent la réplication virale dans les cellules infectées, les facteurs de croissance hématopoïétique qui stimulent la production des cellules du système sanguin et les chimiokines qui participent aux phénomènes de migration des leucocytes. Cependant cette classification est imparfaite puisque certaines cytokines ont des actions qui les classent dans plusieurs familles.

Il existe également une classification des chimiokines qui distingue quatre groupes et qui est basée sur l'arrangement des résidus cystéine en N-terminal. La majorité des chimiokines appartiennent aux classes CC ou CXC pour lesquelles les deux cystéines en N-terminal sont respectivement adjacentes ou séparées par un seul acide aminé (Zlotnik *et al.*, 2000). Les autres chimiokines appartiennent aux classes C et CX<sub>3</sub>C qui contiennent une seule cystéine en N-terminal et deux cystéines séparées par trois acides aminés respectivement (Bazan *et al.*, 1997). Les chimiokines sont alors nommées CCL, CXCL, XCL et CX3CL (L pour ligand).

Fujisawa *et al.*, ont étudié la régulation de ces chimiokines au niveau des cellules épithéliales respiratoires bronchiques. Ils ont montré que le TNF- $\alpha$  induit la production d'IL-8 par ces cellules, ce qui provoque le recrutement des neutrophiles. L'IL-4 et l'IL-13 activent la production d'éotaxine et diminue la production d'IL-8 ce qui entraîne le recrutement d'éosinophiles. L'IFN- $\gamma$  induit la production de RANTES ce qui entraîne le recrutement des lymphocytes et monocytes (figure 25).



**Figure 25: Régulation de la production des chimiokines par les cellules épithéliales respiratoires bronchiques (Fujisawa *et al.*, 2000)**

Le TNF- $\alpha$  induit la production d'IL-8 (triangles bleus) par des cellules épithéliales respiratoires bronchiques, ce qui entraîne le recrutement des neutrophiles. L'IL-4 et l'IL-13 activent la production d'éotaxine (ronds rouges) et diminue la production d'IL-8 ce qui entraîne le recrutement d'éosinophiles. L'IFN- $\gamma$  induit la production de RANTES (carrés verts) ce qui entraîne le recrutement des lymphocytes et monocytes.

Escotte *et al.*, ont étudié l'interaction des cellules épithéliales respiratoires humaines cultivées en interface air-liquide avec *S. aureus* vivant sur une période d'interaction de 3h. Cette étude montre que pendant la phase précoce d'interaction entre *S. aureus* et les cellules épithéliales respiratoires, les sécrétions d'IL-8, RANTES, d'éotaxine et d'IP-10 sont augmentées. La sécrétion d'IL-8 en basolatéral et en apical de l'épithélium, est activement impliquée dans l'attraction chimiotactique des cellules T circulantes CD4 $^{+}$  et CD8 $^{+}$  vers le microenvironnement apical de l'épithélium. Le surnageant de culture des cellules épithéliales après interaction avec *S. aureus* augmente l'expression de CXCR1 (récepteur de l'IL-8) et CXCR3 (récepteur de l'IP-10) sur les cellules T CD4 $^{+}$  et CXCR1 et CCR3 (récepteur de l'éotaxine et RANTES) sur les cellules T CD8 $^{+}$ , ce qui permet à ces cellules de migrer plus spécifiquement vers le site de l'inflammation (Escotte *et al.*, 2006). Moreilhon *et al.*, ont mis en évidence une forte augmentation de la réponse transcriptionnelle des cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-

$1\beta$ , IL-8 et IL-6 lors de l'interaction des cellules épithéliales respiratoires avec les facteurs de virulence de *S. aureus* contrairement à une faible augmentation de la réponse lors de l'interaction de ces cellules avec les bactéries vivantes. Ces résultats ont été confirmés par l'observation de l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 et d'IL-6 dans ces mêmes conditions (Moreilhon *et al.*, 2005). Tirouvanziam *et al.* ont observé un taux de sécrétion d'IL-8 huit fois supérieur dans les surnageants de xénogreffes CF comparés aux surnageants non-CF avant toute infection. Après interaction avec *P. aeruginosa*, les xénogreffes non-CF maintiennent leur organisation pseudostratifiée alors que pour les xénogreffes CF, ils observent une exfoliation des cellules après 3h d'interaction qui s'intensifie après 6h d'interaction. Cette exfoliation est en accord avec l'observation d'une migration trans-épithéliale massive de leucocytes (Tirouvanziam *et al.*, 2000). Becker *et al.*, ont étudié la sécrétion d'IL-8 et d'IL-6 par les cellules épithéliales respiratoires primaires non-CF et CF cultivées en interface air-liquide. Ils ont montré que les sécrétions d'IL-8 et IL-6 ainsi que l'activation de NF- $\kappa$ B dans ces cellules activées ou non par l'IL-1 $\beta$  est identique pour les cellules non-CF et CF. Les taux de RANTES et IL-10 ne sont pas détectables. Ces résultats sont en appARENTE contradiction avec de nombreuses données de la littérature qui mettent en évidence un état pro-inflammatoire des cellules épithéliales CF à l'état basal (Kammouni *et al.*, 1997 ; Tabary *et al.*, 1998 ; Tirouvanziam *et al.*, 2000 ; Escotte *et al.*, 2002). Selon Becker *et al.*, ces différences pourraient en partie être liées au fait que les études réalisées sur des lignées cellulaires immortalisées ne sont pas représentatives des conditions *in vivo*. Les cellules épithéliales respiratoires de surface en culture primaire cultivées en interface air-liquide sont selon ces auteurs parfaitement polarisées et différencierées et donc plus à même de représenter le comportement de l'épithélium CF natif. Bien que cette hypothèse soit plausible, il n'en reste pas moins vrai que dans le modèle de xénogreffe humanisée CF dans lequel l'épithélium de surface est pseudostratifié, il a été montré qu'en dehors de toute infection, il existe à l'état basal, une sécrétion d'IL-8 significativement supérieure à celle observée dans les xénogreffes non-CF (Escotte *et al.*, 2002 ; Tirouvanziam *et al.*, 2000). De plus, comme le souligne Becker *et al.*, il n'est pas exclu que les tissus donneurs non-CF incluent des patients présentant une inflammation bronchique. La stimulation des cellules épithéliales respiratoires primaires non-CF et CF cultivées en interface air-liquide avec le TNF- $\alpha$  ou un agoniste synthétique de TLR2 ou des doses variables (à un temps variable) de facteurs de virulence de *S. aureus* ou de *P. aeruginosa*, montre une augmentation de la sécrétion d'IL-8 par rapport aux conditions contrôles. Cette augmentation est identique pour les cellules non-CF et CF et fonction du

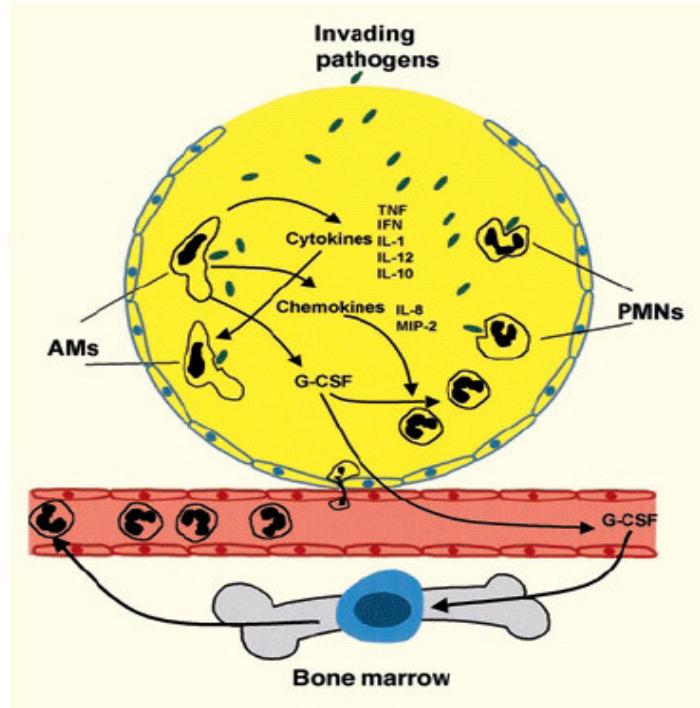
temps (une interaction de 48h entraîne une sécrétion plus importante que pour une interaction de 24h, elle même plus importante que pour une interaction de 8h) (Becker *et al.*, 2004).

### I.1.1. Les fonctions des cytokines

Les cytokines sont des médiateurs de l'inflammation précoce *via* le recrutement de leucocytes et l'induction de mouvements cellulaires et de réparations tissulaires. Elles sont impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire, notamment les cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ . Ces cytokines initient l'activation de la cascade de cytokines durant la phase précoce de la réponse inflammatoire. IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ont également un rôle important dans l'induction précoce de molécules d'adhésion sur les leucocytes et les cellules endothéliales, ce qui va permettre aux leucocytes de se localiser au site de l'inflammation.

Le maintien de l'inflammation se fait grâce au recrutement des leucocytes par chimiotactisme. Les cellules inflammatoires sont capables de reconnaître des signaux chimiotactiques et donc de se diriger vers le site de l'inflammation.

La phase finale de l'inflammation est caractérisée par la réparation des tissus et l'expression de facteurs de croissance et angiogéniques utiles à la restauration des tissus. Les cytokines ont des effets majeurs sur les cellules endothéliales et les fibroblastes, notamment TGF, FGF et les chimiokines CXC. Ces cytokines peuvent induire la prolifération de cellules endothéliales et fibroblastiques, entraînant l'angiogénèse et la production de matrice, avec la restauration de la structure et de la fonctionnalité tissulaire (figure 26) (Zhang *et al.*, 2000).



**Figure 26 : Les réponses cellulaires aux cytokines (Zhang et al., 2000)**

*Les pathogènes induisent la sécrétion de différentes cytokines et chimiokines qui vont permettre à terme de restaurer la structure et la fonctionnalité tissulaire.*

### I.1.2. Les récepteurs des cytokines

Comme pour la plupart des ligands biologiques, l'effet des cytokines est médié par des récepteurs situés à la surface des cellules. Ces récepteurs se divisent en plusieurs familles : la superfamille des immunoglobulines, les récepteurs aux tyrosines/kinases, les récepteurs de classe I, les récepteurs de classe II, les récepteurs protéines sérine/thréonine kinase (TGF $\beta$ ), les récepteurs de la famille TNF, les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs solubles. Ils sont constitués de deux sous-unités, l'une se liant à la cytokine et l'autre assurant la transduction du signal. Il existe une forte spécificité des cytokines pour leurs récepteurs. La redondance des actions des cytokines est due au fait que les récepteurs des cytokines ont une sous-unité commune à toutes les familles.

Les récepteurs faisant partie de la superfamille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCR) sont composés de 350 acides aminés avec un motif composé de sept régions hydrophobes qui forment des hélices transmembranaires et la région N-terminale est extracellulaire et la région C-terminale est intracellulaire. Il existe vingt récepteurs de chimiokines répartis en dix CCRs, huit CXCRs, un XCR1 et un CX3CR (Murphy et al.,

2000). Les chimiokines se lient à leurs récepteurs avec une affinité nanomolaire et cette liaison est généralement spécifique d'une classe. Ainsi, les CCL n'activent que les CCR par exemple. Un même récepteur pouvant lier différentes chimiokines, il existe une compétition entre ces dernières. Les récepteurs exprimés par un même type cellulaire peuvent être subdivisés en deux groupes : les récepteurs exprimés de façon constitutive et ceux dont la production est induite par des conditions d'inflammation. Escotte *et al.*, ont montré que l'interaction des cellules épithéliales respiratoires avec *S. aureus* provoque l'augmentation des récepteurs CXCR1 (récepteur de l'IL-8), CXCR3 (récepteur de l'IP-10) et CCR3 (récepteur de RANTES et éotaxine) au niveau des lymphocytes (Escotte *et al.*, 2006).

### **I.2. *Les voies de transduction du signal***

La liaison des cytokines à leurs récepteurs entraîne toute une cascade d'évènements intracellulaires, faisant intervenir de multiples voies de signalisation, parmi lesquelles figurent NF-κB, les MAP kinases et la voie JAK/STAT.

#### **I.2.1. NF-κB**

Il existe de nombreuses voies de signalisation parfaitement caractérisées mais la voie Nuclear Factor-κB est unique dans sa rapidité d'activation, ses mécanismes de régulation inhabituels et le haut degré de connaissance des structures moléculaires impliquées dans les fonctions physiologiques de ses composés.

NF-κB est trouvé dans tous les types cellulaires et il est impliqué dans l'activation d'un très grand nombre de gènes en réponse aux infections, à l'inflammation et autres situations de stress qui requièrent une rapide reprogrammation de l'expression des gènes. NF-κB est maintenu sous forme inactive par séquestration dans le cytoplasme *via* l'interaction avec les protéines inhibitrices de NF-κB (IκBs). La dégradation protéolytique de IκB est nécessaire et précède immédiatement la translocation nucléaire de NF-κB. Cette étape irréversible dans la voie de signalisation constitue un engagement dans la voie transcriptionnelle. Le signal est éventuellement stoppé par reséquestration cytoplasmique de NF-κB, ce qui dépend de la synthèse de IκBα, un processus qui requiert l'activité transcriptionnelle de NF-κB, ainsi que de l'exportation nucléaire dépendante de IκBα (Baldwin, Jr. *et al.*, 1996).

Dans sa forme active liant l'ADN, NF-κB est composé de dimères, constitués de différentes combinaisons des membres de la famille NF-κB/Rel. Cinq protéines Rel ont été identifiées

chez les mammifères : NF-κB1 (p50 et son précurseur p105), NF-κB2 (p52 et son précurseur p100), c-Rel, RelA (p65) et RelB (Siebenlist *et al.*, 1994). Toutes les protéines de cette famille contiennent une région homologue de 300 acides aminés hautement conservée : la Région Homologue Rel (RHR), composée de deux domaines immunoglobulin-like. Le domaine RHR est responsable de la dimérisation, de la liaison à l'ADN et de l'interaction avec IκB. Elle contient également une Séquence de Localisation Nucléaire (NLS). Les protéines Rel diffèrent dans leur capacité à activer la transcription, or seuls p65/RelA et c-Rel contiennent des domaines d'activation de la transcription chez les mammifères (Ghosh *et al.*, 1998).

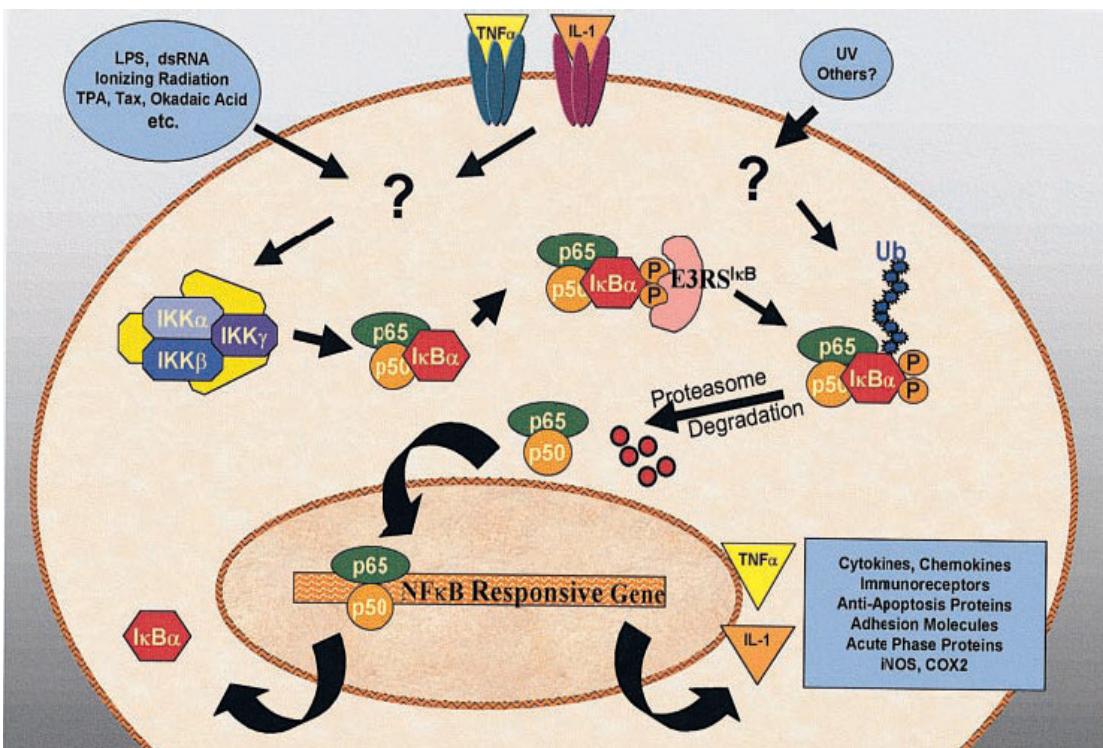
NF-κB régule la transcription d'un très grand nombre de gènes surtout impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Il est activé par un nombre important de stimuli qui incluent les bactéries, le lipopolysaccharide (LPS), les virus, les protéines virales, l'ARN double brin, les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-1, les activateurs de la prolifération des cellules B et T et les stress chimiques et physiques (Siebenlist *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1998). Fragaki *et al.*, ont montré que les facteurs de virulence de *S. aureus* induisent une activation précoce de la transcription de NF-κB ainsi qu'une augmentation de la forme phosphorylée de IκBα (P-IκBα) corrélée à une augmentation des taux d'ARNm et protéiques d'IL-6, IL-8 et TNF-α dans les cellules épithéliales respiratoires humaines (Fragaki *et al.*, 2006). De même, Wu *et al.*, ont montré que les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* activent NF-κB et la dégradation de IκBα, entraînant une sécrétion d'IL-8 dans les cellules épithéliales respiratoires humaines (Wu *et al.*, 2005). Le TNF-α et IL-1 induisent une dégradation rapide des IκBs (surtout IκBα) en quelques minutes. Cette dégradation se fait en plusieurs étapes (figure 27) et commence par la phosphorylation, par les kinases IκB (IKK), de IκB ce qui va tout d'abord permettre sa reconnaissance par un complexe protéique puis par la polyubiquitination de IκBα (Yaron *et al.*, 1998). Cette modification entraîne le ciblage de IκBα vers le protéasome et sa dégradation rapide par ce dernier. La dégradation de son inhibiteur expose le NLS de NF-κB induisant sa liaison aux kariophérines et sa translocation dans le noyau.

TNF-α et IL-1 sont des médiateurs importants de l'inflammation et des activateurs potentiels de NF-κB, exerçant leurs effets à travers des interactions avec des récepteurs situés à la surface des cellules. TNF-α a deux récepteurs distincts : TNFR1 et TNFR2 mais dans la plupart des cellules l'activation de NF-κB à lieu via TNFR1 (Orlinick *et al.*, 1998). TNFR1 interagit avec la protéine TNFR1-Associated Death Domain (TRADD) qui fonctionne comme un adaptateur pour le recrutement d'autres protéines telles que la Receptor-Interacting Protein

(RIP), une kinase séro-thréonine et TNFR-Associated Factor 2 (TRAF2) (Vandenabeele *et al.*, 1995).

De même, des deux récepteurs connus de l'IL-1, seul IL-1R1 participe à la signalisation cellulaire de NF-κB (Auron *et al.*, 1998). La signalisation *via* l'IL-1R1 nécessite son association avec la Membrane-Spanning Accessory Protein (ACP) IL-1RACP. Ce complexe, en coopération avec MyD88 recrute la séro/thréonine IL-1R-Activated Kinase (IRAK) (Wesche *et al.*, 1997). IRAK participe ensuite au recrutement de la protéine TRAF6.

Les protéines TRAF vont ensuite activer les IKK ce qui entraîne l'activation de NF-κB.



**Figure 27 : Modèle d'activation de NF-κB** (Karin *et al.*, 2000)

Représentation schématique de l'activation de NF-κB par différents stimuli tels que les cytokines proinflammatoire TNF- $\alpha$  et IL-1. Certains gènes cibles de NF-κB codent des médiateurs inflammatoires tels que TNF- $\alpha$ , IL-1 et certaines chimiokines qui peuvent entraîner le recrutement de cellules nécessaires à la réponse inflammatoire.

NF-κB pourrait également activer de façon synergique la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8 *via* sa coopération avec d'autres facteurs de transcription tels que NF-IL6 (qui se lie au promoteur de l'IL-6). Les promoteurs de certains autres gènes impliqués dans l'inflammation contiennent aussi un site de liaison à NF-IL6 et NF-κB. La coopération entre NF-κB et NF-IL6 est donc d'une grande importance dans

l'activation synergique de la transcription de ces gènes pro-inflammatoires (Matsusaka *et al.*, 1993; Kunsch *et al.*, 1994). NF-κB fonctionne également en coopération avec le facteur de transcription AP-1 (Stein *et al.*, 1993).

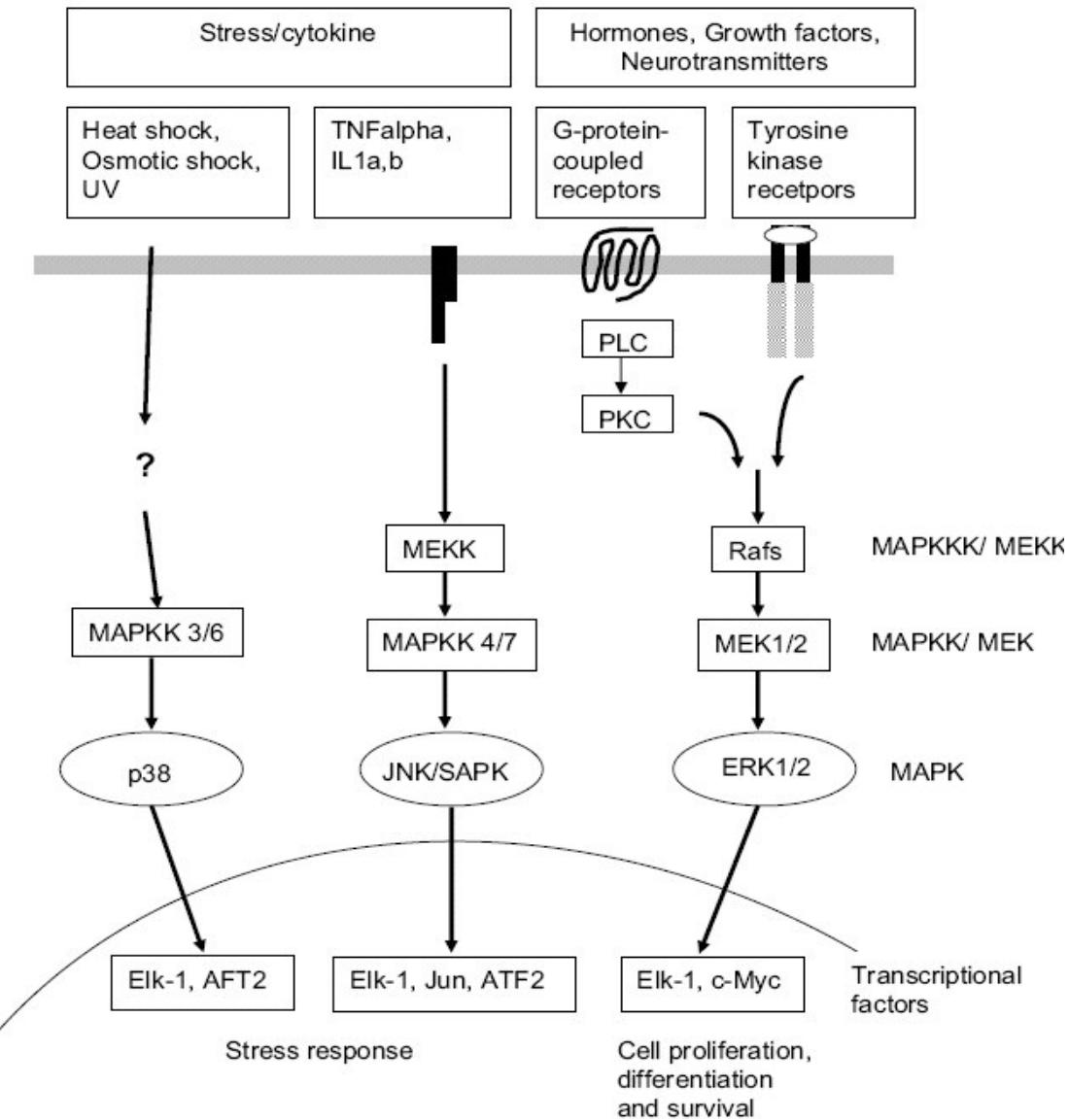
### I.2.2. Les MAPKs

Les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) correspondent à un groupe de kinases à sérine/thréonine qui sont activées en réponse à divers stimuli extracellulaires et qui vont médier la transduction du signal de la surface cellulaire au noyau (figure 28). Trois familles de MAPKs ont été caractérisées : Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK1 et ERK2), *c-Jun* terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase (JNK/SAPK) et p38. D'autres membres de la famille des MAPKs tels que ERK3, 4 et 5, quatre kinases « p38-like » et p 57 ont été identifiés mais leur rôle n'est pas encore bien compris (Johnson *et al.*, 2002). La cascade des MAPKs est activée *via* deux classes distinctes de récepteurs : les Récepteurs Tyrosine Kinase (RTKs) et les Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCRs). Le signal transmis par cette cascade entraîne l'activation de diverses molécules qui régulent la communication entre les cellules, la croissance, la survie et la différenciation cellulaire.

ERK1 (p44 MAPK) et ERK2 (p42 MAPK) sont stimulées par des stimuli mitogéniques et forment le groupe le plus étudié alors que JNK/SAPK et p38 sont activés en réponse à des stress tels que les chocs osmotiques, les cytokines, les inhibiteurs de synthèse protéique, les anti-oxidants, les UV et les agents provoquant des dommages au niveau de l'ADN (Garrington *et al.*, 1999). Les MAPKs sont directement régulées par les MAPK Kinases (MAPKKs) qui activent les MAPKs par phosphorylation des résidus tyrosine et thréonine. Au moins sept MAPKKs différentes ont été caractérisées : MAPK/ERK Kinase 1 et 2 (MEK 1 et 2) qui activent spécifiquement les ERKs, MKK3 et 6 qui activent spécifiquement p38, MKK5 qui stimule la phosphorylation de ERK5, et MKK4 et 7 qui activent les JNK (Fanger *et al.*, 1999).

Les MAPKKs sont activées par les MAPKKS Kinases (MAPKKKs) *via* la phosphorylation des résidus sérine et thréonine. Les MAPKKKs sont Raf-1, A-Raf, B-Raf, MAPK/ERK kinases 1-4 (MEKK1-4), Apoptosis Stimulating Kinase-1 (ASK-1) et Mixed Lineage Kinase-3 (MLK-3) (Robinson *et al.*, 1997). Les MAPKKKs peuvent être activées par les MAPKKKKs Kinases (MAPKKKKs). En plus de ces kinases, des protéines de faible poids moléculaire capables de lier le GTP (LMWG) régulent l'activité des MAPKKKs et MAPKKKKs. La

famille des protéines LMWG comprend les familles Ras et Rho. Les MAPKs activées phosphorylent un grand nombre de protéines cytoplasmiques et nucléaires.



**Figure 28 : Voie de signalisation des MAPKs (Choi *et al.*, 2003)**

Cette représentation schématique des voies de signalisation des MAPK met en évidence trois voies principales qui sont les voies p38, JNK/SAPK et ERK1/2. Ces voies sont activées par de nombreux facteurs tels que le stress, les cytokines, les hormones, les facteurs de croissance et les neurotransmetteurs.

Dans le laboratoire, Fragaki *et al.*, ont montré que les facteurs de virulence de *S. aureus* induisent une activation précoce de P-ERK1/ERK2 et P-JNK corrélées avec une augmentation des taux d'ARNm et protéiques d'IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  dans les cellules épithéliales

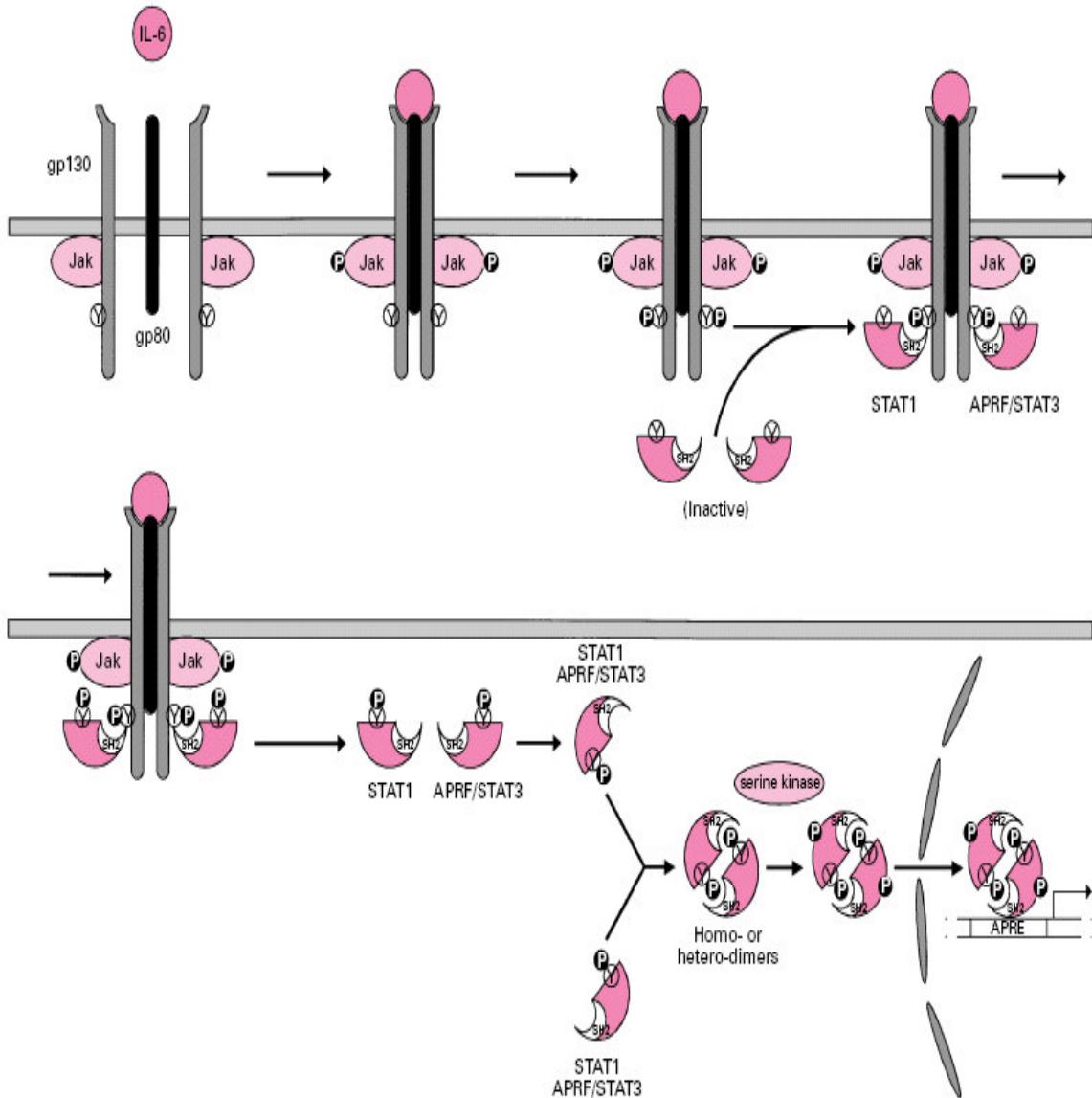
respiratoires humaines (Fragaki *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite par *S. aureus* stimule les cascades des p38 MAPKs et des ERK1/2s des cellules épithéliales, ce qui active également NF-κB et stimule la production d'IL-8. L'ensemble de cette cascade de signalisation permet l'initiation de la réponse inflammatoire (Ratner *et al.*, 2001).

### I.2.3. JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est une voie qui permet la transduction du signal généré par les cytokines. Elle joue un rôle important dans les réponses immunitaires innée et acquise. La famille des protéines Janus Kinase (JAK) qui sont des tyrosines kinases de 120 à 130 kDa, est composée de quatre membres qui sont Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Ces kinases vont sélectivement phosphoryler les Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT), ce qui va activer ces derniers. La famille des STATs se divise en sept protéines qui sont Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b et Stat6.

Les STATs transduisent le signal de la sous-famille hematopoïétique des cytokines et leurs récepteurs. La signalisation *via* cette voie est initiée lorsqu'une cytokine (comme par exemple l'IL-6 (figure 29) se lie à son récepteur. Ceci entraîne une dimérisation du récepteur ainsi que des changements conformationnels au niveau de sa portion cytoplasmique, initialisant l'activation des JAKs qui sont associés à ces récepteurs. Les JAKs vont alors médier la phosphorylation au niveau d'une tyrosine spécifique du récepteur, qui va ensuite servir de site d'ancre aux STATs et autres molécules de signalisation. Une fois recruté au niveau du récepteur, les STATs sont phosphorylés par les JAKs au niveau d'une seule tyrosine. Les STATs activés vont alors se dissocier du récepteur, dimériser, transloquer dans le noyau et se lier aux membres de la famille Gamma Activated Site (GAS) du promoteur (Kisseleva *et al.*, 2002).

De même que l'IL-6 induit une activation de la voie des JAK/STAT, Kulka *et al.* ont montré que l'INFγ induit une diminution de la régulation de CFTR dans les cellules épithéliales respiratoires humaines *via* la voie des JAK/STAT (Kulka *et al.*, 2005).



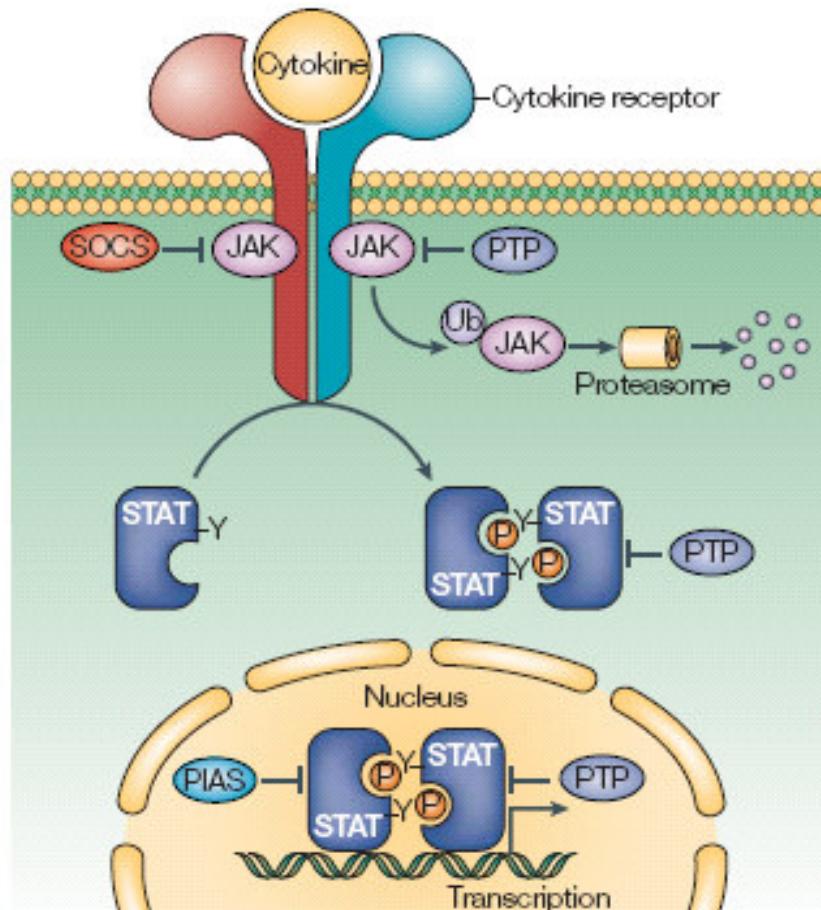
**Figure 29 : Signalisation par l'IL-6 via la voie gp130/JAK/STAT (Heinrich *et al.*, 1998)**

L'IL-6 conduit à la dimérisation de la molécule gp130. Les molécules jak sont alors activées et phosphorylent la partie cytoplasmique de gp130 ce qui crée des sites de liaison pour les molécules STAT1 et STAT3. Les STATs sont alors phosphorylées et vont être transloquées dans le noyau où elles vont réguler la transcription de différents gènes.

De nombreux systèmes de régulation existent afin de moduler cette voie de signalisation. Ainsi, des régulations négatives ou positives déterminent le taux de transduction du signal STAT.

Différents mécanismes induisent une régulation négative. La génération de récepteurs solubles limite la quantité de ligand disponible en agissant comme compétiteurs.

L'endocytose de ces récepteurs limite également l'activation de la voie STAT. La dégradation de certains récepteurs par le protéosome *via* l'ubiquitination ainsi que la déphosphorylation de JAK par les phosphatases ou la génération de formes tronquées de STATs, régulent également la voie STAT de façon négative. En plus de ces mécanismes, il existe une famille de gènes suppresseurs de la signalisation des cytokines (Suppressors Of Cytokine Signaling (SOCS)) qui antagonise directement l'activation de STAT par un « feedback », ainsi qu'une famille de protéines qui interagit avec STAT telles que les Protein Inhibitor of Activated STATs (PIAS) (figure 30) (Shuai *et al.*, 2000; Kile *et al.*, 2001).



**Figure 30 : Les différents mécanismes d'inhibition de la voie JAK/STAT** (Shuai *et al.*, 2000)

*La voie JAK/STAT est régulée à différents niveaux : au niveau du récepteur des cytokines, la voie JAK/STAT peut être inhibée par les protéines SOCS ou PTP ; au niveau cytoplasmique, la voie JAK/STAT peut être inhibée par les protéines PTP et au niveau nucléaire la voie JAK/STAT peut être inhibée par les protéines PIAS et PTP.*

D'autres mécanismes induisent une régulation positive comme la phosphorylation au niveau d'une sérine ou l'interaction des STATs avec d'autres facteurs de transcription (NF-κB par exemple) ou d'autres protéines cellulaires (STAM qui est une protéine se liant à JAK par exemple).

## **II. Modèles d'étude *in vivo* de la mucoviscidose**

Les modèles d'étude de l'épithélium respiratoire de surface *in vitro*, en culture liquide-liquide ou air-liquide, constituent les modèles les plus utilisés, cependant, les modèles *in vivo* restent les modèles les plus proches des conditions physiologiques et physiopathologiques.

### ***II.1. Modèles d'infections *in vivo* dans la mucoviscidose***

Le modèle murin a été largement utilisé dans les études des infections respiratoires dans la mucoviscidose. Différentes mutations du gène *Cftr* ont ainsi été étudiées dans ce modèle, à l'état basal ou en interaction avec *P. aeruginosa* ou, plus rarement avec *S. aureus*. Très peu de mutations du gène *Cftr* entraînent avant infection, les modifications pulmonaires observées chez l'Homme. Ces études sont regroupées dans le tableau 3.

Référence :	Génotype des souris CF	Bactérie	Résultats observés
Heeckeren et al. 1997 J Clin Invest	S489X <sup>-/-</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	Forte réponse inflammatoire puis 82% de mortalité pour les souris CF contre une plus faible réponse inflammatoire puis 23% de mortalité pour les souris normales
Stotland et al. 2000 Pediatr Pulmonol	Cftr (m1UNC <sup>-/-</sup> )	<i>P. aeruginosa</i>	Réponse inflammatoire élevée puis mortalité élevée
McMorran et al. 2001 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	G551D <sup>-/-</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	Diminution de la clairance bactérienne, perte de poids, forte réponse inflammatoire
Coleman et al. 2003 Proc Natl Acad Sci USA	Cftr <sup>-/-</sup>  Surexpression de Cftr dans les souris de type sauvage	<i>P. aeruginosa</i>	Colonisation chronique, diminution de la clairance bactérienne  Augmentation de la clairance bactérienne
Van Heeckeren et al. 2004 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	R117H S489X Y122X ΔF508	<i>P. aeruginosa</i> (billes d'agarose)	Pas de différence selon la mutation, forte inflammation dans les lavages bronchoalvéolaires
Hoffmann et al. 2005 Infect Immun	Cftr (tmlUnc <sup>-/-</sup> )	<i>P. aeruginosa</i> (souche clinique mucoïde)	Formation de biofilms par la souche mucoïde, et présence de PMN dans les alvéoles
Saadane et al. 2006 J Allergy Clin Immunol	Cftr <sup>-/-</sup>	<i>P. aeruginosa</i> (infection aigüe)	Forte concentration de cytokines pro-inflammatoires et de PMN dans les lavages bronchoalvéolaires, activation excessive de NF-κB
Davidson et al. 1995 Nat Genet	Cftrm1HGU	<i>S. aureus</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Diminution de la clairance bactérienne, anomalies sévères bronchiques et pulmonaires
Davidson et al. 2004 Pathobiology	Cftr <sup>-/+</sup>	<i>S. aureus</i> (souche clinique CF)	Diminution de la clairance bactérienne, réponse inflammatoire anormale

**Tableau 3 : Principales études d'infections respiratoires à *P. aeruginosa* et à *S. aureus* dans le modèle murin CF**

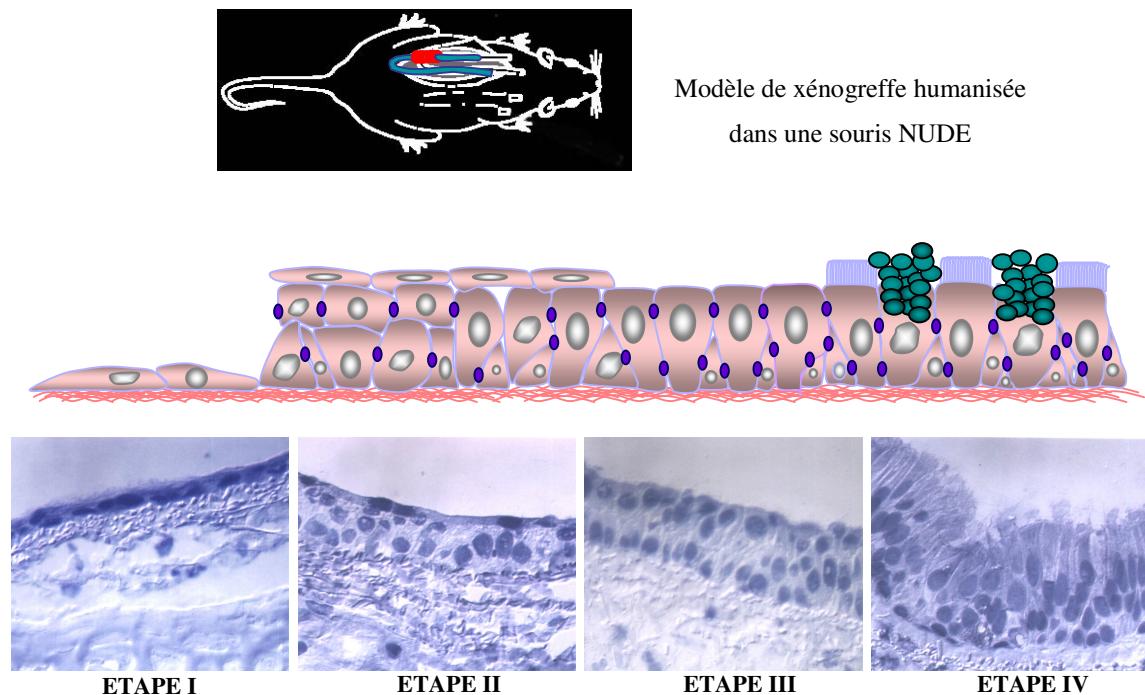
Toutes ces études montrent clairement que les résultats obtenus lors d'infections de l'épithélium respiratoire ne diffèrent pas considérablement selon le type de mutation du gène *Cftr* et le type de bactérie (*P. aeruginosa* ou *S. aureus*) impliquées. La plupart des études sur l'infection de l'appareil respiratoire des souris CF concernent l'infection par *P. aeruginosa*, peu d'études concernant *S. aureus* ont été réalisées (Davidson *et al.*, 1995 ; Davidson *et al.*,

2004). Les résultats obtenus lors de ces études montrent une diminution de la clairance bactérienne qui peut être associée à une colonisation chronique. Ces résultats montrent également une forte réponse inflammatoire, révélée par la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2 et LTB4 (Van Heeckeren *et al.*, 2004) ou l'activation de NF- $\kappa$ B (Saadane *et al.*, 2006) suivie d'une mortalité plus élevée chez les souris CF que chez les souris de type sauvage.

## ***II.2. Modèle *in vivo* de xénogreffe bronchique humanisée***

Le modèle *in vivo* utilisé au sein de notre laboratoire est le modèle de xénogreffe bronchique humanisée en souris nude : Les trachées de rats mâle Wistar sont prélevées et dénudées de leur épithélium de surface. Un tube de polyéthylène stérile est inséré aux deux extrémités puis des cellules épithéliales respiratoires humaines sont ensemencées. Ces trachées sont ensuite implantées en sous-cutané sur le dos de souris nude (deux trachées par souris). Ces souris sont alors utilisées après l'âge de 8 semaines. Les xénogreffes sont rincées deux fois par semaine afin d'éliminer les débris cellulaires. Ce modèle *in vivo* a été décrit par Dupuit *et al.* comme modèle de régénération en quatre étapes (figure 31) (Dupuit *et al.*, 2000). L'étape I est une étape de migration et de prolifération cellulaire. Trois à cinq jours après l'implantation, la xénogreffe est partiellement repeuplée avec des cellules aplatis et non-ciliées générées par les cellules épithéliales respiratoires qui adhèrent à la lame basale dénudée rapidement après ensemencement. Ces cellules ont une morphologie similaire à celle des cellules migratoires identifiées dans l'épithélium respiratoire en phase de réparation après lésion, c'est-à-dire présentant peu ou pas de microvillosités au niveau de leur surface apicale et présentant des expansions cytoplasmiques (lamellipodes) orientés vers la lame basale. L'étape II est une étape de prolifération cellulaire et de stratification. Après une à trois semaines, toute la surface de la trachée de rat est recouverte par un épithélium malpighien composé de multiples couches de cellules épithéliales dont des cellules cuboïdes et des cellules aplatis en superficie. Une lame basale nouvellement synthétisée et discontinue ainsi que quelques cellules basales sont observées. De nombreux contacts intercellulaires se font *via* des protusions cytoplasmiques et des desmosomes. L'étape III est une étape de différenciation cellulaire. Après deux à quatre semaines, on observe un épithélium dont la structure est hétérogène (épithélium formé de cellules de type malpighien et de cellules cylindrique). Les cellules deviennent progressivement cylindriques et de rares cellules ciliées peuvent être observées. Les protéines CFTR et ZO-1 sont observées de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules superficielles. De nombreux desmosomes sont observés. L'étape IV est une étape

de différentiation complète. Après quatre à cinq semaines, la trachée de rat est entièrement recouverte par un épithélium cylindrique pseudostratifié, les cellules observées sont similaires à celles observées au niveau d'un épithélium humain normal respiratoire de surface. Les cellules ciliées sont nombreuses et riches en mitochondries. La protéine CFTR est détectée à la membrane apicale de ces cellules et la protéine ZO-1 est détectée au niveau des cellules cylindriques superficielles. Des desmosomes et des jonctions serrées sont observés entre les cellules superficielles adjacentes.



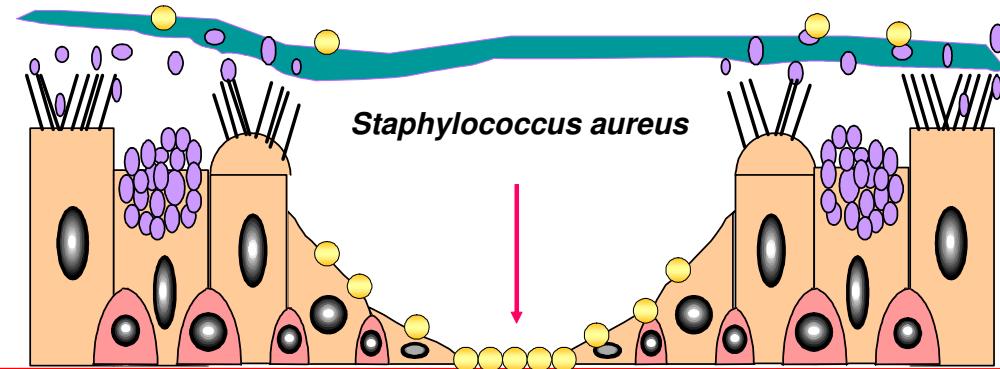
**Figure 31 : Régénération de l'épithélium respiratoire bronchique humain dans le modèle de xénogreffe** (Dupuit *et al.*, 2000)

*Etape I : 3 à 5 jours après l'implantation, la xénogreffe est partiellement repeuplée avec des cellules aplatis et non ciliées. Etape II : après 1 à 2 semaines, toute la surface de la trachée de rat est recouverte par de multiples couches cellulaires. Etape III : après 2 à 4 semaines, les cellules deviennent progressivement cylindriques et on observe de rares cellules ciliées. Etape IV : après 4 à 5 semaines, on observe un épithélium pseudostratifié similaire à un épithélium respiratoire humain normal.*

### *II.3. Lésions et remodelage de l'épithélium respiratoire après infection bactérienne : étude dans les xénogreffes bronchiques humanisées*

L'infection bactérienne, même si elle est reconnue et modulée par le système immunitaire, peut perturber l'intégrité de la barrière épithéliale. Une lésion aiguë de l'épithélium de surface

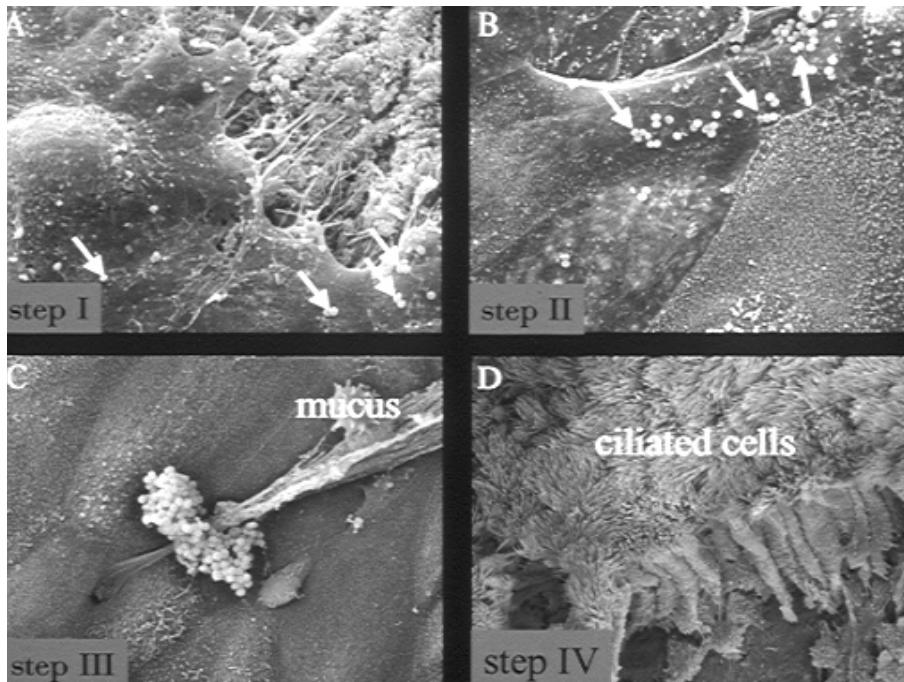
bronchique entraîne une succession d'évènements cellulaires allant d'une perte de l'imperméabilité de la surface épithéliale jusqu'à une dénudation incomplète (seules les cellules basales restant attachées à la lame basale) ou complète (mise à nue de la membrane basale) de l'épithélium de surface (figure 32).



**Figure 32 : Lésion de l'épithélium respiratoire provoquée par *S. aureus***

*S. aureus* peut provoquer des lésions telles que la desquamation des cellules de l'épithélium respiratoire qui aboutissent à la mise à nue partielle de la membrane basale.

Il existe un phénomène de trans-différenciation qui peut également intervenir (Park *et al.*, 2006). Les cellules ciliées n'ont pas la capacité de se diviser mais peuvent rapidement acquérir un phénotype malpighien qui représente un phénomène de « protection » avant d'évoluer vers un phénotype différencié. Ce phénomène de remodelage de l'épithélium de surface est parfaitement représentatif de la « plasticité » de l'épithélium bronchique. Le processus de re-épithérialisation par les cellules épithéliales respiratoires après une lésion, implique quatre étapes principales mises en évidence par Mongodin *et al.* (Mongodin *et al.*, 2002) dans le modèle de xénogreffe de trachées humanisées (figure 33). Le premier processus est la migration des cellules adjacentes à la lésion qui propulsent tout d'abord leurs lamellipodes vers la lésion et les bactéries telles que *S. aureus* peuvent interagir fortement avec ces cellules en migration (étape I). Pendant la migration cellulaire, un aplatissement progressif des microvillosités est observé au niveau des lamellipodes du à une polymérisation directionnelle des filaments d'actine. Le second processus de réparation est caractérisé par la migration de groupes cellulaires provenant de l'épithélium situé plus en amont de la lésion (Zahm *et al.*, 1991) et les bactéries n'adhèrent qu'aux cellules à phénotype migratoire (étape II). Puis ces cellules sécrètent du mucus qui va piéger les bactéries telles que *S. aureus* (étape III). Enfin, lorsque l'épithélium régénéré est différencié, aucune bactérie n'est observée à la surface des cellules ciliées (étape IV) (Mongodin *et al.*, 2002).



**Figure 33 : Interaction de *S. aureus* avec l'épithélium respiratoire au cours des étapes de régénération** (d'après Mongodin *et al.*, 2002)

*Adhérence de *S. aureus* lors du processus de régénération et de maturation de l'épithélium respiratoire humain après 3 jours d'implantation (A), 5 jours d'implantation (B), 15 jours d'implantation (C) et 30 jours d'implantation (D) de la xénogreffe dans la souris.*

Au cours de ce remodelage, les protéines du cytosquelette, les composants de la matrice extracellulaire, les récepteurs de type intégrines et les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs, interviennent pendant la phase initiale d'étalement et de migration cellulaire. Il existe également un rôle spécifique des MMPs, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance dans la re-différenciation de l'épithélium qui suit la fermeture de la lésion et la reconstitution complète de l'épithélium respiratoire (Puchelle *et al.*, 2006).

Les lésions provoquées par l'infection bactérienne, ainsi que le remodelage, favorisent l'adhérence bactérienne de différentes bactéries comme *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Dans des conditions normales, les cellules épithéliales respiratoires sont protégées par le mucus alors que ces cellules sont plus facilement accessibles aux bactéries lorsque l'épithélium est lésé ou remodelé. Les cellules desquamées ainsi que la matrice extracellulaire dénudée et ses composés tels que la fibronectine et la laminine représentent des cibles préférentielles pour l'adhérence de *P. aeruginosa* ou de *S. aureus*.

De Bentzmann *et al.*, ont montré que l'adhérence de *P. aeruginosa* est associée au phénotype migratoire des cellules épithéliales respiratoires. La susceptibilité de ces cellules à l'adhérence de *P. aeruginosa* est augmentée au cours du phénomène de réparation de la lésion. Ceci est en grande partie du à l'expression du récepteur de *P. aeruginosa*, l'Asialo Ganglioside M1 (aG<sub>M1</sub>) qui est largement exprimé au niveau des cellules épithéliales respiratoires en phase de migration. L'implication de aG<sub>M1</sub> dans l'adhérence de *P. aeruginosa* est plus importante au niveau de l'épithélium respiratoire CF que non-CF (de Bentzmann *et al.*, 1996). Mongodin *et al.* ont montré grâce au modèle de xénogreffe, que les cellules épithéliales respiratoires humaines indifférenciées représentent le site majeur d'adhérence des souches cliniques et de référence de *S. aureus*. Cette adhérence de *S. aureus* est due aux protéines se liant à la fibronectine (FnBPs) (Mongodin *et al.*, 2002). La fibronectine et son récepteur cellulaire, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , sont surexprimés au niveau apical des cellules épithéliales respiratoires humaines indifférenciées engagées dans un processus de réparation (Herard *et al.*, 1996). Ainsi, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, qui ont une forte homologie dans la nature des récepteurs épithéliaux auxquels ils se lient, sont capables d'infecter et de coloniser les cellules épithéliales respiratoires dans différents types de maladies respiratoires, qu'elles soient génétiques comme la mucoviscidose ou acquises comme la bronchopneumopathie chronique obstructive ou les bronchiolites. En effet, ces bactéries se lient spécifiquement aux épithélia respiratoires endommagés qui expriment des récepteurs néo-épithéliaux ainsi que la fibronectine nouvellement synthétisée et sécrétée (De Bentzmann *et al.*, 2000)

La mucoviscidose (CF) est une maladie génétique autosomale récessive qui est due à une mutation du gène qui code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Cette maladie est caractérisée par une inflammation respiratoire chronique et des infections bactériennes. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie commensale de l'épithélium nasal mais elle peut s'avérer être pathogène, c'est alors un des premiers pathogènes à coloniser l'appareil respiratoire des patients mucoviscidosiques. Il précède généralement la colonisation chronique de l'épithélium respiratoire par *P. aeruginosa*.

Il existe un équilibre entre les mécanismes de défense de la cellule épithéliale respiratoire et les mécanismes lésionnels induits par une bactérie comme *S. aureus*, classiquement considérée comme une bactérie extracellulaire mais qui s'est révélée capable d'adhérer aux cellules épithéliales respiratoires, de s'internaliser et d'entraîner l'apoptose et la mort cellulaire. Cependant, le rôle spécifique de *S. aureus* dans la progression de la mucoviscidose a encore été très peu étudié.

Le but de ce travail était de comprendre et d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF ou CF et *S. aureus* et en particulier d'analyser le rôle de la bactérie vivante et/ou de ses facteurs de virulence solubles après interaction avec les cellules épithéliales.

Les modèles utilisés lors de cette étude sont les cellules MM-39 (non-CF) et KM-4 (CF) qui ont été développées dans le laboratoire de Figarella C à Marseille (Kammouni *et al.*, 1999 ; Merten *et al.*, 1996) à partir de cultures primaires provenant de bronches de donneurs et receveurs au cours de transplantations bi-pulmonaires. Ces cellules ont été transformées avec une souche sauvage du virus SV40. Ces lignées ont conservé toutes les caractéristiques épithéliales et sécrétoires des cellules primaires, c'est-à-dire une sécrétion constitutive et régulée de protéines secrétées spécifiques des glandes séreuses (lysozyme, lactoferrine, défensine et SLPI).

La lignée MM-39 exprime fortement CFTR alors que la lignée KM-4, ayant été obtenues par transformation de cellules trachéales glandulaires humaines séreuses mucoviscidosiques, est homozygote pour la mutation ΔF508.

Nous avons, dans un premier temps, analysé l'interaction dynamique entre les cellules épithéliales respiratoires humaines et *S. aureus*. Nous avons plus particulièrement étudié

l'effet du temps d'interaction et de la concentration bactérienne sur l'adhérence, l'internalisation et les altérations causées par *S. aureus* sur les cellules épithéliales respiratoires.

Nous avons ensuite analysé les réponses transcriptionnelles des cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF en interaction avec *S. aureus* vivant ou ses facteurs de virulence solubles. Cette étude a plus particulièrement analysé l'apparition des phénomènes d'altération de la perméabilité membranaire et d'apoptose ainsi que la régulation des gènes impliqués dans les phénomènes d'inflammation, d'apoptose et de transcription, et de régulation de la sécrétion de différentes cytokines.

Nous avons enfin comparé les réponses dynamiques transcriptionnelles des cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF et CF après interaction avec les facteurs de virulence solubles de *S. aureus*. Cette étude a eu pour but de comparer la réponse transcriptionnelle des gènes impliqués dans les phénomènes d'inflammation, d'apoptose et de transcription, ainsi que la régulation de la sécrétion de différentes cytokines, en fonction du génotype cellulaire (CF ou non-CF).

Tous ces travaux ont été réalisés dans le cadre de collaborations nationales et internationales, notamment avec les équipes de Maria Cristina Plotkowski (Institut de Microbiologie Prof. Paulo de Góes, Université Fédérale de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brésil), de Pascal Barbry (Institut de pharmacologie Moléculaire et Cellulaire UMR 6097, CNRS, Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France) et de Marc Merten (INSERM U724, Vandoeuvre-les-Nancy, France).

## **ARTICLE 1 : INTERACTION DYNAMIQUE ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES RESPIRATOIRES ET STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

Notre première étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration menée entre l'équipe de Maria Cristina Plotkowski, (Institut de Microbiologie de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro, Brésil) et l'Unité INSERM 514 qui a permis l'accueil d'un chercheur brésilien (Mauricio Da Silva) qui a passé un an et demi dans notre équipe à Reims.

Le but général de cette première étude était d'analyser, sur une lignée de cellules épithéliales respiratoires normales d'origine glandulaire mise au point par Marc Merten (M. Merten *et al.*, 1996), la capacité d'une souche de référence de *S. aureus* (8325-4) à adhérer et s'internaliser et à analyser en fonction du temps et de la charge bactérienne, la réponse des cellules épithéliales respiratoires, en particulier ses capacités de défense.

L'originalité de notre démarche était de préciser la réponse **dynamique** des cellules épithéliales respiratoires. Dans la majorité des études réalisées jusqu'à présent (Becker *et al.*, 2004) (Cannon *et al.*, 2003) y compris les études réalisées dans notre laboratoire (Mongodin *et al.*, 2002) (Coraux *et al.*, 2004) l'effet de l'interaction entre cellules épithéliales respiratoires et *S. aureus* était étudié pendant une période de temps déterminé (4 ou 24h).

La vidéomicroscopie nous a d'abord permis d'étudier, grâce à un marquage par les sondes fluorescentes Syto 9 (marquage vert des cellules ayant une perméabilité membranaire intacte) et iodure de propidium (marquage rouge des cellules ayant une perméabilité membranaire altérée), l'adhérence et l'internalisation de *S. aureus* aux concentrations  $10^4$ ,  $10^6$  et  $10^8$  CFU/mL. Les lésions cellulaires associées (apoptose et altération de la perméabilité membranaire) ont également été étudiées par vidéomicroscopie grâce à un marquage par les sondes fluorescentes YOPRO 1 (marquage vert des cellules en apoptose) et iodure de propidium et par cytométrie de flux (marquage des cellules en apoptose par l'annexine V biotinylée). L'adhérence de *S. aureus* ainsi que les altérations ultrastructurales des cellules a été étudiée par microscopie électronique à transmission (MET). La sécrétion de l'alpha-toxine (facteur de virulence soluble) par *S. aureus* a été étudiée par western blotting en parallèle de la sécrétion de SLPI (Secretory Leukoproteinase Inhibitor) par les cellules épithéliales respiratoires qui a été étudiée par ELISA.

Cette étude montre qu'après 1h d'interaction entre les cellules non-CF et *S. aureus*, 50% des bactéries présentent une altération de leur perméabilité membranaire et que pour  $10^4$ ,  $10^6$ , ou  $10^8$  CFU/mL de *S. aureus*  $1\pm0,6\%$ ,  $2,7\pm2,6\%$  ou  $7,9\pm5,1\%$  des cellules présentent des bactéries adhérées à leur surface. Après 4h d'interaction, des bactéries sont observées dans les vacuoles des cellules épithéliales respiratoires mais ces cellules ne présentent pas d'altérations évidentes. Après 24h d'interaction, la perméabilité membranaire est altérée pour la plupart des cellules et pour  $10^4$ ,  $10^6$  ou  $10^8$  CFU/mL de *S. aureus*, 0,  $2,8\pm2,6\%$  ou  $27,5\pm19,8\%$  des cellules présentent des bactéries adhérées. La morphologie ultrastructurale de ces cellules épithéliales présente un phénotype de nécrose et une désorganisation de la couche cellulaire respiratoire.

Au cours d'une période de 24h d'interaction des cellules épithéliales respiratoires avec *S. aureus* on observe une apoptose transitoire dont l'apparition varie en fonction de la concentration bactérienne. Après 1h d'interaction des cellules épithéliales avec *S. aureus*, l'expression d' $\alpha$ -toxine est détectée pour des concentrations bactériennes élevées ( $10^8$  CFU/mL) alors qu'après 24h, cette expression apparaît pour une concentration inférieure ( $10^4$  CFU/mL). Après 1h d'interaction on n'observe pas de modification de la sécrétion de Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI), protéine de défense anti-bactérienne, quel que soit l'inoculum bactérien alors qu'après 24h d'interaction, on observe une diminution significative du SLPI dépendante de la concentration bactérienne.

Ces résultats suggèrent que si l'activité de défense des cellules épithéliales respiratoires humaines est efficace au début du processus infectieux, l'intégrité membranaire de ces cellules est altérée après une interaction prolongée avec *S. aureus*. Le déséquilibre entre les facteurs de virulence bactériens solubles secrétés et la sécrétion de protéines à activité antibactérienne est en relation avec la concentration bactérienne.



## Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*

Mauricio C. A. da Silva, Jean-Marie Zahm, Delphine Gras, Odile Bajolet, Michel Abely, Jocelyne Hinnrasky, Magali Milliot, Maria Cristina de Assis, Coralie Hologne, Noël Bonnet, Marc Merten, Maria Cristina Plotkowski and Edith Puchelle

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:543-551, 2004. First published May 14, 2004; doi:10.1152/ajplung.00256.2003

You might find this additional information useful...

This article cites 36 articles, 20 of which you can access free at:

<http://ajplung.physiology.org/cgi/content/full/287/3/L543#BIBL>

This article has been cited by 3 other HighWire hosted articles:

**Downregulation by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist and corticosteroid of *Staphylococcus aureus*-induced airway epithelial inflammatory mediator production**  
K. Fragaki, C. Kileztky, C. Trentesaux, J.-M. Zahm, O. Bajolet, M. Johnson and E. Puchelle  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, July 1, 2006; 291 (1): L11-L18.  
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

**T Cell Chemotaxis and Chemokine Release after *Staphylococcus aureus* Interaction with Polarized Airway Epithelium**  
S. Escotte, D. Al Alam, R. Le Naour, E. Puchelle, M. Guenounou and S. C. Gangloff  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, March 1, 2006; 34 (3): 348-354.  
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

**Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells**  
C. Moreilhon, D. Gras, C. Hologne, O. Bajolet, F. Cottrez, V. Magnone, M. Merten, H. Groux, E. Puchelle and P. Barbry  
*Physiol Genomics*, February 10, 2005; 20 (3): 244-255.  
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajplung.physiology.org/cgi/content/full/287/3/L543>

Additional material and information about *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajplung>

This information is current as of June 26, 2006 .



## Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*

Mauricio C. A. da Silva,<sup>1,2\*</sup> Jean-Marie Zahm,<sup>1\*</sup> Delphine Gras,<sup>1\*</sup> Odile Bajolet,<sup>1</sup> Michel Abely,<sup>1</sup> Jocelyne Hinnrasky,<sup>1</sup> Magali Milliot,<sup>1</sup> Maria Cristina de Assis,<sup>3</sup> Coralie Hologne,<sup>1</sup> Noël Bonnet,<sup>1</sup> Marc Merten,<sup>4</sup> Maria Cristina Plotkowski,<sup>3\*</sup> and Edith Puchelle<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche-S 514, Institut Fédératif de Recherche 53, Centre Hospitalier Universitaire Maison Blanche, 51092 Reims Cedex;

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Equipe Propre Inserm 0014, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France;

<sup>2</sup>Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, 21-941-590 Rio de Janeiro;

and <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, State University of Rio de Janeiro, 20-551-030 Rio de Janeiro, Brazil

Submitted 23 July 2003; accepted in final form 8 May 2004

**Da Silva, Mauricio C. A., Jean-Marie Zahm, Delphine Gras, Odile Bajolet, Michel Abely, Jocelyne Hinnrasky, Magali Milliot, Maria Cristina de Assis, Coralie Hologne, Noël Bonnet, Marc Merten, Maria Cristina Plotkowski, and Edith Puchelle.** Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L543–L551, 2004. First published May 14, 2004; 10.1152/ajplung.00256.2003.—*Staphylococcus aureus* is a major cause of pulmonary infection, particularly in cystic fibrosis (CF) patients. However, few aspects of the interplay between *S. aureus* and host airway epithelial cells have been investigated thus far. We investigated by videomicroscopy the time- and bacterial concentration-dependent ( $10^4$ ,  $10^6$ , and  $10^8$  CFU/ml) effect of *S. aureus* on adherence, internalization, and the associated damage of the airway epithelial cells. The balance between the secretion by *S. aureus* of the  $\alpha$ -toxin virulence factor and by the airway cells of the antibacterial secretory leukoproteinase inhibitor (SLPI) was also analyzed. After 1 h of interaction, whatever the initial bacterial concentration, a low percentage of *S. aureus* (<8%) adhered to airway cells, and no airway epithelial cell damage was observed. In contrast, after 24 h of incubation, more bacteria adhered to airway epithelial cells, internalized bacteria were observed, and a bacterial concentration-dependent effect on airway cell damage was observed. At 24 h, most airway cells incubated with bacteria at  $10^8$  CFU/ml exhibited a necrotic phenotype. The necrosis was preceded by a transient apoptotic process. In parallel, we observed a time- and bacterial concentration-dependent decrease in SLPI and increase in  $\alpha$ -toxin expression. These results suggest that airway cells can defend against *S. aureus* in the early stages of infection. However, in later phases, there is a marked imbalance between the bactericidal capacity of host cells and bacterial virulence. These findings reinforce the potential importance of *S. aureus* in the pathogenicity of airway infections, including those observed early in CF patients.

videomicroscopy; secretory leukoproteinase inhibitor;  $\alpha$ -toxin; airway cell damage; bacterial adherence and internalization

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS** is a major cause of nosocomial pulmonary infection, being associated with primary pneumonia in infants and young children and secondary pneumonia following viral infection. *S. aureus* is also frequently involved in early infectious airway disease in cystic fibrosis (CF) patients (2, 3). However, only a few aspects of the interplay between *S. aureus* and host airway epithelial cells have been investigated thus far.

\* M. C. A. da Silva, J.-M. Zahm, D. Gras, M. C. Plotkowski, and E. Puchelle contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: E. Puchelle, INSERM UMRS 514, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France (E-mail: edith.puchelle@univ-reims.fr).



and the induction of apoptosis and necrosis in airway epithelial cells over a 24-h incubation period, as well as the number of host cells with adherent or internalized bacteria and the bactericidal activity of surface liquid collected during the host–bacteria interaction. The changes in the release of SLPI antimicrobial protein by airway epithelial cells and the bacterial release of  $\alpha$ -toxin were analyzed in parallel.

## MATERIALS AND METHODS

**Airway epithelial cells culture.** A transformed human tracheal gland cell line, MM-39 (26), was cultured at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere on culture plates coated with 2% type I collagen. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) F-12 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) supplemented with 1% Ultroser G serum substitute (Biopsep; Villeneuve, La Garenne, France), glucose (10 g/l), sodium pyruvate (0.33 g/l), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), and amphotericin B (2 µg/ml). Cells were seeded at a density of 10<sup>6</sup> cells/ml (10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>), and experiments were performed 3 days after confluence.

**Bacterial strain.** *S. aureus* strain 8325-4, a wild-type laboratory strain [fibronectin-binding protein (*FnBP*) A<sup>+</sup> and *FnBP*<sup>+</sup>, NCTC 8325 cured of prophages], was a generous gift from T. J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland). Bacteria were stored at -20°C in trypticase soy broth (TSB; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) containing 20% (vol/vol) glycerol. Before each assay, bacteria were cultured in TSB for 16–18 h at 37°C under agitation (120 rpm) to obtain stationary growth-phase cultures and then centrifuged (3,000 rpm) for 15 min at 4°C. Bacterial pellets were washed once with sterile phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS) and resuspended in DMEM/F-12 antibiotic-free culture medium to final concentrations of 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, or 10<sup>8</sup> colony-forming units (CFU)/ml.

**Real-time monitoring of *S. aureus*-airway epithelial cell interaction.** A fluorescence staining method using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) was used to study the interaction between airway epithelial cells and *S. aureus*. BacLight is composed of two nucleic acid binding stains: SYTO 9 and propidium iodide. SYTO 9 penetrates into bacteria and host cells with both intact or damaged membranes, staining the cells green, whereas propidium iodide only penetrates into cells with damaged membranes, staining the cells red (18). Briefly, after 3 days of cell culture confluence, medium was removed from the culture plates, and cells were washed three times with sterile PBS and incubated with 1 ml of a *S. aureus* suspension previously treated with SYTO 9 (3 µl) and propidium iodide (3 µl) for 20 min in the dark at 4°C. Infected culture dishes were placed on the stage of an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an environmental chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% relative humidity) and with a charge-coupled device video camera (Coolsnap Fx; Roper Scientific, Tucson, AZ). Using Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA) software, we recorded time-lapse images every 5 min for 1 h. At each time point, a phase-contrast image and two fluorescent images were recorded. At the end of the first hour and 24-h incubation period, fluorescent images were also recorded at different Z-levels (at 1-µm intervals), from the bottom to the top of the cells, to assess the presence of intracellular bacteria. Green fluorescence staining corresponding to SYTO 9 and red fluorescence staining corresponding to propidium iodide were obtained through a 480-nm excitation filter/500-nm emission filter and a 490-nm excitation filter/635-nm emission filter, respectively. After the first 1-h incubation period, the supernatants containing nonattached bacteria were removed and analyzed to determine the percentage of live (green-stained) or dead (red-stained) bacteria, as described below. In parallel, infected cultures were rinsed three times with sterile PBS and treated with 1 ml of fresh antibiotic-free culture medium containing the two BacLight probes. The percentage of airway epithelial cells with attached and/or

internalized bacteria after the first 1-h incubation period was determined by fluorescence microscopy. The culture dishes were then kept for a further 23 h in the environmental chamber, and time-lapse images from the infected cultures were recorded every hour, as described above. At the end of the 23-h incubation period, cell supernatants were removed and analyzed to determine the percentage of green and red fluorescent nonattached bacteria. The cell cultures, on the other hand, were rinsed twice with sterile PBS and exposed to 1 ml of fresh culture medium containing the two fluorescent probes, and the percentages of airway epithelial cells with attached and/or internalized bacteria at 24 h were determined. From the fluorescent images recorded, the evolution of the staining was analyzed in both airway epithelial cells and bacteria. Three different videomicroscopic fields were analyzed per cell cultures exposed to bacteria at each concentration, and, in each microscopic field, 100–150 cells were numbered. To control cell survival during fluorescence imaging (20a), we performed time-lapse imaging on airway cells without *S. aureus*.

**Analysis of the SYTO 9/propidium iodide-stained bacteria present in the airway epithelial cell supernatants.** To determine the percentage of nonadherent bacteria exhibiting either damaged or undamaged membranes (red- and green-stained bacteria, respectively) after 1 and 24 h of airway cell-bacteria interaction, we removed cell culture supernatants from the culture dishes and carefully homogenized them. We then deposited three aliquots of 10 µl on glass slides and analyzed them by fluorescence microscopy (Axiophot, Zeiss) to count the number of red- and green-stained bacteria, which was then expressed as a percentage of the total number of bacteria present in the observation field (~100 bacteria/field).

**Bactericidal activity of the airway epithelial cells supernatants.** Samples from the cell culture supernatants were collected either from cells that had never been in contact with *S. aureus* or from airway cells kept in contact with *S. aureus* (at 10<sup>8</sup> CFU/ml) for 1 and 24 h, respectively. The supernatants were filtered (0.22-µm filter unit; Millipore, Molsheim, France) and stored at -20°C. The bactericidal activity of cell supernatants was assessed as described elsewhere (35). In brief, suspensions containing 500 CFU of *S. aureus* in 2 µl of sterile water were mixed with 30 µl of the airway cell supernatants in 96-well microplates, incubated for 2 h 30 min at 37°C under low agitation (60 rpm), and seeded on trypticase soy agar (TSA, bioMérieux) plates. As control, *S. aureus* was incubated with fresh culture medium. After incubation overnight at 37°C, the number of bacteria was counted and expressed as a percentage of bacterial growth inhibition by reference to the control number of bacteria obtained after the incubation of *S. aureus* with native culture medium.

**Quantification of *S. aureus* adherence to and internalization by airway epithelial cells.** Adherence to and invasion of cultured cells were assayed by a modification of the gentamicin exclusion method, as described (20). In brief, after 3 days of cell culture confluence, the supernatants from four different culture plates were removed, and the airway cells were washed three times with sterile PBS. The airway cells were then exposed to 1 ml of the *S. aureus* suspension containing 10<sup>8</sup> CFU/ml. After 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, the bacterial suspensions were removed from the culture plates, serially diluted in sterile PBS, and plated in TSA to quantify nonadherent bacteria. In parallel, infected cells were rinsed three times with sterile PBS. Cells from two culture plates were then incubated in 1 ml of fresh culture medium containing 200 µg/ml of gentamicin to kill extracellular (EC) adherent bacteria. Cells from the two remaining plates were incubated with 1 ml of gentamicin-free culture medium. After 1 or 24 h at 37°C, cells from cultures exposed to the gentamicin-containing and to the gentamicin-free culture medium were rinsed twice with sterile PBS and lysed with 1 ml of Triton X-100 (vol/vol) 0.05% in PBS. Cell lysates were serially diluted and plated in TSA to quantify intracellular (IC) and total (IC plus EC) bacteria associated with airway epithelial cells, respectively. Finally, the concentration of EC bacteria adhering to airway epithelial cells was calculated by subtracting the concentration



of IC bacteria from the concentration of total bacteria associated with host cells.

**Evaluation of airway epithelial cell death by apoptosis or necrosis.** Two different approaches were used to assess the mechanism of *S. aureus*-induced cell death. We first used two nucleic acid fluorescent stains: YOPRO-1 (Molecular Probes), which selectively passes through the plasma membranes of apoptotic cells and labels them with moderate green fluorescence, and propidium iodide (Molecular Probes), which stains the necrotic cells with red fluorescence. Three days after confluence, airway epithelial cells were incubated with *S. aureus* and the YOPRO-1 (10 µg/ml) and propidium iodide (1 µl/ml) probes. During the 24 h of interaction, fluorescent images were recorded as previously described. From these time-lapse images, we quantified the mean gray level vs. time, corresponding to the fluorescence intensity variations of the YOPRO-1 stain. These variations were expressed as the ratio of the fluorescence intensity at a given time to the initial fluorescence intensity. Each experiment was performed in triplicate.

In the second approach we looked for the exposure of phosphatidylserine (PS) residues at the surface of airway cells (22) and the permeability of cell membranes through flow cytometric analysis of cell labeling with biotinylated annexin-V and propidium iodide, respectively, using an annexin V-biotin detection kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Because externalization of PS occurs in the earlier stages of cell death, annexin V-biotin staining precedes the loss of membrane integrity, which occurs during the latest stages of cell death resulting from either apoptotic or necrotic processes. Briefly, cells were incubated with *S. aureus* suspension at 10<sup>8</sup> CFU/ml for 1 h, washed, and reincubated with culture medium. After 4 or 8 h, cell supernatants were transferred to 15-ml conical tubes. Cells were then detached from the microplate wells with a trypsin-EDTA solution. Detached cells were resuspended in the supernatants kept in the conical tubes, treated with culture medium containing 10% fetal calf serum to neutralize trypsin, and centrifuged at 200 g for 10 min. Cell pellets were resuspended in the binding buffer containing 20 µl of annexin V and 1 µg/ml of propidium iodide, according to the manufacturer's instructions. After incubation for 15 min at room temperature in the dark, cells were centrifuged and incubated with FITC-streptavidin conjugate (Amersham, Arlington Heights, IL) for 20 min at 4°C. Cells were then washed and analyzed with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Assays were repeated twice and in each case at least 10,000 cells were analyzed.

**Analysis by transmission electron microscopy.** For transmission electron microscopy (TEM), at the 1-, 4-, and 24-h time points of the airway cell-*S. aureus* (10<sup>8</sup> CFU/ml) interaction, assay cells were rinsed, fixed for 1 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.15 M PBS, and postfixed in 2% OsO<sub>4</sub>. After dehydration in ethanol, cells were embedded in Agar 100 resin (Agar Scientific, Stansted, UK), cut as ultrathin sections (Ultracut E; Leica, Rueil Malmaison, France), and observed under a TEM (Hitachi H300; Elexience, Verrières le Buisson, France) at 75 kV.

**Western blot analysis of *S. aureus* α-toxin.** Samples from the cell culture supernatants were collected from airway cells kept in contact with the different concentrations of *S. aureus* for 1 and 24 h, respectively. Supernatants were mixed with Laemmli buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) containing 5% 2-mercaptoethanol (vol/vol), boiled for 5 min, separated on a 15% SDS-PAGE gel, and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was then blocked with 5% (wt/vol) nonfat dry milk in PBS containing 0.1% Tween 20 (wt/vol) for 2 h at room temperature, before exposure to anti-α-toxin primary antibody overnight at 4°C (1:2,000; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The blot was then incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000; Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. Signals were detected with an enhanced chemiluminescence (ECL+) kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). We analyzed West-

ern blot bands after scanning the membranes (Fuji, LAS-1000, Raytest).

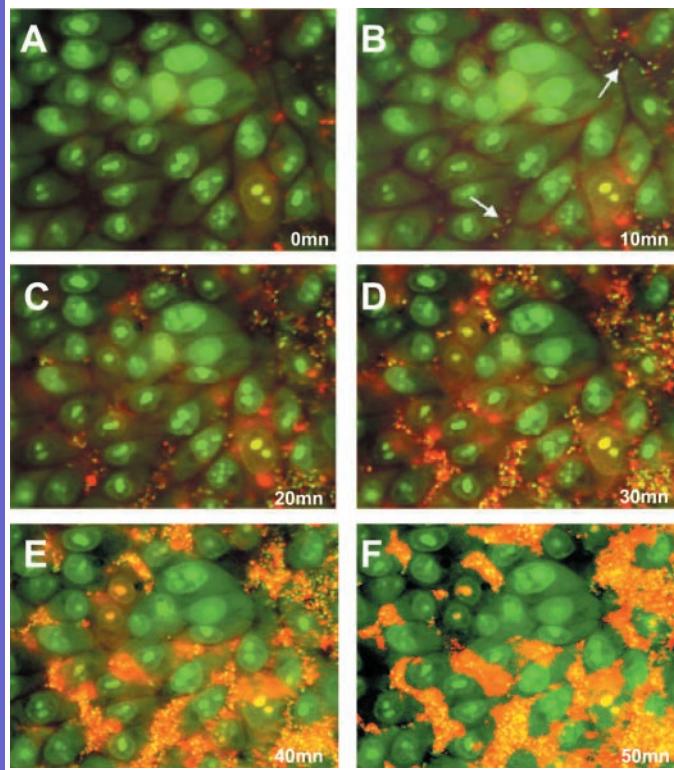
**ELISA analysis of airway cell SLPI.** The SLPI concentrations in the culture medium collected at 1 and 24 h of cell interaction with 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, and 10<sup>8</sup> CFU/ml of *S. aureus* were measured with an ELISA kit according to the manufacturer's protocol (R&D Systems Europe, Abingdon, UK).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means ± SD of data obtained in at least three independent experiments carried out in triplicate. Statistical significance was set at a *P* value of <0.05, determined by the Mann-Whitney *U*-test.

## RESULTS

**Bacterial adherence, internalization, and airway cell damage.** Only a few bacteria were detected near host cell apical membranes at the beginning of the interaction assay, but the number of microorganisms increased progressively throughout the first hour, particularly during the interaction with bacterial suspensions at 10<sup>8</sup> CFU/ml (Fig. 1). With time, a marked shift in the fluorescence of the bacteria was observed, with a color change from green (Fig. 1, *A* and *B*) to red (Fig. 1, *C–F*). Quantitative analysis showed that at the 1-h time point of the incubation period with the different concentrations of bacteria, 44.6 ± 4.8% of the bacteria detected in cell supernatants were labeled by propidium iodide, suggesting an altered permeability of the bacterial membranes by secretory products from the airway epithelial cells. In contrast with the bacterial alterations, airway epithelial cells maintained their green fluorescent staining during the first hour of incubation with the *S. aureus* suspensions, reflecting no change in the integrity of their plasma membrane whatever the bacterial concentration (Fig. 1).

After the first hour of airway cell exposure to *S. aureus* suspensions, cell cultures were rinsed to discard nonadherent bacteria and covered with culture medium containing the two fluorescent probes (see MATERIALS AND METHODS). Bacterial association with host cells was then quantitatively analyzed by fluorescence microscopy. We observed that the percentage of cells exhibiting adherent bacteria varied with the concentration of the bacterial suspensions used to infect the cells and represented 1.0 ± 0.6, 2.7 ± 2.6, and 7.9 ± 5.1% of the total number of airway epithelial cells exposed to *S. aureus* at 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, and 10<sup>8</sup> CFU/ml, respectively. After the first hour of the assays, no internalized bacteria could be detected. Cell cultures were then kept in the environmental chamber on the inverted microscope, and the behavior of infected airway epithelial cells was followed for an additional 23 h. Typical images obtained throughout this incubation period with 10<sup>8</sup> CFU/ml of *S. aureus* showed that, with time, the fluorescent staining of airway cells shifted from green (Fig. 2*A*) to red (Fig. 2, *B–E*). It is noteworthy that green-stained internalized bacteria could be observed in red-stained airway epithelial cells (Fig. 2*F*). Quantitative analysis showed that after 24 h of incubation with bacterial suspensions at 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, and 10<sup>8</sup> CFU/ml, 4.5 ± 4.3, 27.3 ± 19.8, and 89.8 ± 12.1% of the airway cells exhibited a red staining pattern, suggesting severe damage of the integrity of their plasma membrane. The significantly higher (*P* < 0.001) number of dead epithelial cells detected in cell culture supernatants at 24 h of cell interaction with 10<sup>8</sup> CFU/ml of *S. aureus* (3.6 ± 1.7 cells/µl), compared with that after 1 h (0.7 ± 0.6 cells/µl), confirmed the extent of damage to the epithelial

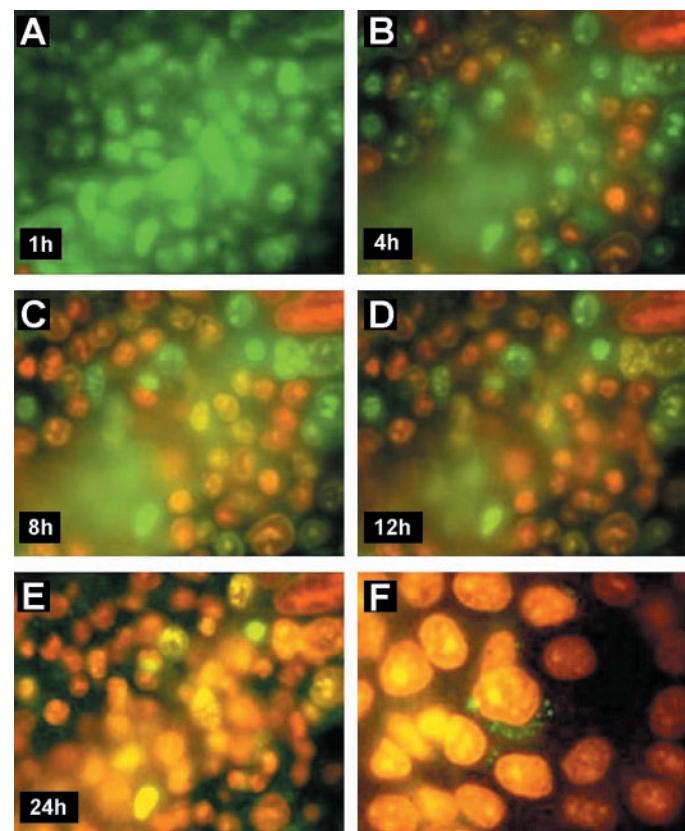


**Fig. 1.** Dynamic imaging of airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus* membrane permeability during the 1st h of interaction with  $10^8$  colony-forming units (CFU/ml) of bacteria [green staining by Syto 9 = intact membrane, red staining by propidium iodide (PI) = damaged membrane]. Few bacteria were observed at the cellular level at the beginning of the interaction (*A*; *B*, arrows). A dramatic increase in the number of bacteria occurred later in the experiment (*C*–*F*). In parallel with the increase in bacterial number, a shift in the bacteria fluorescent staining from green (*A*–*C*) to red (*E*, *F*) was noticed, which reflects permeabilization of the bacterial membrane. Airway epithelial cells maintained their green fluorescence, reflecting the lack of alteration of their membrane integrity.

cells after 24 h of bacterial contact. Time-lapse imaging of the airway cells in absence of *S. aureus* showed that the integrity of the airway cells was preserved.

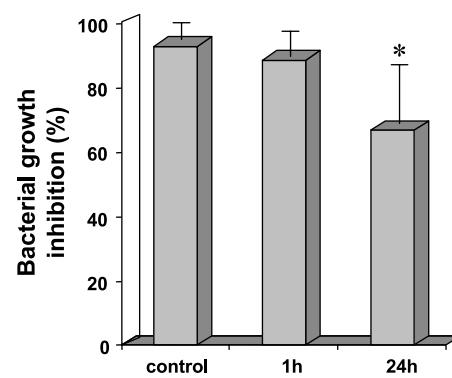
The number of airway epithelial cells with adherent bacteria at 24 h (0,  $2.8 \pm 2.6$ , and  $27.5 \pm 19.8\%$  of total airway cells for cultures incubated with bacteria at  $10^4$ ,  $10^6$ , and  $10^8$  CFU/ml, respectively) was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than at 1 h for the highest bacteria concentration. In addition, after 24 h of interaction with  $10^8$  CFU/ml of bacteria,  $6.5 \pm 2.9\%$  of airway epithelial cells had internalized bacteria. No relationship could be established between the presence of cell-associated bacteria (adherent or internalized) and the loss of viability of host cells. After 24 h of interaction between epithelial cell and *S. aureus*, the percentage of bacteria with an altered membrane in cell culture supernatants ( $18.1 \pm 5.1\%$ ) was significantly lower ( $P < 0.001$ ) than that observed at 1 h ( $44.6 \pm 4.8\%$ ).

**Bactericidal activity of airway cell supernatants.** Cell culture supernatants collected at 1 and 24 h of the cell interaction with *S. aureus* at  $10^8$  CFU/ml were filtered to eliminate bacteria and incubated with freshly prepared *S. aureus* suspensions. The bactericidal activity of airway cell supernatant is shown in Fig. 3. As control we incubated freshly prepared *S. aureus* with supernatant collected from airway cells that had



**Fig. 2.** Dynamic imaging of airway epithelial cell membrane integrity over the course of 24 h of interaction with *S. aureus* at  $10^8$  CFU/ml. After 1 h of interaction, no significant alteration to membrane integrity is observed (green fluorescent staining in *A*). From 4 h up to 24 h of interaction, the number of airway cells with a damaged membrane progressively increased (red fluorescent staining in *B*–*E*). At higher magnification (*F*) and at 24 h of interaction, airway epithelial cells with internalized green fluorescent bacteria (*F*) can be observed.

never been in contact with *S. aureus*, and under these conditions we observed a  $92.9 \pm 11.2\%$  inhibition of the bacterial growth. After 1 h of interaction with *S. aureus*, the bactericidal activity detected in the airway cell supernatant was not significantly different from that of control supernatant. A significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the bacterial growth inhibition was observed for the cell culture supernatant collected after 24 h of



**Fig. 3.** Effect of airway epithelial cell supernatant on *S. aureus* growth. Incubation of *S. aureus* with supernatant collected after 24 h of interaction with airway epithelial cells induced a significant (\* $P < 0.05$ ) decrease in the bacterial growth inhibition.



the interaction assay. These results demonstrate that, early in the interaction process, airway epithelial cells secrete bactericidal molecules that act on *S. aureus* that have not been previously in contact with the airway cells.

*S. aureus* adherence to and internalization by airway epithelial cells. To quantify the number of bacteria associated with airway cell cultures, we used the gentamicin exclusion assay. Due to the low number of cells with adherent bacteria and the absence of cells with internalized bacteria after the interaction with  $10^4$  or  $10^6$  CFU/ml of bacteria, the gentamicin exclusion test was applied only to the interaction of airway cells with bacteria at  $10^8$  CFU/ml. After 1 h,  $1.3 \pm 0.4 \times 10^8$  and  $2.0 \pm 0.2 \times 10^5$  CFU had adhered to the cells and were present in the intracellular compartment of airway epithelial cells, respectively. In other words, 16.4% of the bacteria that had been added to the airway epithelial cells adhered to the cells, whereas 0.02% had become internalized. After 24 h of the interaction assay, the number of adherent bacteria ( $1.0 \pm 0.8 \times 10^8$  CFU) was similar to that detected at 1 h; however, in contrast, the number of intracellular bacteria ( $1.6 \pm 0.9 \times 10^3$  CFU) had decreased significantly ( $P < 0.001$ ).

*Evaluation of airway epithelial cell death by apoptosis or necrosis.* We used time-lapse videomicroscopy and vital fluorescent probes to test whether airway epithelial cell death could be related to apoptosis or necrosis. Figure 4, A–C, displays fluorescent images of the cell nuclei at 6, 7, and 8 h of interaction with *S. aureus* at  $10^8$  CFU/ml. At 6 h a small proportion of cells was labeled with the fluorescent green YOPRO-1 (apoptosis) or the fluorescent red propidium iodide (necrosis) stains. It is noteworthy from these images that the cell nuclei were first stained by the YOPRO-1 stain, indicating that the cells entered in an apoptotic process, which was rapidly followed by necrosis, as assessed by the propidium iodide staining of the cell nuclei. Figure 4D displays the relative fluorescence variations vs. time of the YOPRO-1 probe. We observed that the maximal increase of the relative fluorescence was progressively delayed in relation with the decrease in the bacterial concentration: 11, 16, and 20 h for  $10^8$ ,  $10^6$ , and  $10^4$  CFU/ml of *S. aureus*, respectively (Fig. 4D).

In the second method used to assess the mechanism of death of *S. aureus*-infected cells, we looked for PS residues at the surface of airway cells through cell interaction with annexin V. Cells that had lost membrane impermeability, secondary to either late apoptosis or necrosis, were labeled with propidium iodide. Figure 4, E–G, shows the results obtained during a representative FACS analysis. The mean percentage of 8 h-infected cells reactive with annexin V (38.7%) was much higher than the percentage of reactive control noninfected cells (9.7%), indicating the induction of apoptosis by bacterial infection. However, a higher percentage of infected cells was labeled simultaneously by annexin V and propidium iodide (20.2 and 30.5% for cells at 4 and 8 h postinfection, respectively, vs. 2.5% for control cells). These results further suggest that during *S. aureus* infection, cells entered in an apoptotic process that was rapidly followed by necrosis.

*Ultrastructural changes of airway epithelial cells.* Using TEM, we could see bacteria adhering to the airway epithelial cells after 1 h of interaction with  $10^8$  CFU/ml of *S. aureus* (Fig. 5A). At 4 h, bacteria were observed in vacuoles within airway epithelial cells, but no obvious alteration in host cell or in bacterial cell ultrastructure was observed (Fig. 5B). At 24 h,

dramatic ultrastructural alterations were detected, with all airway epithelial cells exhibiting a necrotic phenotype. A complete disorganization of the epithelial cell layer was observed, and numerous intracellular bacteria were still visible in the necrotic epithelial cells (Fig. 5C).

*Quantitation of SLPI in cell culture medium.* The SLPI concentration of the medium was measured by ELISA in the airway cell culture medium after 1 and 24 h of interaction with  $10^4$ ,  $10^6$ , and  $10^8$  CFU/ml of *S. aureus*. The results presented in Fig. 6 show that after the first hour of interaction with the different concentrations of *S. aureus*, no significant variation of the SLPI content was observed whatever the bacterial concentration. After 24 h of interaction, a significant concentration-dependent ( $P < 0.05$ ) decrease in SLPI was observed in presence of *S. aureus* compared with the control without bacteria.

*α-Toxin expression.* To analyze the time- and bacterial concentration-dependent expression of α-toxin during the host cell-*S. aureus* interaction, we performed Western blot analysis of the culture medium collected at 1 and 24 h of interaction with  $10^4$ ,  $10^6$ , and  $10^8$  CFU/ml of *S. aureus*. As shown in Fig. 7, no α-toxin was detected in the control lanes or in the supernatants of cells exposed to  $10^4$  or  $10^6$  CFU/ml of *S. aureus* at 1 h. In contrast, an increased amount of the toxin was detected in the supernatants of cells exposed to *S. aureus* at  $10^8$  CFU/ml. At 24 h, α-toxin was detected in all the supernatants of cells, whatever the bacterial concentration.

## DISCUSSION

Over the last decade, important advances in research have been achieved in relation to the cellular and molecular processes involved in pathogen-host cell interplay. Although *S. aureus* is a major human respiratory pathogen, its interaction with airway epithelium has been poorly documented. The present study was therefore carried out to assess aspects of the reciprocal effects resulting from the interaction between *S. aureus* and airway epithelial cells.

The results obtained by time-lapse microscopy clearly showed that the airway cells exhibit efficient self-defense mechanisms against *S. aureus*, which accounted for the permeabilization of plasma membranes in almost 50% of the bacteria detected in cell culture supernatants at 1 h postinfection. This result is in accordance with those obtained in the *in vitro* bactericidal assay carried out with supernatants recovered from cell cultures previously incubated with *S. aureus*. After freshly prepared bacterial suspensions were exposed to supernatants of cells conditioned by *S. aureus* infection for 1 h, the percentage of bacterial growth inhibition was in excess of 85%. Because a similar percentage of inhibition was obtained with supernatants from control noninfected cells, this anti-*S. aureus* activity is likely to have resulted from a constitutive secretory activity of airway cells rather than from the production of an inducible molecule. Our finding that the supernatants from cells conditioned for 24 h exhibited a lower capacity to inhibit *S. aureus* growth led us to speculate that during infection the self-defense mechanisms of airway cells may have been overwhelmed.

The antimicrobial activity of the airway surface liquid stems from different cationic proteins and peptides including lysozyme, lactoferrin, phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), β-defensins (5),

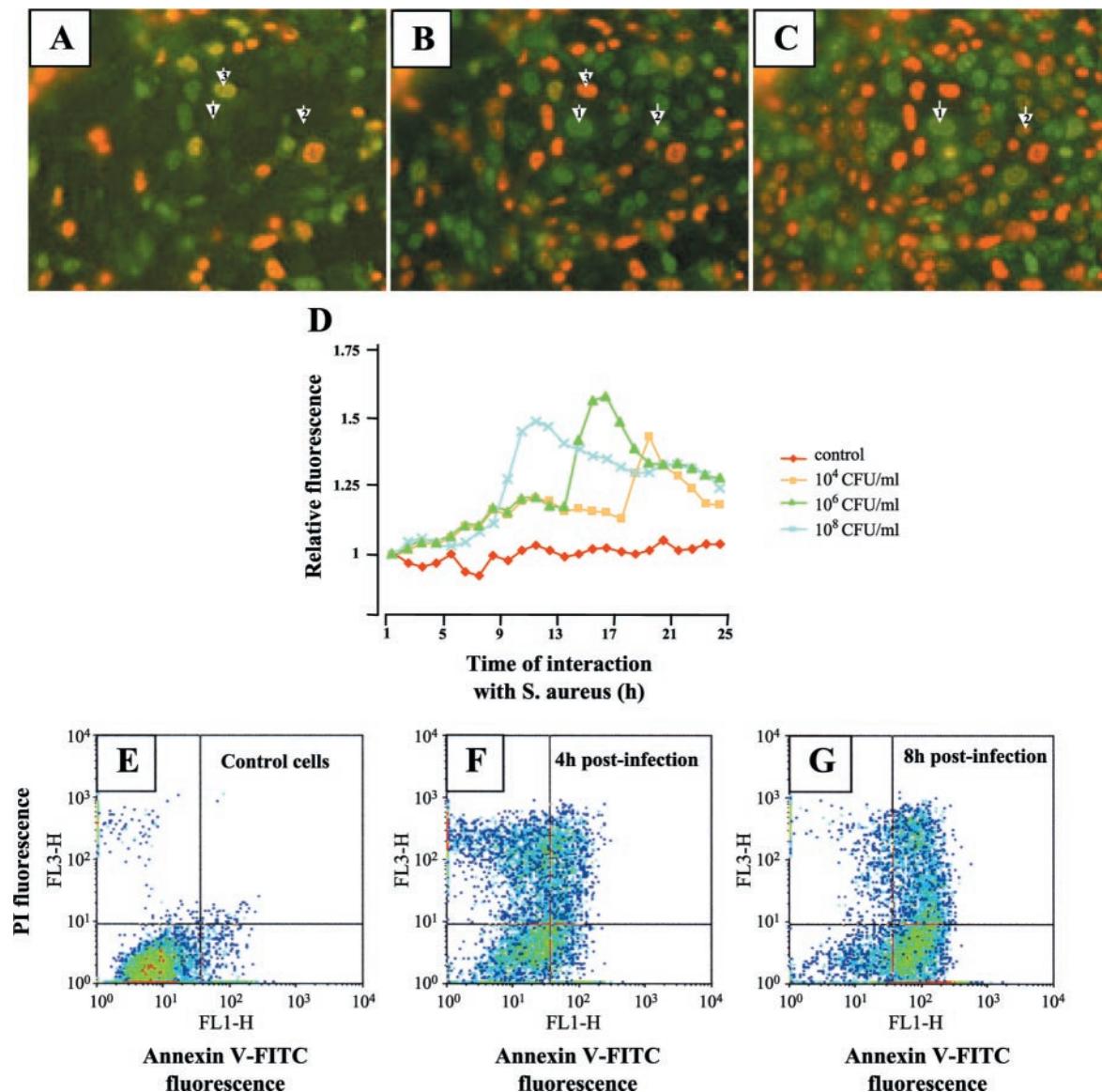


Fig. 4. Dynamic imaging and flow cytometric analysis of apoptosis and necrosis of airway epithelial cells over the course of 24 h of interaction with *S. aureus*. For dynamic imaging, 2 nucleic acid fluorescent stains were used: YOPO-1, which selectively passes through the plasma membranes of apoptotic cells and labels them with moderate green fluorescence, and PI, which stains the necrotic cells with red fluorescence. We observed that early during the interaction, unstained cells at 7 h of interaction (arrowheads 1 and 2 in A) shifted 1 h later to a green staining characteristic of apoptosis (arrowheads 1 and 2 in B), and 1 h later green staining (arrowhead 3 in A and arrowhead 2 in B) shifted to a red staining, characteristic of necrosis (arrowhead 3 in B and arrowhead 2 in C) or did not change (arrowhead 1 in C). The ratio of the fluorescence intensity at time/initial fluorescence intensity (relative fluorescence) of the apoptotic YOPO-1 stain is displayed vs. time in D. The maximal value of the relative fluorescence was progressively delayed in relation with the decrease in the bacterial concentration. By flow cytometry, we analyzed the reactivity with annexin V (FL1) and PI (FL3) of control noninfected airway epithelial cells (E) and of cells infected with *S. aureus* for 4 h (F) and 8 h (G). Annexin V-labeled and PI-unlabeled cells are early apoptotic cells whereas annexin V- and PI-labeled cells are late apoptotic or necrotic cells. The figure is representative of 2 assays with similar results.

and SLPI, a protein constitutively produced by the airway submucosal gland cells (10). Because SLPI has been shown to exhibit a broad-spectrum antibiotic activity that includes anti-*S. aureus* activity (14), we wondered whether the microbicidal activity detected in the supernatants of the airway cell cultures could be associated with this protein. To address this point, we compared the amount of SLPI in the supernatants of control noninfected and of airway cells infected with *S. aureus* at different concentrations for 1 and 24 h. Our results showed that at 24 h, besides exhibiting reduced capability to inhibit *S.*

*aureus* growth, the supernatants from infected cultures exhibited also significantly reduced concentrations of SLPI compared with the amounts detected in control cultures, which were dependent on the bacterial concentration. When cells were kept in contact with bacteria for 24 h, <20% of bacteria detected in the culture supernatants was stained by propidium iodide. *S. aureus* in log-phase has been shown to be more susceptible to cationic peptides (11) and PLA<sub>2</sub> (21) than stationary-phase cells, because stationary-phase bacteria typically have a substantially lower transmembrane potential than

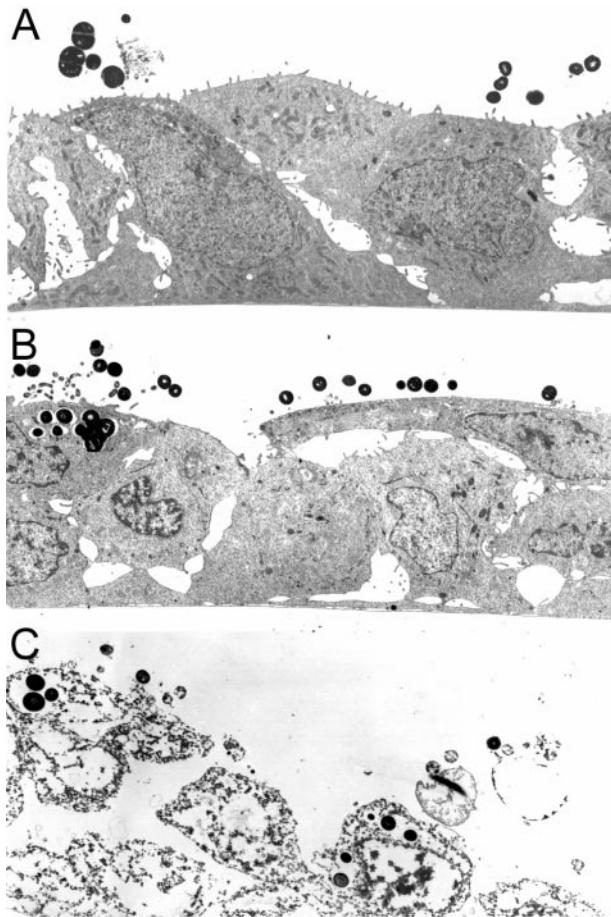


Fig. 5. Ultrastructural morphology of airway epithelial cell layer according to the duration of interaction with *S. aureus*. After 1 h of interaction, numerous bacteria can be seen adhering to the airway epithelial cells (A). After 4 h of interaction, bacteria can be observed in vacuoles within airway epithelial cells without any evident alteration to the host cells (B). After 24 h, airway epithelial cells exhibit a necrotic phenotype and disorganization of the epithelial cell layer (C).

logarithmic-phase cells (21), as well as a different membrane phospholipid composition (9) and a thicker peptidoglycan layer (17). Structural and physiological changes of staphylococci during the transition from a growing to a nongrowing state may explain the low percentage of propidium iodide-stained bacteria detected in the supernatant of cell cultures at the 24-h time point in the interaction assay, because *S. aureus* growth is likely to have reached the stationary phase in the latter stages of the assay. In addition, the dramatic decrease in antimicrobial proteins such as SLPI secreted by the airway epithelial cells after 24 h of interaction with *S. aureus* may also have accounted for the decrease in bacterial killing.

*S. aureus* is generally not considered to be a significant intracellular pathogen. However, there is growing evidence that it can enter into nonprofessional phagocytic cells such as fibroblasts (34), osteoblasts (16), and endothelial (6, 30, 33) and epithelial cells (4, 7, 15, 23). It has also been reported that bacteria can persist intracellularly (29) and induce apoptosis in infected cells as early as 4 h after internalization (25). In a study carried out by Kahl et al. (19), respiratory cells infected by the *S. aureus* strain RN6390 exhibited features of apoptosis at 24 h, but not at 4 h after bacterial internalization. The

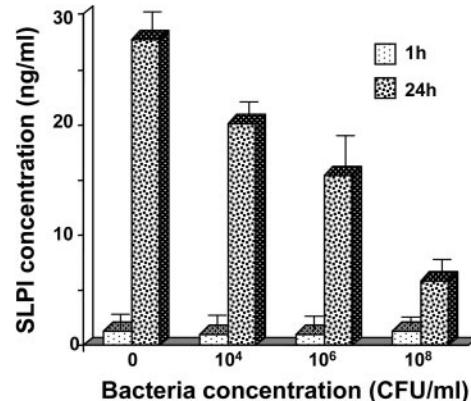


Fig. 6. Measurement of secretory leukoproteinase inhibitor (SLPI) content in the cell culture medium after 1 and 24 h of interaction with different concentrations of *S. aureus*. No significant difference in SLPI expression was observed after the 1st h of interaction and a significant ( $P < 0.005$ ) bacteria concentration-dependent decrease occurred at 24 h of interaction.

induction of apoptosis was clearly associated with replication of intracellular bacteria, because Cowan I, an *S. aureus* laboratory strain that was internalized but failed to replicate, was unable to induce apoptosis (19). In our study, although most of the cells died after 24 h of interaction with bacteria at high concentration, no relationship could be established between the presence of adherent and/or internalized 8325-4 *S. aureus* strain and airway epithelial cell death. We observed that airway cell membranes became permeable to propidium iodide, a characteristic of necrotic rather than apoptotic cells. The differences between our results and those obtained by Kahl et al. (19) are likely to have resulted from the differences in our experimental conditions. In our study, all the assays were carried out in the presence of extracellular bacteria, whereas Kahl et al. (19) treated infected cells with antibiotics to kill extracellular bacteria. Moreover, the epithelial cell type used in the assays (tracheal vs. alveolar cells), the *S. aureus* strain, and the bacterial capacity to replicate inside the host cells likely represent important factors determining the induction of cell death by apoptosis or necrosis. In our assays, cells were kept continuously exposed to *S. aureus* in suspension in the culture medium. Under these conditions, extracellular bacteria are likely to have replicated and released virulence factors into the culture medium. We speculate that bacterial exoproducts might

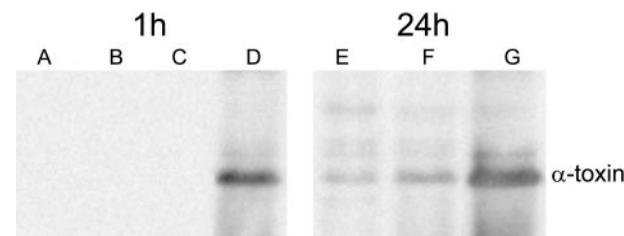


Fig. 7. Western blot analysis of  $\alpha$ -toxin in the culture medium after 1 and 24 h of interaction of *S. aureus* at different concentrations with airway epithelial cells. An increase in  $\alpha$ -toxin expression was observed for the highest concentration of bacteria ( $10^8$  CFU/ml) at both times of interaction (lanes D and G). A higher expression of  $\alpha$ -toxin was noticed at 24 h of interaction with  $10^4$  and  $10^6$  CFU/ml of *S. aureus* (lanes E and F) compared with 1 h of interaction (lanes B and C). Lane A, control culture medium collected from cells that had not been in contact with bacteria.



have accounted for the death of airway epithelial cells, either by enzymatic activity or by direct toxic effects on host cells.

$\alpha$ -Toxin is a pore-forming protein released by most *S. aureus* strains. Its main activity is to cleave phospholipids of the host cell membranes, and its toxic effects are thought to be primarily the result of its rapid action, which destroys the membrane more quickly than it is replaced by the cell's biosynthetic pathways, resulting in cell lysis and necrosis. Because in our study a dramatic alteration of airway cell permeability was detected at 24 h postinfection in both real-time monitoring of bacteria-host cell interaction and TEM assays, we assessed  $\alpha$ -toxin in cell culture supernatants by Western blot assays. High amounts of the toxin were detected in the supernatants of cells exposed to *S. aureus* at 10<sup>8</sup> CFU/ml. At 24 h,  $\alpha$ -toxin was detected in all the supernatants of cells, whatever the bacterial concentration. Although it would be tempting to attribute the killing of airway cells to the marked expression of  $\alpha$ -toxin in cell culture supernatants, further assays will need to be carried out using *S. aureus* clinical strains.

Besides its capability to induce necrosis,  $\alpha$ -toxin has been reported to generate, at subcytotoxic concentrations, small, monovalent cation-selective pores leading to cell activation and death through the activation of the intrinsic apoptotic pathway (1, 12). We looked for features of apoptosis in cells exposed to *S. aureus* for periods shorter than 24 h. Excitingly, by two different approaches, we showed that at 8 h postinfection a high percentage of cells exhibited characteristics of apoptotic cells and that during *S. aureus* infection, cells entered in an apoptotic process that was rapidly followed by necrosis. These data are in agreement with a recent study showing that in the induction of cell death by *S. aureus*  $\alpha$ -toxin, necrosis predominates despite the apoptotic activation of caspase (1).

A potential pathway involved in  $\alpha$ -toxin-mediated cell death could be related to an increase of intracellular nitric oxide (NO) induced by the toxin (24). The endogenous mediator NO has been shown to block apoptosis and to switch death to necrosis. During airway epithelial cell-*S. aureus* interaction in our experiments, this latter mechanism could have been involved in the onset of cell necrosis, which rapidly followed the first steps of the apoptotic cascade (32).

In late phases of the real-time interaction assays, high concentrations of nonadherent bacteria were observed in cell culture supernatants. Given that airway epithelial cell cultures were rinsed to eliminate nonadherent microorganisms after the initial 1-h exposure of airway epithelial cells to *S. aureus* suspensions, free bacteria are likely to have originated both from the replication of adherent extracellular staphylococci and from bacteria escaping from damaged host cells. Despite the presence of free bacteria in cell supernatants, no difference was detected in the CFU counts of adherent staphylococci at 1 and 24 h. This may result from the saturation of cell membrane receptors for bacterial adhesins or from the reduced adhesiveness of *S. aureus* in the stationary-growth phase. The FnBPs, which are major *S. aureus* adhesins, have been shown to take place during the first hour of bacterial growth and then decrease dramatically between 2 and 4 h (27). In our study, the gentamicin exclusion assay highlighted a significant decrease in the number of intracellular bacteria at 24 h vs. that at 1 h. Although this could suggest that host cells have killed intracellular bacteria, the accuracy of the gentamicin assay is

known to depend on the selective permeability of the host cell membranes. Given that an increasing number of airway cells exhibited damaged membranes during the 24 h of the interaction assay, the lower counts of intracellular staphylococci detected at 24 h are likely to be the result of antibiotic entry into damaged airway cells leading to the killing of bacteria.

Together, these results suggest that the innate capacity of airway epithelial cells to defend themselves against bacteria such as *S. aureus* may be overcome after exposure to bacteria. The signaling events that control the host response to *S. aureus* clinical strains from non-CF and CF origin will represent an important challenge in the understanding of the *S. aureus*-induced cytotoxicity and may provide a rationale for future cytoprotective therapeutic interventions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. T. J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland) for the generous gift of *S. aureus* strain (8325-4).

#### GRANTS

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and grants from Association Vaincre La Mucoviscidose (France), GlaxoSmithKline (UK and France), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Brazil).

#### REFERENCES

1. Bantel H, Sinha B, Domschke W, Peters G, Schulze-Osthoff K, and Janicke RU.  $\alpha$ -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspase via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol* 155: 637–648, 2001.
2. Bauernfeind A, Bertele-Harms RM, Harms K, Hörl G, Jungwirth R, Petermüller C, Pryzkalen B, and Weisslein-Pfister C. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection* 15: 270–277, 1987.
3. Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Louden L, Ransey BW, and Clausen CR. Microbiology of sputum from patients with cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 27: 158–163, 1998.
4. Deitch EA, Haskel Y, Cruz N, Xu D, and Kviety PR. Caco-2 and IEC-18 intestinal epithelial cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway. *Shock* 4: 345–350, 1995.
5. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russel JP, and Bevins CL. Transcriptional regulation of  $\beta$ -defensins gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 68: 113–119, 2000.
6. Drake TA and Pang M. *Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression in cultured human cardiac valve endothelium. *J Infect Dis* 157: 749–756, 1988.
7. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, and Bohach GA. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 67: 4673–4678, 1999.
8. Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels IH, Sinha B, Schulze-Osthoff K, and Janicke RU. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ* 10: 1260–1272, 2003.
9. Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, and Weiss J. Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. *J Clin Invest* 103: 715–721, 1999.
10. Frykmark U, Ohlsson K, Polling A, and Tegner H. Distribution of antileukoprotease in upper respiratory mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 91: 268–271, 1982.
11. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, and Lehrer RI. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427–1435, 1985.
12. Haslinger B, Strangfeld K, Peters G, Schulze-Osthoff K, and Sinha B. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor- $\alpha$  and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* 5: 729–741, 2003.



13. Heyer G, Saba S, Adamo R, Rush W, Soong G, Cheung A, and Prince A. *Staphylococcus aureus agr* and *sarA* functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infect Immun* 70: 127–133, 2002.
14. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzel-Wieland R, Steffens GJ, and Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 64: 4520–4524, 1996.
15. Hoefnagels-Schuermans AW, Peetersmans E, Jorissen M, van Lierde S, van den Oord J, de Vos R, and van Eldere J. *Staphylococcus aureus* adherence to nasal epithelial cells in a physiological in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 35: 472–480, 1999.
16. Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, Harris M, Henderson B, Bentley G, and Meghji S. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* 67: 2677–2680, 1999.
17. Johannsen L, Labischinski H, Reinicke B, and Giesbrecht P. Changes in the chemical structure of walls of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of chloramphenicol. *FEMS Microbiol Lett* 16: 313–316, 1983.
18. Jones KH and Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein and diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 33: 77–79, 1985.
19. Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, Peters G, and Cheung A. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun* 68: 5385–5392, 2000.
20. Kihlstrom E and Andaker L. Inability of gentamicin and fosfomycin to eliminate intracellular *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 15: 723–728, 1985.
- 20a. Knight MM, Roberts SR, Lee DA, and Bader DL. Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1083–C1089, 2003.
21. Koo SP, Yeaman MR, and Bayer AS. Staphylocidal action of thrombin-induced platelet bactericidal protein is influenced by microenvironment and target cell growth phase. *Infect Immun* 64: 3758–3764, 1996.
22. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, and van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415–1120, 1994.
23. Lammers A, Nijhut PJM, and Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* 180: 103–109, 1999.
24. Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, and Nicoreta P. Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP-dependent steps upstream and downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 215–221, 1999.
25. Menzies BE and Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 66: 5994–5998, 1998.
26. Merten MD, Kammouni W, Renaud W, Birg F, Mattéi MG, and Figarella C. A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 520–528, 1996.
27. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E, and de Bentzmann S. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 70: 620–630, 2002.
28. Mongodin E, Bajolet O, Hinrasky J, Puchelle E, and de Bentzmann S. Cell wall-associated protein A as a tool for immunolocalization of *Staphylococcus aureus* in infected human airway epithelium. *J Histochem Cytochem* 48: 523–533, 2000.
29. Murai M, Usui A, Seki K, Sakurada J, and Masuda S. Intracellular localization of *Staphylococcus aureus* within primary cultured mouse kidney cells. *Microbiol Immunol* 36: 431–443, 1992.
30. Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher VB, Levitt MA, and Lowy FD. Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 50: 218–224, 1985.
31. Ratner AJ, Bryan R, Weber A, Nguyen S, Barnes D, Pitt A, Gelber S, Cheung A, and Prince A. Cystic fibrosis pathogens activate  $\text{Ca}^{++}$ -dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelia cells. *J Biol Chem* 276: 19267–19275, 2001.
32. Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grümmer F, Maus U, Hänze J, Duemmer N, Grandel U, Seeger W, and Ghofrani HA. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus*-toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L207–L214, 2002.
33. Schmidt H, Bukholm G, and Holberg-Petersen M. Adhesiveness and invasiveness of staphylococcal species in a cell culture model. *APMIS* 97: 655–660, 1989.
34. Sinha B, François PP, Nübe O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, and Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectin bridging to integrin  $\alpha_5\beta_1$ . *Cell Microbiol* 1: 101–117, 1999.
35. Smith JJ, Travis SM, Grennberg EP, and Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85: 229–239, 1996.

## **ARTICLE 2 : STAPHYLOCOCCUS AUREUS VIVANT ET SES FACTEURS DE VIRULENCE SOLUBLES INDUISENT DES REPONSES TRANSCRIPTIONNELLES DIFFERENTES CHEZ LES CELLULES RESPIRATOIRES HUMAINES.**

La pathogénie de *S. aureus* est due en partie à ses protéines de surface qui vont lui permettre d'adhérer aux cellules épithéliales respiratoires et de coloniser l'hôte mais elle est également due à sa capacité à secréter de nombreux facteurs de virulence solubles.

Après avoir observé que *S. aureus* vivant est capable d'adhérer, de s'internaliser et de provoquer une apoptose transitoire et une mort cellulaire (article 1), nous avons étudié la réponse transcriptionnelle des cellules épithéliales respiratoires humaines normales après interaction avec *S. aureus* vivant ou avec ses facteurs de virulence solubles. En effet, les protéines de surface de *S. aureus* sont produites lors de la phase exponentielle de croissance puis leur production diminue alors que la production des facteurs de virulence solubles a lieu en fin de phase exponentielle de croissance. L'exposition des cellules hôtes à *S. aureus* vivant ou ses facteurs de virulence solubles est capable d'induire des lésions telles que des dégradations du tissu hôte et l'inactivation des défenses de l'hôte. Cependant, peu d'études sur les réponses des cellules épithéliales respiratoires humaines à *S. aureus* ont été réalisées. Le but de cette étude est d'analyser si des réponses transcriptionnelles différentes sont observées dans les cellules épithéliales respiratoires en contact direct avec les bactéries vivantes ou seulement en présence des facteurs de virulence solubles.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration (soutenue par l'association Vaincre La Mucoviscidose) avec l'équipe de Pascal Barbry (Institut de pharmacologie Moléculaire et Cellulaire UMR 6097, CNRS). Toutes les expérimentations en microarrays ont été effectuées au sein de la plateforme transcriptome de Sophia Antipolis.

Dans cet article nous avons caractérisé la réponse de l'épithélium respiratoire à l'infection par *S. aureus* en incubant des cellules épithéliales respiratoires humaines MM-39 (lignée de cellules épithéliales respiratoires glandulaires humaines fournies par M. Merten) avec  $10^8$  CFU/mL de *S. aureus* vivant (souche de référence 8325-4 fournie par TJ. Foster) ou 10% de ses facteurs de virulence solubles (FV) produits en phase stationnaire de croissance. Cette interaction à d'abord été réalisée de manière dynamique en vidéomicroscopie (grâce aux sondes fluorescentes iodure de propidium et YOPRO1) afin d'étudier l'apparition des phénomènes d'altération de la perméabilité membranaire et d'apoptose sur une période de 24h

puis aux temps 1, 3, 6, 9, et 24h afin de réaliser une analyse grâce à des puces pangénomiques (contenant l'intégrité du génome humain). Une « up- régulation » d'un grand nombre de gènes a été observée à 3h d'interaction, c'est pourquoi la suite des expérimentations a été réalisée à un temps de 3h. Les interactions sur une période de 3h entre les cellules épithéliales respiratoires et *S. aureus* ou ses FV ont été étudiées grâce à des micropuces à ADN contenant 4 200 sondes. Ces données ont été confirmées par RT-PCR semi-quantitative sur 537 paires de primers. Enfin, les ELISA de l'IL-8, l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et le PGE2 ainsi que le western blotting de l'Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) ont été réalisés.

Cette étude montre que l'interaction des cellules épithéliales respiratoires avec *S. aureus* vivant ou ses FV sur une période de 24h révèle une apoptose transitoire (après 9h d'interaction) ainsi qu'une altération de la perméabilité membranaire qui augmente au cours du temps. Après 3h d'interaction, l'altération de la perméabilité membranaire est plus importante dans les conditions d'interactions avec les FV de *S. aureus* qu'avec *S. aureus* vivant.

Cette étude montre ensuite qu'il existe plusieurs altérations majeures aux différents temps d'interactions de 1, 3, 6, 9 et 24h et met en évidence l'altération précoce de différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la transcription, l'inflammation et l'apoptose. C'est pourquoi nous avons sélectionné le temps d'interaction 3h pour la suite de l'étude.

Cette étude montre également qu'il existe une régulation différente des gènes codants pour des protéines impliquées dans la transcription, l'inflammation, l'apoptose et des gènes régulés par l'hypoxie et le stress oxidatif, chez les cellules incubées 3h avec *S. aureus* ou ses FV. En effet, on observe une « up-régulation » des facteurs de transcription tels que le complexe AP-1 (fos, jun, junB) lors d'une interaction entre les cellules et les FV de *S. aureus*. L'« up-régulation » de ce complexe est également observée lors de l'interaction entre les cellules et *S. aureus* vivant mais de façon moindre. De même, on observe une « up- régulation » de NF- $\kappa$ B1 et NF- $\kappa$ BIE ainsi que TLR2 dans les conditions d'interaction avec les FV de *S. aureus*. En ce qui concerne les facteurs de l'inflammation, on observe une « up- régulation » de nombreux gènes codant pour des protéines connues pour induire la voie des JAK/STAT lors de l'interaction avec les FV de *S. aureus* et de manière plus importante que pour la condition avec *S. aureus* vivant. L'expression des gènes codants pour les cytokines IL-8, IL-6 et IL-1 $\beta$  ainsi que pour COX2 est augmentée de façon plus importante lors des interactions avec les

FV de *S. aureus* que lors des interactions avec *S. aureus* vivant. Nous n'avons pas observé d'altération significative de la transcription du gène codant pour TNF- $\alpha$  lors de ces différentes interactions. Les gènes de l'apoptose tel que TNFAIP3 sont également « up-régulés » de façon plus importante lors de l'interaction avec les FV de *S. aureus* que lors de l'interaction avec *S. aureus* vivant. Contrairement à la régulation de tous les gènes cités précédemment, l'expression des gènes régulés par l'hypoxie ou le stress oxidatif tels que FLJ20500 (HIF-1 responsive RTP801) est plus augmentée lors de l'interaction avec *S. aureus* vivant que lors de l'interaction avec les FV de *S. aureus*.

Les gènes codants pour des protéines impliquées dans l'adhésion, la croissance cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, ou correspondant à des cytokines, des récepteurs, des adaptateurs des kinases des phosphatases ou des facteurs de transcription, ont été étudiés par RT-PCR semi-quantitative. Cent soixante seize gènes sont communs aux puces à ADN et parmi ces gènes, vingt cinq sont significativement régulés de façon positive. Ainsi, l'expression des facteurs de transcription egr1, fos, jun, junB et LKLF, des interleukines IL-8, IL-6, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et de la cyclooxygénase PTGS2 est plus augmentée lors de l'interaction avec *S. aureus* vivant que lors de l'interaction avec les FV de *S. aureus*.

Enfin, cette étude montre que la sécrétion d'IL-8, IL-6 et PGE2 chez les cellules épithéliales respiratoires incubées sur une période de 3h avec les FV de *S. aureus* est plus importante que lorsque cette incubation a lieu avec *S. aureus* vivant. La sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules épithéliales respiratoires incubées avec les FV de *S. aureus* est fonction du temps et n'est que faiblement augmentée après 3h d'interaction. L'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$  est plus importante lors de l'interaction avec les FV de *S. aureus* que lors de l'interaction avec *S. aureus* vivant après une période de 3h.

Ces résultats montrent qu'il existe une réponse transcriptionnelle des cellules épithéliales respiratoires à *S. aureus* qui diffère considérablement quand les cellules interagissent avec des bactéries vivantes ou avec leurs facteurs de virulence solubles. Les cellules sont plus sensibles aux FV de *S. aureus* qu'à *S. aureus* vivant, ce qui montre que l'épithélium respiratoire est particulièrement sensible aux FV de *S. aureus* notamment au niveau de l'intégrité, de la perméabilité membranaire et de la réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales respiratoires.

# Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells

Chimène Moreilhon, Delphine Gras, Coralie Hologne, Odile Bajolet, Françoise Cottrez, Virginie Magnone, Marc Merten, Hervé Groux, Edith Puchelle and Pascal Barbuy

*Physiol Genomics* 20:244-255, 2005. First published Dec 14, 2004;  
doi:10.1152/physiolgenomics.00135.2004

## You might find this additional information useful...

---

Supplemental material for this article can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/00135.2004/DC1>

This article cites 54 articles, 33 of which you can access free at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/20/3/244#BIBL>

This article has been cited by 2 other HighWire hosted articles:

**An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes**

K. L. Brigand, R. Russell, C. Moreilhon, J.-M. Rouillard, B. Jost, F. Amiot, V. Magnone, C. Bole-Feysot, P. Rostagno, V. Virolle, V. Defamie, P. Dessen, G. Williams, P. Lyons, G. Rios, B. Mari, E. Gulari, P. Kastner, X. Gidrol, T. C. Freeman and P. Barbuy

*Nucleic Acids Res.*, July 19, 2006; 34 (12): e87-e87.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

**T Cell Chemotaxis and Chemokine Release after *Staphylococcus aureus* Interaction with Polarized Airway Epithelium**

S. Escotte, D. Al Alam, R. Le Naour, E. Puchelle, M. Guenounou and S. C. Gangloff

*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, March 1, 2006; 34 (3): 348-354.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/20/3/244>

Additional material and information about *Physiological Genomics* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/pg>

---

This information is current as of August 31, 2006 .

## Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells

Chimène Moreilhon,<sup>1</sup> Delphine Gras,<sup>2</sup> Coralie Hologne,<sup>2</sup> Odile Bajolet,<sup>2</sup> Françoise Cottrez,<sup>3</sup> Virginie Magnone,<sup>1</sup> Marc Merten,<sup>4</sup> Hervé Groux,<sup>3</sup> Edith Puchelle,<sup>2</sup> and Pascal Barbuy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire UMR 6097 Centre National de la Recherche

Scientifique, Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne; <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR-S 514, IFR 53, CHU Hôpital Maison Blanche, Reims;

<sup>3</sup>INSERM U576, Hôpital de l'Archet, Nice; and <sup>4</sup>INSERM EMI 10014, Vandoeuvre-les-Nancy, France

Submitted 10 June 2004; accepted in final form 9 December 2004

**Moreilhon, Chimène, Delphine Gras, Coralie Hologne, Odile Bajolet, Françoise Cottrez, Virginie Magnone, Marc Merten, Hervé Groux, Edith Puchelle, and Pascal Barbuy.** Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics* 20: 244–255, 2005. First published December 14, 2004; doi:10.1152/physiolgenomics.00135.2004.—To characterize the response of respiratory epithelium to infection by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), human airway cells were incubated for 1 to 24 h with a supernatant of a *S. aureus* culture (bacterial supernatant), then profiled with a pangenomic DNA microarray. Because an upregulation of many genes was noticed around 3 h, three independent approaches were then used to characterize the host response to a 3-h contact either with bacterial supernatant or with live bacteria: 1) a DNA microarray containing 4,200 sequence-verified probes, 2) a semiquantitative RT-PCR with a set of 537 pairs of validated primers, or 3) ELISA assay of IL-8, IL-6, TNF $\alpha$ , and PGE<sub>2</sub>. Among others, Fos, Jun, and EGR-1 were upregulated by the bacterial supernatant and by live bacteria. Increased expression of bhlhb2 and Mig-6, promoter regions which harbor HIF responding elements, was explained by an increased expression of the HIF-1 $\alpha$  protein. Activation of the inducible form of cyclooxygenase, COX-2, and of the interleukins IL-1, IL-6, and IL-8, as well as of the NF- $\kappa$ B pathway, was observed preferentially in cells in contact with bacterial supernatant. Early infection was characterized by an upregulation of anti-apoptotic genes and a downregulation of pro-apoptotic genes. This correlated with a necrotic, rather than apoptotic cell death. Overall, this first global description of an airway epithelial infection by *S. aureus* demonstrates a larger global response to bacterial supernatant (in term of altered genes and variation factors) than to exponentially growing live bacteria.

transcriptome; microarray; inflammation; infection

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS** is a gram-positive bacteria and a major cause of infection of skin, bone joints, endovascular, ocular, and respiratory tissues (31a). *S. aureus* is involved in nosocomial respiratory infections (50a) and is one of the first pathogens to colonize the airways in cystic fibrosis (CF) (21, 48). Along with mucus, which represents a first line of airway antibacterial defense, the airway surface epithelium is a major site of interaction with *S. aureus*. After contact with the bacteria, specialized cells from the airway surface and glandular epithelium secrete various peptides and proteins such as

lysozyme, lactoferrin, secretory IgA, peroxidase, and proteinase inhibitors that play a crucial role in the innate host defense (37, 41). *S. aureus* surface proteins such as adhesins and protein A are produced during exponential growth phase and then downregulated at a later time, whereas most secreted exoproteins, including toxins, hemolysins, and tissue-degrading enzymes are produced at the end of the exponential growth phase (38). The exposure of host cells to live *S. aureus* and to their virulence factors may induce diverse injuries including degradation of host tissue and inactivation of host defense mechanisms. Nevertheless, little is known about the responses induced by *S. aureus* in human airway cells, even at a transcriptional level.

We examined the host transcriptional response to the interaction between human airway epithelial cells, represented here by the human airway glandular cell line MM-39 (13, 34), and a reference *S. aureus* strain (8325-4 strain). To provide a molecular portrait of airways cells response to infection, a time course experiment corresponding to an interaction between airway epithelial cell and bacterial supernatant was first performed. It was followed by a comparison of the epithelial cells responses to live bacteria or to products secreted by bacteria after 3 h of contact. The aims of the present study were to analyze whether the cells in direct contact with live bacteria or only in presence with *S. aureus* soluble virulence factors induce different transcriptional responses in human airway cells.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### Airway Epithelial Cell Culture

Confluent monolayers of MM-39, a transformed human tracheal gland cell line, were cultured in culture dishes coated with type I collagen as described by Merten et al. (34). Two hours before each experiment, cells were washed and cultured in DMEM-F12 without antibiotics and without Ultronser G.

#### Bacterial Strain and Culture Conditions

*S. aureus* strain (8325-4), a reference laboratory strain was a gift from T. J. Foster (Department of Microbiology, Dublin, Ireland). Bacteria were grown at 37°C overnight in trypticase soy broth (TSB). Bacteria/cell interactions were analyzed under two distinct experimental conditions. In the first experimental condition, *S. aureus* bacteria were grown in TSB up to a concentration of  $5 \times 10^8$  cfu/ml, then washed with phosphate-buffered saline (PBS 0.1 M, pH 7.2), resuspended in DMEM-F12, and added to the apical surface of confluent airway epithelial cells (MM-39). Interaction took place for 3 h at a ratio of 50 bacteria for 1 epithelial cell as previously described

\*E. Puchelle and P. Barbuy equally contributed to this work.

Article published online before print. See web site for date of publication (<http://physiolgenomics.physiology.org>).

Address for reprint requests and other correspondence: P. Barbuy, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire UMR 6097 CNRS, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France (E-mail: barbuy@ipmc.cnrs.fr).

(5, 22). This experiment was named “live bacteria.” In the second experimental condition, the initial suspension ( $5 \times 10^8$  cfu/ml) was centrifuged (1,500 g, 10 min) and the supernatant was diluted 10-fold in DMEM-F12 (9, 12). The airway epithelial cells were then incubated with the bacterial supernatant (soluble virulence factors) for 1, 3, 6, 9, and 24 h. Additional experiments were performed at 3 h, to compare with live bacteria. This experiment was named “bacterial supernatant.” Each of these two experimental conditions included their own control corresponding to either airway cell culture medium for the live bacteria experiment or epithelial cell culture medium supplemented with 1/10 of bacterial growth medium for the bacterial supernatant.

#### RNA Extraction

At the end of the different incubations, cells were washed with PBS (0.1 M), and RNA was extracted with High Pure RNA Isolation Kit (Roche), according to the manufacturer’s instructions.

#### Microarray Technique

**Array preparation.** Both oligonucleotide microarrays and cDNA microarrays were used for this study, as follows.

**OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYS.** The oligonucleotide microarrays contained ~25,000 distinct oligonucleotide probes covering most of the known human transcripts. The list of the 25,279 probes (length ~51 bp) is available online (<http://www.microarray.fr:8080/mediante>; also see Supplemental Table S1, available at the *Physiological Genomics* web site).<sup>1</sup> Microarrays were printed with a ChipWriter Pro (Bio-Rad) on commercial UltraGAPS II slides (amino-silane-coated slides, Corning 40017) and processed according to the manufacturer’s instructions.

**cDNA MICROARRAYS.** The cDNA microarrays contained ~4,200 distinct cDNA probes. Gene selection was based on relevance to inflammation, infection, differentiation, ion transport, cell signaling, cell migration, etc. A large fraction of the probes also corresponded to transcripts encoding membrane proteins. Such a microarray probed a significant portion of all known human transcripts and represented a powerful tool for studying molecular mechanisms of lung physiopathology. The list of the 4,200 probes is available at [http://www.microarray.fr/IPMC/cDNA\\_microarray5k.html](http://www.microarray.fr/IPMC/cDNA_microarray5k.html). The cDNA probes were PCR-amplified from cDNA derived from Universal Human Reference RNA (Stratagene) by reverse transcription. Probes 1) had a normalized length of  $250 \pm 19$  bp; 2) had a normalized GC content of  $52 \pm 8\%$ ; 3) were specific for a unique human gene; and 4) were controlled by DNA sequencing. PCR products were purified by using QIAquick 96 PCR Purification Kit (Qiagen), resuspended in  $3 \times$  SSC at a concentration of 200 ng/ $\mu$ l. Microarrays were printed with a SDDC-2 (Bio-Rad) on homemade aldehyde-coated glass microscope slides (11). Valid amplifications were characterized by the presence of a fragment at the correct molecular weight and by the identification of the correct sequence by direct sequencing. Data presented into the present manuscript only refer to sequence-verified probes. Microarray processing was then performed as described in Dayem et al. (11).

**RNA labeling and hybridization.** Two different RNA labelings were performed for this study: amplification protocol for oligonucleotide microarrays and direct RT labeling for cDNA microarrays.

**AMPLIFICATION PROTOCOL (OLIGO ARRAY).** We amplified 2  $\mu$ g total RNA with the Amino Allyl MessageAmp aRNA kit (Ambion ref. 1752) according to the manufacturer’s instructions. Cy3- and Cy5-labeled aRNA were fragmented with the Ambion aRNA Fragmentation Reagents (ref. 8740), then added to 250  $\mu$ l ChipHybe 80 (Ventana ref. 760-127) for hybridization in a Discovery station (Ventana,

Illkirch, France). After a 10-min denaturation at 70°C, hybridization was performed 10 h at 48°C. Arrays were then washed twice in Ribowash solution (Ventana ref. 760-105) for 1 min, twice in 1× SSC solution (Invitrogen, 15557-044) for 1 min, rapidly dipped in water and ethanol, then spun dry.

**RT PROTOCOL (cDNA ARRAY).** We reverse transcribed 10  $\mu$ g of total RNA according to Dayem et al. (11), except that 500  $\mu$ M dATP, 500  $\mu$ M dCTP, 500  $\mu$ M dGTP, 100  $\mu$ M dTTP, and 400  $\mu$ M amino-allyl-dUTP were used for the reaction. After 2.5 h of incubation at 42°C, RNA degradation, and removal of unincorporated nucleotides using the Nucleotide Removal Kit (Qiagen), cDNA were then labeled with Cy3/5 monofunctional reactive dyes (Amersham). Initial experiments were performed using a direct labeling method and provided similar results. Microarrays were then hybridized at 48°C, according to Dayem et al. (11).

Both oligonucleotide and cDNA microarrays were scanned with a ScanArray Express (version 2.0.19 microarray acquisition system; Packard BioScience, Rungis, France). The two red and green lasers operated at 633 nm and 543 nm to excite Cy5 and Cy3, respectively. The intensity was measured at 670 nm for Cy5 and 570 nm for Cy3. Laser power was set to 100%, and photomultiplier tube (PMT) power was set between 65% and 75% depending on the slides.

#### Bioinformatics Analysis

All results are available in GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), under the accession numbers GSE1853 (cDNA microarrays) and GSE1704 (oligonucleotide microarrays). For oligonucleotide microarrays, TIF images containing the data from each fluorescence channel were quantified with the GenePix Pro 5.0 program (Axon Instruments) using an “irregular features” quantification method. Lowess normalization was performed using the GeneSpring program (version 6.1). Genes characterized by a 75th percentile intensity of less than 1,000 for all measurements were discarded. For cDNA microarrays, TIF images containing the data from each fluorescence channel were quantified with the QuantArray program (version 3.0.0.0) (PerkinElmer, Rungis, France) using a fixed circle quantification method. For each spot, intensity and background values for Cy3 and Cy5 were obtained as average intensities. Negative controls (“neg”) were spotted on each slide. These corresponded to nonmammalian mRNA sequences with no significant identity with any human sequences. Signals derived from these spots were subtracted from the specific signal so that a null gene expression was associated with a null fluorescence signal. The specific signal for spot *i* under condition *j* was thus defined as the total spot intensity ( $tot_{ij}$ ) minus local background ( $bgd_{ij}$ ) minus the median of neg<sub>*j*</sub>. Because incorporations of Cy3 and Cy5 dyes into cDNA can differ significantly, data was further normalized using a dye-swap method (8, 25, 55). This method required duplication of experiments, but improved the reproducibility of the quantification (Moreilhon and Barbry, unpublished data). For that purpose, a first microarray was hybridized with experimental and control samples labeled with Cy3 and Cy5, respectively. A second “swap” microarray was hybridized with experimental and control samples labeled with inverted dyes (experimental = Cy5; control = Cy3). The specific signal associated with spot *i* in sample *j* was defined by the geometrical average of the specific intensities in direct and swapped experiments:

$$\exp_i = \sqrt{\frac{(tot_{ij}[\text{Cy3}] - bgd_{ij}[\text{Cy3}] - neg_j[\text{Cy3}])}{(tot_{ij}[\text{Cy5}] - bgd_{ij}[\text{Cy5}] - neg_j[\text{Cy5}])}}$$

$$\text{ctr}_i = \sqrt{\frac{(tot_{ij}[\text{Cy5}] - bgd_{ij}[\text{Cy5}] - neg_j[\text{Cy5}])}{(tot_{ij}[\text{Cy3}] - bgd_{ij}[\text{Cy3}] - neg_j[\text{Cy3}])}}$$

Each PCR product was spotted four times on each slide (2 independent clusters of 2 spots spatially separated), to reduce positional bias of the fluorescence readout. Up to four experimental and four control values were also collected for each probe.

<sup>1</sup>The Supplementary Material for this article (Supplemental Table S1) is available online at <http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/00135.2004/DC1>.

Lists of genes significantly down- and upregulated under the different experimental conditions were established using two distinct approaches.

In a first statistical approach, we used Significance Analysis of Microarrays (SAM, <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html>), a software developed by Tusher et al. (49) to compute a statistical value for each probe, which represented the strength of the relationship between gene expression and one of our qualitative response variables (bacteria, factor, or controls in our experiments). In the present study, 12 independent measurements for each condition [four  $\log_2$  (ratio) measurements for each experiment, times three independent biological experiment] were tested for statistical significance. Only probes with less than five missing values were kept for analysis, since SAM performance was affected by an excess of missing values. A cutoff for significance, called the delta value, was chosen in order to minimize the false-positive rate, defined by the ratio between the number of called genes and the 90th percentile of the number of falsely called genes. An identical cutoff value was used for bacteria and for soluble factors. SAM was first run using a one-class function on normalized  $\log_2$  (ratio) for each experimental conditions, to identify genes upregulated or downregulated by bacteria or by soluble factors. A two-class function was also selected to highlight genes differentially expressed between bacterial supernatant and live bacteria condition. Additional analyses were performed to compare  $\log_2$  (ratio) between bacteria and soluble factors.

In a second statistical approach, we took into account the median signal intensity associated with each probe. With this second independent approach, signals derived from one probe were compared with a subgroup of spots having similar fluorescence intensity. Typically, for one experimental condition, a local Student's *t*-test was run between the 12 spot ratio values associated with 1 probe and the 240 ratios associated with the 20 nearest neighbors (according to the median spot intensity). The analysis was performed using standard Microsoft Excel functions.

Ontologies attached to each gene were then used to classify altered genes according to main biological themes. For that, we used Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) program, available at <http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm> (20), and MEDIANTE, a local database containing diverse information about our probe sets (<http://www.microarray.fr/midiante/index?language=en>). Additional statistical analyses, including K-means, principal component analysis (PCA), and unsupervised hierarchical classification, were performed using the XLSTAT program running on Microsoft Excel (Addinsoft, Paris, France) and MeV program (version 3) (44).

#### Real-Time Semiquantitative RT-PCR

cDNA was synthesized using the SuperScript system (Invitrogen) as previously described (51). Briefly, the reaction was carried out in 25  $\mu$ l with 5  $\mu$ g RNA, 100 ng oligo(dT), 100 ng random hexamers (Roche), and 200 U SuperScript II reverse transcriptase during 1 h at 45°C, followed by a 5-min incubation step at 95°C. The cDNA was then adjusted at 50 ng/ $\mu$ l. The real-time semiquantitative PCR (sqRT-PCR) was performed using the SYBR Green technology and a Applied Biosystems model 9600 apparatus. Primers (MWG Biotech, Courtaboeuf, France) were designed to span exon-intron junctions to prevent amplification of possible trace of genomic DNA and to result in amplicons between 100 and 150 bp. All pairs of primers were qualified by restriction enzyme digestion and electrophoresis. A 20- $\mu$ l PCR reaction contained 50 mM Tris-HCl (pH 8.4, Invitrogen), 200 nM of each primer, 50 ng cDNA, 0.2 mM dNTP (Amersham), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 U Taq polymerase (Platinum, Invitrogen), and 1/10,000 dilution of SYBR Green (Molecular Probes) in optical PCR plates and caps (Applied Biosystems). Expression of target genes was measured after normalization of RNA with four different housekeeping genes, and values were expressed using the C<sub>T</sub> method, as fold increased

expression above a theoretical negative control (user bulletin no. 2, Applied Biosystems, December 1997).

#### ELISA

The enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISA) for IL-6 (R&D systems, ELISA Quantikine ref. D6050), IL-8 (R&D Systems, ELISA quantikine ref. D8050), PGE<sub>2</sub> (R&D Systems, high-sensitivity ELISA ref. DE2100), and TNF (R&D, Quantikine HS Human TNF $\alpha$  Immunoassay systems ref. HSTA00C) were performed according to the manufacturer's instructions. Data were expressed as picograms per 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells for IL-6 and IL-8 experiments and as picograms per milliliter for PGE<sub>2</sub> and TNF experiments (sensitivity:  $\geq$ 0.7 pg/ml for IL-6,  $\geq$ 10 pg/ml for IL-8,  $\geq$ 8.2 pg/ml for PGE<sub>2</sub>, and  $\geq$ 0.12 pg/ml for TNF).

#### Western Blot Analysis

MM-39 cells were washed twice in ice-cold PBS and lysed in lysis buffer [20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride] supplemented with protease inhibitors (Roche Applied Science). After 20 min at 4°C under continuous agitation, extracts were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. We electrophoresed 50  $\mu$ g of protein extracts on 9% SDS-PAGE, and these were electrotransferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P, Millipore). The membrane was incubated overnight at 4°C with a anti-HIF-1 $\alpha$  monoclonal antibody at a 1,000th dilution (Novus Biologicals). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (1:5,000) was then applied for 30 min at room temperature. Immunoreactive bands were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham).

#### Quantification of the Cell-Bacteria Interaction

A fluorescence staining method using the LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit (BacLight; Molecular Probes, Eugene, OR) was used to study the interaction between airway epithelial cells and *S. aureus*. BacLight is composed of two nucleic acid binding stains: SYTO 9, which stains cells (bacteria or host cells) with both intact and damaged membranes; and propidium iodide, which only stains damaged cells. The percentage of airway epithelial cells with attached and/or internalized bacteria after the 3-h incubation period was determined from the fluorescence images. Experiments were performed in triplicate.

#### Evaluation of Airway Epithelial Cell Death by Apoptosis or Necrosis

Three days after confluence, airway epithelial cells were incubated either with *S. aureus* at 5  $\times$  10<sup>8</sup> CFU/ml or with bacterial supernatant, together with YO-PRO-1 (10  $\mu$ g/ml, which stains apoptotic cells) and propidium iodide (1  $\mu$ l/ml, which stains dead cells) probes. Fluorescent images were recorded every 30 min for 24 h as previously described (10). Variations of the YO-PRO-1 and of the propidium iodide fluorescence intensities were expressed as the ratio of the fluorescence intensity at a given time to the initial fluorescence intensity.

#### Experimental Design

Figure 1 describes the experimental design of the work presented in the manuscript.

#### RESULTS

The transcriptional response of the human airway epithelial cell line MM-39 to an interaction with *S. aureus* supernatant was analyzed after 1, 3, 6, 9, and 24 h with a pangenomic microarray containing 25,279 distinct probes. This first experiment revealed several major alterations at the different time

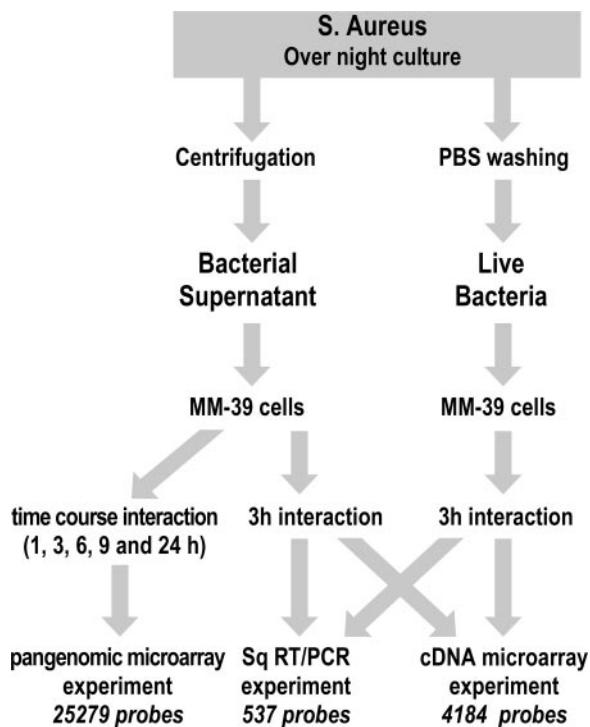


Fig. 1. Experimental design. MM-39 epithelial airway cells were either not infected ("control" condition), or infected for 3 h with PBS-washed bacteria ("live bacteria" condition) or with supernatant of overnight bacterial culture ("bacterial supernatant" condition). Interaction of MM-39 cells with live bacteria and bacterial supernatant were then analyzed with cDNA microarray and with semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR) experiments. cDNA microarray experiments were performed on 3 independent biological experiments, with 2 slides hybridized per biological experiment (dye swap). On each cDNA array, genes were spotted 4 times. We performed 537 sqRT-PCRs on an independent biological experiment with 1–4 technical replicates. There were 176 genes common between sqRT-PCR and the cDNA microarray.

points and highlighted the early alteration of many genes coding proteins involved in transcription, inflammation, and apoptosis (Fig. 2).

To provide a clearer picture of the early steps of the interaction, a second transcriptional study was performed on the same epithelial cells at a single time point (3 h). MM-39 cells were incubated with either live bacteria or bacterial supernatant (prepared as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES), and RNA were profiled to evaluate the respective contributions of a direct contact with live bacteria or of soluble components to the transcriptional response. After 3 h of exposure to  $10^8$  CFU/ml of live *S. aureus* (equivalent to a multiplicity of infection of 50 bacteria per cell),  $15.0 \pm 6.5\%$  of the total number of airway epithelial cells exhibited adherent bacteria. Internalized bacteria were detected in  $3.0 \pm 2.3\%$  of the cells.

To monitor the effects of live bacteria and bacterial supernatant on airway epithelial cells at 3 h, total RNA was isolated from the four experimental conditions and reverse transcribed into fluorescently labeled cDNAs. The entire microarray procedure (from infection to hybridization) was done independently three times for each experimental condition. Samples were hybridized to human cDNA microarrays comprising 4,200 distinct cDNA probes, then analyzed according to standard protocols (see EXPERIMENTAL PROCEDURES for microarray procedures) (Fig. 1).

### Microarray Measurements

Significant changes in the expression profile were first identified with SAM. Table 1 shows that 36 SAM-positive genes were upregulated after a 3-h direct contact with *S. aureus*, and 7 SAM-positive genes were downregulated (live bacteria condition). Similarly, 72 SAM-positive genes were upregulated after contact with bacterial supernatant, and 42 SAM-positive genes were downregulated under the same experimental condition (bacterial supernatant condition). Thirteen genes were increased in both experimental conditions, whereas only one gene was found significantly decreased in both experimental conditions. A very similar qualitative picture was provided by two other independent analyses, based either on the use of a local Student's *t*-test or on sqRT-PCR (sqRT-PCR results are described in the next paragraph). Student's *t*-test revealed 58 altered genes in the live bacteria condition (43 repressed, 15 activated), whereas 359 genes were altered in the bacterial supernatant condition (170 repressed, 189 activated). Table 1 summarizes the results obtained with microarrays and sqRT-PCR. Whatever the quantification procedure, there are more altered genes in the bacterial supernatant condition than in the live bacteria condition. The poor overlap existing between the two conditions (only 10% of the genes were altered in both conditions) illustrated the existence of differential and specific responses of airway epithelial cells to a direct contact with live bacteria or to incubation with bacterial supernatant.

Additional statistical analyses performed on the 405 best scores after a local Student's *t*-test provided consistent observations. A hierarchical classification of the 24 experimental data points clearly discriminated live bacteria experiments from bacterial supernatant experiments, as evidenced by the existence of two distinct branches (Fig. 3). This distinction between live bacteria and bacterial supernatant was confirmed by a PCA performed on the same 405 probes (not shown).

### Semiquantitative RT-PCR Measurements

Additional gene expression measurement after 3-h incubation was performed using a sqRT-PCR strategy. We tested 537 distinct genes by sqRT-PCR. These encoded proteins involved in adhesion, cell growth, apoptosis, inflammation, or corresponding to cytokines, receptors, adapters, kinases, phosphatases, and transcription factors. There are 176 genes that are common between sqRT-PCR and the cDNA microarray. Among these genes, 25 were significantly upregulated in sqRT-PCR experiments. Four of them were also SAM positives. One gene was only SAM positive.

A differential expression superior to 5 was observed for 18 genes in the live bacteria condition (6 being downregulated and 12 being upregulated). On the other hand, 42 genes were regulated in the bacterial supernatant condition when using a 5-fold factor (16 being downregulated and 26 being upregulated). Among these genes, 7 genes were commonly upregulated in live bacteria and bacterial supernatant conditions with a ratio superior to 5. Only one gene was downregulated in the two experimental conditions, with a ratio superior to 5 (Table 1). These results confirmed that the transcriptional response to bacterial supernatant was prominent over the response to a 3-h direct contact with bacteria.

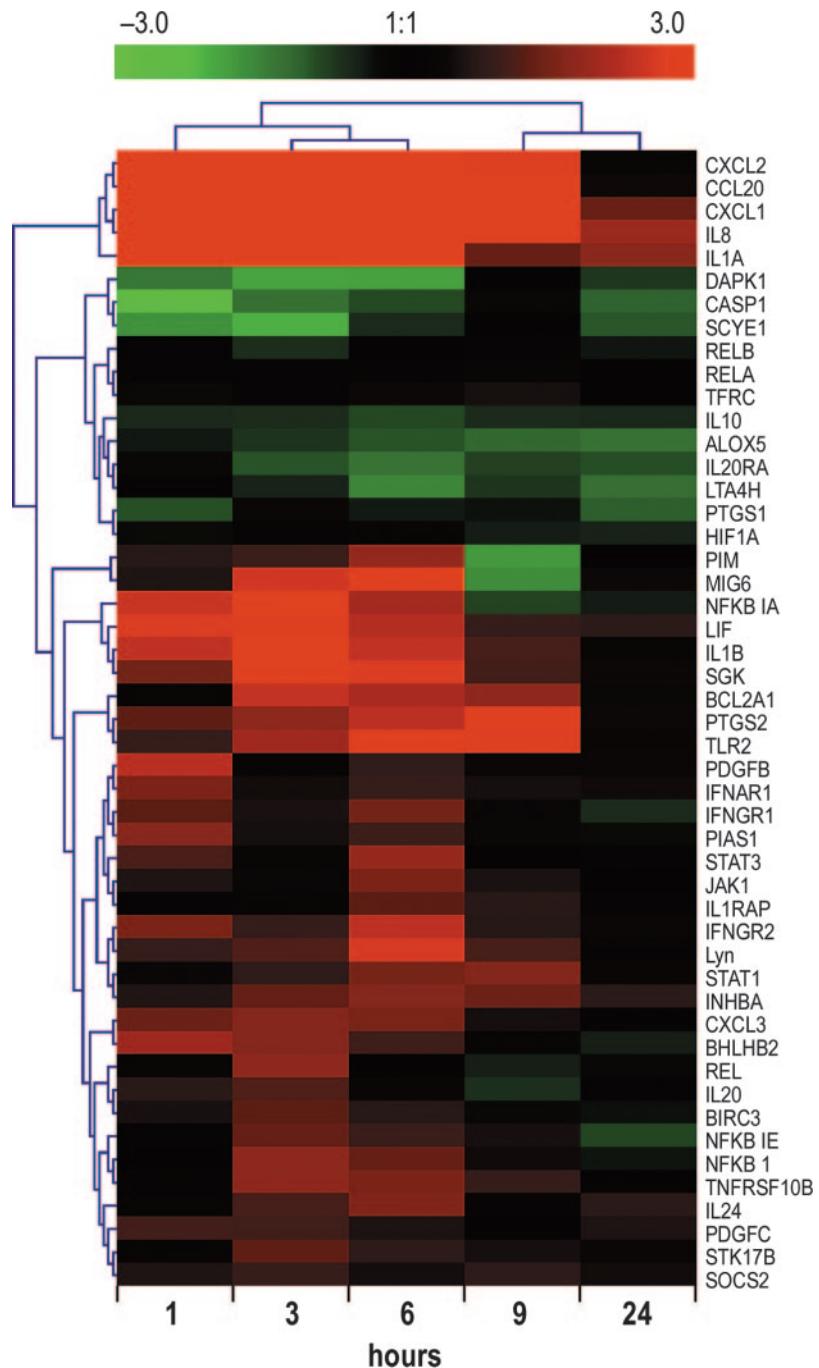


Fig. 2. Hierarchical clustering of a selection of 49 genes identified during a time course experiment describing the interaction of MM-39 cells with *S. aureus* bacterial supernatant. Genes and experiments were clustered using an average linkage method (MeV program). The time course interaction of MM-39 epithelial airway cells with bacterial supernatant was performed on pangenomic microarrays, as described in the EXPERIMENTAL PROCEDURES. Color scale was representative of  $\log_2$  (ratio (bacterial supernatant/control supernatant)).

#### EASE analysis

Time course analysis using ratios cutoff was performed. Hierarchical clustering was performed on modulated genes encoding proteins implicated in transcription, inflammation, and apoptosis using the MeV program (Fig. 2). Analysis of the 3-h interaction results showed that SAM-positive genes (see EXPERIMENTAL PROCEDURES) can be clustered in one of the following functional classes: 1) genes coding proteins involved in transcription (i.e., fos, jun, junB, EGR-1, etc.), 2) genes coding proteins related to inflammation (i.e., IL-8, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , COX-2, etc.), and 3) genes coding proteins involved in regulation of cell apoptosis (i.e., Sgk, A20, etc.). These functional classes were also found after a

direct analysis of the Gene Ontology terms associated with 405 genes selected with the Student's *t*-test (not shown).

1) *Regulators of transcription.* Analysis after a 3-h interaction revealed that several genes encoding proteins of the activator protein-1 (AP-1) complex were upregulated in the bacterial supernatant condition: fos, jun, junB. This was further confirmed by sqRT-PCR. In the live bacteria condition, fos, jun, and junB were also found upregulated and SAM positive, although the upregulation was less than in bacterial supernatant condition (Tables 2 and 3).

EGR-1 (confirmed with sqRT-PCR), core promoter element-binding protein (COPEB), and KLF2 were increased in bacte-

Table 1. Comparison of the results by SAM, local t-test, and sqRT-PCR

Condition	Number of Regulated Transcripts, % relative to total				
	SAM	t-test < 0.0042	RT-PCR > 5	Average	Positive in Both SAM and t-test
<b>Activation</b>					
In live bacteria only	23 (16%)	13 (3%)	5 (10%)	10%	4 (5.4%)
In bacterial supernatant only	59 (41%)	187 (46%)	18 (37%)	41%	34 (46%)
Both in live bacteria and in bacterial supernatant	13 (9%)	2 (0.5%)	7 (13%)	8%	2 (2.7%)
<b>Inhibition</b>					
In live bacteria only	6 (4%)	33 (8%)	5 (10%)	7%	1 (1.35%)
In bacterial supernatant only	41 (29%)	160 (39.5%)	15 (29%)	32%	32 (43%)
Both in live bacteria and in bacterial supernatant	1 (1%)	10 (2%)	1 (2%)	2%	1 (1.35%)
Total	143 genes	405 genes	51 genes		74 genes

MM-39 epithelial airway cells were infected 3 h with “live bacteria” or with “bacterial supernatant,” and compared with “control” MM-39 cells. Values represent the number of genes upregulated or downregulated in the two conditions, as estimated by Significance Analysis of Microarrays (SAM), or by Student’s *t*-test (microarray experiments) and by a ratio limitation [real-time semiquantitative PCR (sqRT-PCR) experiments]. The “average” column represents the average percentage calculated from the percentages for SAM, *t*-test, and sqRT-PCR experiments. The right column corresponds to the number of genes positive at the same time by SAM and *t*-test analysis.

rial supernatant condition, and in live bacteria condition. CEBPG was also upregulated in bacterial supernatant condition, but not in live bacteria condition (Tables 2 and 3).

Although our experimental plan could not provide directly information about the initial steps leading to all these modifications, NF- $\kappa$ B activation appears as one of the key players of the orchestrated gene regulation. It is already known that NF- $\kappa$ B can be activated at a protein level in many models of bacterial infections (15, 50). Transcriptional upregulation of NF- $\kappa$ BIA indeed indicates such activation. Moreover, Fig. 2 shows that NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ BIE were significantly upregulated at a transcriptional level after 3 and 6 h of contact with bacterial supernatant. Rel was upregulated only at 3 h, whereas Rel A and Rel B were not regulated (Fig. 2). The activation of NF- $\kappa$ B target genes (39), especially by the bacterial supernatant condition, is also indicative of an early activation of the NF- $\kappa$ B protein complex. This was typically the case at 3 h for IL-8 and IL-6, Myc, NF- $\kappa$ B IA, junB, TNFAIP3, and NR4A2, which are known to be regulated by NF- $\kappa$ B. NR4A2 was also induced by live bacteria (Table 2). Incidentally, time course experiment revealed that TLR2, a potential activator of the

NF- $\kappa$ B pathway, was upregulated when cells were in contact with bacterial supernatant (Fig. 2).

**2) Inflammation.** JAK/STAT PATHWAY. Many genes encoding proteins known to induce the JAK/STAT pathway were upregulated during the time course interaction with bacterial supernatant: LIF, PDGFB, PDGFC, as well as interferon receptor proteins, IFNAR1, IFNGR1, and IFNGR2. Moreover, JAK1, Lyn, STAT1, STAT3, PIAS1, and SOCS-2, involved in the JAK/STAT pathway, were also upregulated (Fig. 2).

CHEMOKINES AND INTERLEUKINS. The chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3 (also named GRO1, GRO2, and GRO3), and CCL20, as well as interleukins IL-8, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , IL-20, and IL-24, and also IL-1RAP, were upregulated after interaction with bacterial supernatant. However, IL-20RA was downregulated, mostly after 6-h interaction with bacterial supernatant (Fig. 2). Analysis after a 3-h interaction showed that IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, and the leukemia inhibitory factor (LIF) were upregulated in the bacterial supernatant condition expressions but were marginally altered after a direct contact with live *S. aureus*. YARS, which can behave as an interleu-

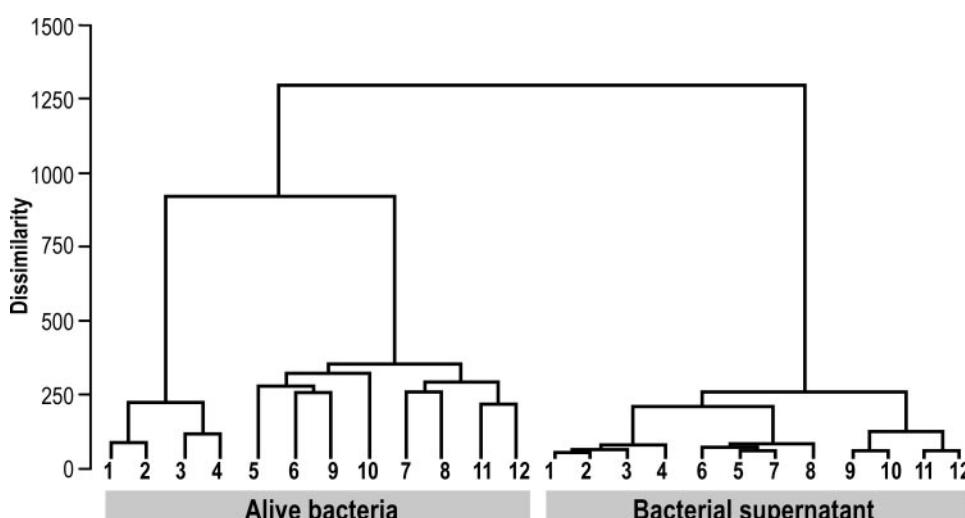


Fig. 3. Hierarchical clustering of the experimental replicates discriminates live bacteria from bacterial supernatant. Hierarchical clustering using Euclidean distance dissimilarity and Ward’s method of aggregation, performed on the first 405 genes selected by a Student’s *t*-test method (see EXPERIMENTAL PROCEDURES) to compare the 24 experimental data points (live bacteria 1–12 and bacterial supernatant 1–12).

Table 2. Selection of significantly altered genes analyzed by cDNA microarray experiments, ordered by functional classes

cDNA Microarray				
Gene	LocusLink Number	Name	Live Bacteria	Bacterial Supernatant
<b>Transcription</b>				
fos	2353	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2.2±1.2	5.8±0.9 <sup>ST</sup>
jun	3725	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	1.7±0.4 <sup>S</sup>	2.8±0.8 <sup>ST</sup>
junB	3726	jun B proto-oncogene	1.6±0.4 <sup>S</sup>	2.4±0.3 <sup>ST</sup>
egr1	1958	early growth response 1	3.3±0.8 <sup>S</sup>	4.6±1.5 <sup>ST</sup>
copeb	1316	core promoter element binding protein	2±0.6	4.6±1.6 <sup>S</sup>
CEBPG	1054	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	0.9±0.4	1.6±0.1 <sup>T</sup>
NFKBIA	4792	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells	1.5±0.4 <sup>S</sup>	1.6±0.1 <sup>ST</sup>
TNFAIP3	7128	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	2.1±0.5	3.5±0.8 <sup>ST</sup>
MYC	4609	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	1.8±0.9	1.7±0.5 <sup>S</sup>
NR4A2	4929	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1.9±0.8	2.6±0.8
<b>Inflammation</b>				
IL8	3576	interleukin 8	1.7±0.5	9.1±2.3 <sup>ST</sup>
IL6	3569	interleukin 6	0.7±0.5	1.6±0.4 <sup>S</sup>
IL1B	3553	interleukin 1, beta	0.9±0.5	1.2±0.1
LIF	3976	leukemia inhibitory factor	0.8±0.7	1.7±0.3
PTGS1	5742	prostaglandin-endoperoxide synthase	0.84±0.23	0.99±0.16
PTGS2	5743	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1.2±0.6	2.1±0.4 <sup>ST</sup>
YARS	8565	tyrosyl-tRNA synthetase	2.0±0.8	2.2±0.3 <sup>ST</sup>
<b>Apoptosis</b>				
TNF	7124	tumor necrosis factor	0.88±0.44	0.88±0.17
SGK	6446	serum/glucocorticoid regulated kinase	0.9±0.3	1.7±0.4 <sup>S</sup>
TNFAIP3	7128	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	2.1±0.5	3.5±0.8 <sup>ST</sup>
PIM1	5292	pim-1 oncogene	1.3±0.4	1.4±0.2 <sup>ST</sup>
CASP3	836	caspase 3	0.8±0.4	0.6±0.1 <sup>ST</sup>
<b>Genes containing HIF response elements</b>				
BHLHB2	8553	basic helix-loop-helix domain containing, class B	4.5±4.0 <sup>S</sup>	2.6±0.5 <sup>ST</sup>
FLJ20500	54541	HIF-1 responsive RTP801	2.8±0.8 <sup>ST</sup>	1.9±0.4 <sup>ST</sup>
MIG-6	54206	gene 33/Mig-6	3.6±2 <sup>S</sup>	1.9±0.6 <sup>ST</sup>
TFRC	7037	transferrin receptor (p90, CD71)	1.8±0.4 <sup>S</sup>	1.8±0.6 <sup>S</sup>

For each gene, symbol, LocusLink number, and name are shown. Ratios represent "live bacteria" or "bacterial supernatant" genes intensities relative to "control" gene intensities (means ± SD). Although TNF and PTGS1 were not found significantly altered during our different experiments, they were included here, as they are discussed in the text. <sup>S</sup>Significantly regulated with SAM analysis. <sup>T</sup>Significantly regulated with *t*-test analysis. This table only presents a selection of genes discussed in the text. A full analysis is available as Supplemental Table S1 at <http://www.microarray.fr/publications/Moreilhon.html> and at the *Physiological Genomics* web site.<sup>1</sup>

kin-8-like cytokine, was upregulated in both conditions (Tables 2 and 3).

The response of epithelial cells to *S. aureus* infection was also quantified at the protein level by an ELISA test for IL-6 and IL-8. Figure 4, *A* and *B*, showed an increase in IL-8 and IL-6 in the cell culture supernatant after a 3-h incubation with bacterial supernatant. Smaller variations were noticed after a direct contact with the bacteria.

cox. Prostaglandins are synthesized by two isoforms of cyclooxygenases (COX, also named PTGS for "prostaglandin-endoperoxide synthases"): COX-1 is a constitutive isoform that maintains cellular homeostasis, whereas COX-2 is an inducible isoform regulated by many proinflammatory stimuli (31). COX-1/2 transform arachidonic acid into prostaglandin H<sub>2</sub>, a precursor of many prostaglandins such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostacyclin, and thromboxanes. Accordingly, the COX-1 isoform was constitutively expressed. On the other hand, COX-2 expression was induced and maintained during 9 h after interaction after contact with bacterial supernatant (Fig. 2). Three hours interaction with live bacteria did not modulate COX-2 expression (Tables 2 and 3). The concentration of PGE<sub>2</sub> was also measured in the culture supernatants by ELISA after a 3-h interaction. PGE<sub>2</sub> level in the live bacteria condition was not modulated in comparison with PGE<sub>2</sub> level in

the control condition, whereas it was 2.9 times more abundant in the bacterial supernatant condition (Fig. 4C).

ALOX5 and LTA4H, two genes related to leukotrienes synthesis were downregulated by bacterial supernatant in a similar time-dependent manner (Fig. 2).

3) *Apoptosis*. Time course experiment on bacterial supernatant condition showed that genes encoding proteins that inhibit apoptosis such as BIRC3, SGK, PIM, and BCL2A1 were upregulated, mainly after 3 h. SCYE1, described at sites of apoptosis, and pro-apoptotic genes encoding CASP1 and DAPK1 were downregulated rapidly after interaction with bacterial supernatant. This major anti-apoptotic response was, however, concomitant with a pro-apoptotic response as interleukins IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-24, STK17B, INHBA, and TNFRSF10B were upregulated rapidly after interaction with bacterial supernatant (Fig. 2). Analysis on cDNA microarrays after a 3-h interaction rather confirmed an anti-apoptotic transcriptional response of airway cells after contact with live bacteria or bacterial supernatant. Indeed, several genes that

<sup>1</sup>The Supplemental Material for this article (Supplemental Table S1) is available online at <http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/00135.2004/DC1>.

**Table 3.** Selection of genes analyzed by sqRT-PCR experiments, ordered by functional classes

sqRT-PCR			
Gene	LocusLink	Live Bacteria	Bacterial Supernatant
<b>Transcription</b>			
egr1	1958	6.6±3.8	31.0±4.4
fos	2353	4.1±1.2	57.7±13.3
jun	3725	6.9±2.2	34.0±8.8
junB	3726	2.1±0.4	7.2±3.7
LKLF	10365	15.9	28.9
<b>Interleukins</b>			
IL8	3576	3.1±0.7	40.9±10.1
IL6	3569	6.1±2.7	19.9±1.9
IL1A	3552	6.2±2.1	38.5±19.0
IL1B	3553	3.8±2.4	25.2±11.0
<b>Cyclooxygenases</b>			
PTGS1	5742	-1.9±0.2	-2.8±2.4
PTGS2	5743	2.3±1.3	10.4±2.8

For each gene, symbol, LocusLink number, and complete name are shown. MM-39 airway epithelial cells were infected 3 h with "live bacteria" or with "bacterial supernatant" or were not infected (control MM-39 cells). Ratios were expressed using the  $C_T$  method, as fold increased expression of live bacteria or bacterial supernatant conditions relative to control condition. For each condition, sqRT-PCR results are based on the average of three different experiments (means  $\pm$  SD). Although TNF and PTGS1 were not found significantly altered during our different experiments, they were included in the table as they are discussed in the text. This table only represents a selection of genes discussed in the text. A full analysis is available as Supplemental Table S1 at <http://www.microarray.fr/publications/Moreillon.html> and at the *Physiological Genomics* web site.

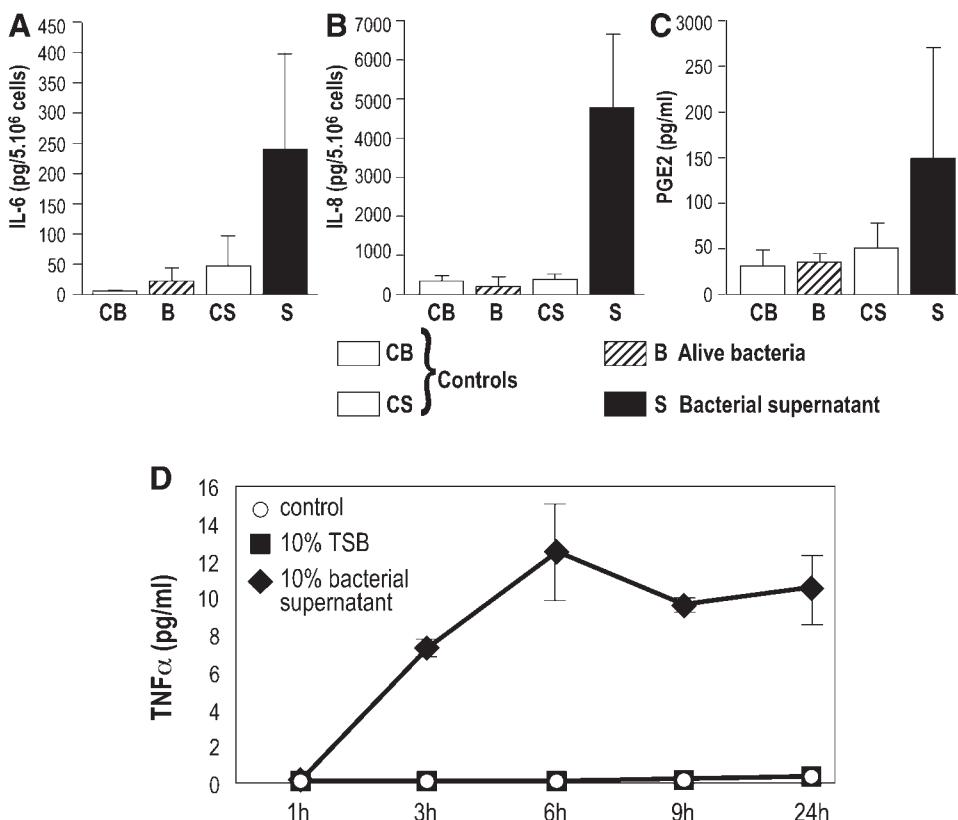
encoded products with anti-apoptotic properties such as PIM and TNFAIP3 were upregulated in both conditions after 3-h interaction. At 3 h, most airway cells incubated with live bacteria or bacterial supernatant exhibited a necrotic phenotype. Apoptosis was only transiently observed 8–10 h after interaction with bacterial supernatant and live bacteria, respectively (Fig. 5).

In both conditions, TNF $\alpha$  was only slightly regulated at the transcriptional level after 3-h interaction with live bacteria or after 1, 3, 6, 9, or 24 h with bacterial supernatant. Secreted TNF $\alpha$  protein was also slightly increased after a 3-h contact with bacterial supernatant (Fig. 4D).

**4) Genes regulated by hypoxia or by oxidative stress.** Some genes mainly regulated in the live bacteria condition (bhhlhb2, MIG-6, TFRC, and EGR1) have been reported in the literature to be induced by hypoxia, through a HIF-1 $\alpha$ -dependent cascade. HIF-1 $\alpha$  was not regulated at the transcriptional level (neither after 3 h of interaction with live bacteria nor after interaction with bacterial supernatant at 1, 3, 6, 9, or 24 h), suggesting a stabilization of HIF-1 $\alpha$  in presence of hypoxia and oxidative stress (23, 24). In line with this hypothesis, expression of the HIF-1 $\alpha$  protein was found increased in MM-39 cells after 3-h interaction with live bacteria and with bacterial supernatant (Fig. 6).

## DISCUSSION

The present study is, to our knowledge, the first report describing the transcriptional host response of human airway epithelial cells after an interaction with live *S. aureus* or with *S. aureus* soluble factors. Parallel analysis of gene expression provides a powerful tool for studying interplay of signals and



**Fig. 4.** ELISA quantification of IL-6 (A), IL-8 (B), PGE<sub>2</sub> (C), and TNF $\alpha$  (D) secretion by MM-39 cells in contact with the bacterial supernatant or with the live bacteria. Results correspond to the means  $\pm$  SD and are representative of four independent experiments performed in duplicate. TNF secretion induced by bacterial supernatant was performed two times.

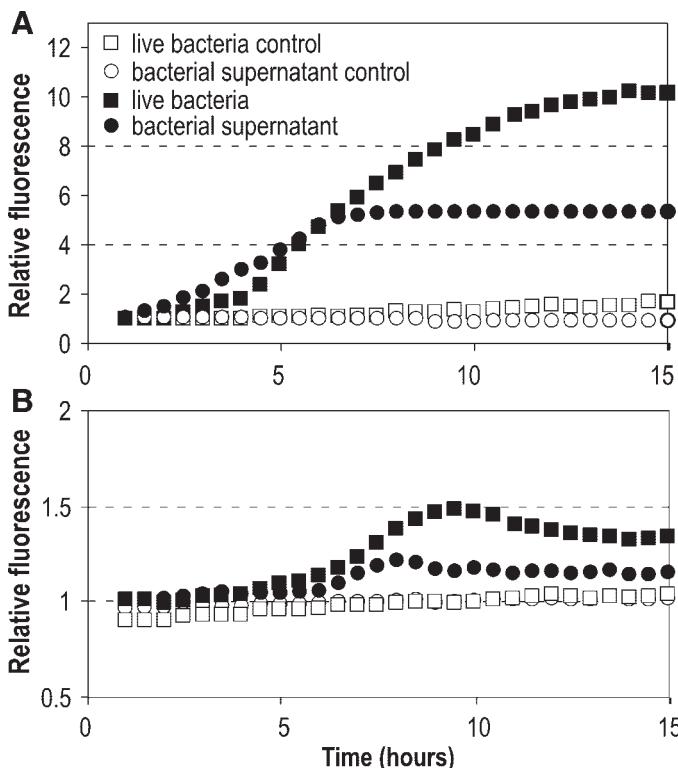


Fig. 5. Time course analysis of necrosis (A) and apoptosis (B) of MM-39 cells over 24 h of interaction with live bacteria or with bacterial supernatant.

transcriptional responses in complex biological systems. Here we have modeled *in vitro* the complex interaction existing during infection of airway epithelium by *S. aureus* and provided information about the major pathways involved in the response to infection.

A first experiment analyzed the interaction of bacterial supernatant with epithelial cells during a time course and was performed using a pangenomic microarray (Fig. 2). This first analysis clearly showed an early alteration (i.e., around 3 h) of many genes encoding proteins implicated in transcription, inflammation, and apoptosis.

To compare the response of epithelial cells with bacterial supernatant and the response of cells with live bacteria, another more specific analysis was performed after 3 h of interaction with either live bacteria and bacterial supernatant. Three reasons made us choose this time point. We first observed that transcriptional response to bacterial supernatant was prominent in the early response to interaction (1, 3, and 6 h) compared with late response (9 and 24 h) (Fig. 2). In contrast with the experiments of Boldrick et al. (6), *S. aureus* bacteria were not heat killed, leading to a potential effect of *in vitro* cytotoxicity and differential bacterial growth rate. We indeed observed that prolonged interaction between live bacteria and airway epithelial cells led to irreversible airway cell damage. Moreover, PBS-washed bacteria were in log-phase growth after a 3-h incubation with MM-39 cells (not shown). During log-phase growth, bacteria synthesize predominantly cell surface virulence factors such as protein A. On the other hand, genes encoding secreted virulence factors, such as  $\alpha$ -toxin, are transcribed at low levels during log-phase growth and are upregulated during the stationary phase of growth (31a, 38).

We anticipated that a 3-h incubation with washed live bacteria would differ significantly from a 3-h incubation with bacterial supernatant, which was largely enriched in soluble virulence factors. We therefore designed our study to discriminate the responses of host cells after a 3-h contact with live bacteria, or with soluble secreted virulence factors without live bacteria. To analyze the different responses between live bacteria and bacterial supernatant, more specific microarray consisting of ~4,200 sequence-verified probes, representing ~1/6th of the protein coding capacity of the human genome was selected. Although the fraction covered by this microarray may appear small, available probes were associated with 2,487 terms of the Gene Ontology database, representing 49% of all annotations for all known human transcripts. Moreover, this microarray was enriched with genes coding proteins implicated in inflammation, infection, differentiation, ion transport, cell signaling, and cell migration.

sqRT-PCR was also performed on a set of ~537 pairs of validated primers. Larger stimulation factors were found with sqRT-PCR than with microarray, in general agreement with previous reports by Gavin et al. (18).

The distinct profiles observed between the live bacteria and bacterial supernatant conditions (only 10% of all SAM-positive genes were common to both) was indicative of different responses of airway epithelial cells in contact with either soluble *S. aureus* factors present in the supernatant of stationary phase bacteria or in contact with log-phase growing bacteria.

To identify relevant metabolic pathways participating to the host response at 3 h, several gene lists were established. Two independent statistical approaches were used. The first one used the classic SAM method, developed by Tusher et al. (49). Since this method hardly takes into account the intensity of the signals, we analyzed our results with a second approach, where probes were sorted according to their intensity level. Probes were selected when their ratio measurements differed significantly from the ratio measurements of the 20 nearest probes (as measured by the intensity), using a *t*-test. Although this test probably captured a few false-positive probes, the corresponding gene list included a majority of genes already identified by the SAM method (64%). The gene list obtained with this method defined a clear-cut distinction between live bacteria and bacterial supernatant (Fig. 3). Overall, the magnitude of alteration of these genes was stronger in the bacterial supernatant than in the live bacteria condition, as well for the number of altered genes as for the amplitude of the stimulation factors.

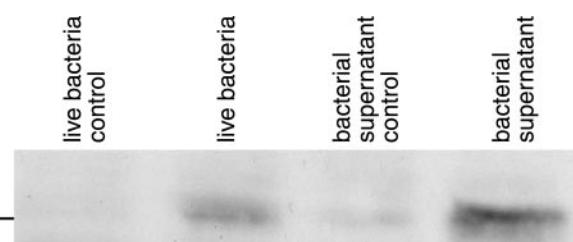


Fig. 6. Increase of HIF-1 $\alpha$  protein expression in MM-39 airway cells after a contact with live bacteria and bacterial supernatant. MM-39 cells were incubated in absence (lane 1, live bacteria control) or in presence (lane 2) of live bacteria (50 bacteria/cell) or were incubated in absence (lane 3) or in presence (lane 4) of bacterial supernatant (dilution 1/10) for 3 h. Samples were resolved by SDS/PAGE and immunodetected with an anti-HIF-1 $\alpha$  antibody.

A second important observation was the upregulation of proinflammatory molecules such as cytokines and chemokines, as previously reported by Boldrick et al. (6).

Analysis of a time course experiment showed that genes associated with the JAK/STAT pathway were upregulated shortly after incubation with bacterial supernatant (Fig. 2). The JAK kinase activity is critical for normal transmission of cytokine and growth factor signals in host cells (42). The chemokines CXCL2, CXCL3, and CCL20 were upregulated, in agreement with a previous report by Kobayashi et al. (26) about the contact of *S. aureus* with human polymorphonucleophils. The release of cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, as well as the chemokine IL-8, was significantly upregulated in the bacterial supernatant condition but not or only slightly in the live bacteria condition. IL-6 and IL-8 interleukins have been extensively identified in response to bacterial infection and during the ensuing inflammation (4, 32, 45, 56). Most of the regulated genes were increased both at mRNA and protein levels and can be under a tight control by the NF- $\kappa$ B complex. Indeed, NF- $\kappa$ B-responsive elements are present on IL-1, IL-6, and IL-8 promoters (28, 30, 36, 39).

Parallel with the downregulation of the leukotriene pathway, there was an increased expression of PGE<sub>2</sub>, correlated with an increased expression of cyclooxygenase (COX-2) in the bacterial supernatant condition. This COX-2 upregulation was in agreement with results found by Rose et al. (43) on A549, and by Lin et al. (31) on human pulmonary epithelial cells. Xie et al. (54) have shown that jun, which is upregulated in the bacterial supernatant condition, can mediate v-src-induced COX-2 gene expression, through its participation to the COX-2 promoter CRE site. This suggests that the activation of jun in the bacterial supernatant condition may contribute to the observed stimulation of COX-2. Additional factors may play a role in the regulation of COX genes. For instance, COX-2 expression is known to be induced by several cytokines (35), and its promoter contains NF- $\kappa$ B binding sites. As for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8, increased transcription of COX-2 was mainly found in the bacterial supernatant condition, consistent with a possible direct regulation by NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B effects are indeed not restricted to *S. aureus*, and many reports indicate similar effects after interaction with gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* (1, 27) or *Shigella flexneri* (40). These other reports attribute a key role to Toll-like receptors (TLR) to initiate this mechanism, and it was interesting to notice an increased transcription of TLR2 in bacterial supernatant condition (Fig. 2).

Boldrick et al. (6) found that most of genes encoding NF- $\kappa$ B/Rel proteins (i.e., NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, relB, cRel, I- $\kappa$ B $\alpha$ ) can be regulated after infections by diverse bacteria. We identified an effect on the NF- $\kappa$ B/Rel complex transcription (NF- $\kappa$ B1/p105, Rel, and NF- $\kappa$ BIE) in bacterial supernatant condition during the time-course experiment (Fig. 2). Unfortunately, this effect was not detected at 3 h, neither by cDNA microarray (Table 2) nor by sqRT-PCR (Table 3). Since Bottero et al. (7) have shown that activation of the NF- $\kappa$ B protein complex closely correlates with the transcriptional level of NF- $\kappa$ B IA, the measurement of its mRNA level appears as a rapid, sensitive, and powerful method to quantify the transcriptional power of NF- $\kappa$ B. The increased expression of NF- $\kappa$ B IA observed in our experiments therefore signed the activation of the NF- $\kappa$ B complex in the bacterial supernatant

condition and to a lesser extent in the live bacteria condition. Bacterial activation of NF- $\kappa$ B is in agreement with results of DiMango et al. (14), who showed that NF- $\kappa$ B was activated after interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and respiratory epithelial cells. We also noticed the activation of many NF- $\kappa$ B-responsive genes as a strong indication of the activation of this cascade.

Expression of several “anti-apoptotic” genes was observed in the bacterial supernatant condition, and, to a lesser extent, in the live bacteria condition. The development of an anti-apoptotic response may appear surprising, since many reports rather suggested pro-apoptotic mechanisms consecutive to infection. This apoptotic response was shown in bovine mammary epithelial cells (MAC-T) (3, 53) and in endothelial cells, via adhesion and internalization of *S. aureus* (33). However, Weinrauch et al. (52) showed that low doses of  $\alpha$ -toxin induce DNA fragmentation and cell death, whereas high doses result in massive necrosis without DNA fragmentation. In agreement with Da Silva et al. (10), who have worked on the same MM-39 cell line, we observed a prominent necrosis phenotype of the MM-39-cells, with a transient apoptotic process 9 h after interaction (Fig. 5).

TNF $\alpha$  expression was not altered at a RNA level (microarray and sqRT-PCR), but TNF $\alpha$  secretion was slightly increased in the bacterial supernatant condition. Under these experimental conditions, TNF $\alpha$  concentration reached 15 pg/ml of MM-39 cell culture medium, whereas it reached almost 1,000 pg/ml in the experiments of Haddad and coworkers (19), when epithelial cells were in contact with *E. coli* LPS. Our results were in agreement with those found by Stout et al. (47), who showed that addition of staphylococcal glycocalyx induced production of PGE<sub>2</sub> and IL-1 by murine peritoneal macrophage, but not of TNF $\alpha$ . The modest increase in TNF $\alpha$  release in our experiment might very well be related to the inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on TNF $\alpha$  secretion in macrophages, which does not affect IL-1 release (16, 29, 46). Bacterial supernatant also induced an upregulation of the gene encoding BIRC3 (AIP1), which can act as a repressor of TNF signaling by binding to the tumor necrosis factor receptor-associated factors TRAF1 and TRAF2.

In conclusion, our results show that the transcriptional response of airway epithelial cells to *S. aureus* differ markedly when cells interact with live bacteria in log-phase growth or with soluble factors from stationary growth phase. The activation of the JAK/STAT pathway, as well as NF- $\kappa$ B and AP-1 represent major activating pathways after stimulation by soluble virulence factors. It accounts for the induction of proinflammatory cytokines such as IL-8 as well as inflammatory mediators such as PGE<sub>2</sub>. These “stereotypic” properties are consistent with many other studies performed with other bacteria and other cells. These results therefore appear a posteriori as a good validation of our experimental approach. Besides, our study shows that additional transcription factors, such as HIF-1 $\alpha$ , may play a role in the orchestrated response of airway cells to *S. aureus* infection. *S. aureus* infection also lead cells to a necrotic, rather than an apoptotic cell death. One important aspect about *S. aureus* infection concerns its capacity to favor subsequent infections by gram-negative bacterial infections such as *P. aeruginosa* in cystic fibrosis patients. We anticipate that upregulation of inflammatory mediators and/or any other modifications observed in the present study may provide in-

teresting new pharmacological targets to improve the clinical status of *S. aureus* infected patients.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Géraldine Rios for excellent technical assistance in microarray experiments, Jean Marie Zahm (INSERM Reims) for excellent assistance in video microscopy imaging, Franck Aguilà, and Jacqueline Kervella for editing the manuscript, and Dr. Yves Berthiaume and Dr. Patrick Brest for helpful discussions.

#### GRANTS

This work was performed thanks to support from the French Association Vaincre la Mucoviscidose, GlaxoSmithKline, the GIP Aventis, CNRS, Inserm, and the French Ministry of Industry (réseau GenHomme). Microarray experiments were carried out using the facilities of the Nice-Sophia Antipolis Transcriptome Platform of the Marseille-Nice Genopole.

#### REFERENCES

- Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, and Svanborg C. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun* 61: 602–609, 1993.
- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, and Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 66: 336–342, 1998.
- Becker MN, Sauer MS, Muhelebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Vergheese MW, and Randell SH. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 645–653, 2004.
- Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, Gingras TR, McNamara N, Lemjabbar H, Basbaum C, and Relman DA. From the cover: the transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13847–13852, 2000.
- Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE, Botstein D, Staudt LM, Brown PO, and Relman DA. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 972–977, 2002.
- Bottero V, Imbert V, Frelin C, Formento JL, and Peyron JF. Monitoring NF-κB transactivation potential via real-time PCR quantification of IκB-α gene expression. *Mol Diagn* 7: 187–194, 2003.
- Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32, Suppl: 490–495, 2002.
- Coraux C, Kilezky C, Polette M, Hinnrasky J, Zahm JM, Devillier P, De Bentzmann S, and Puchelle E. Airway epithelial integrity is protected by a long-acting β2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 605–612, 2004.
- Da Silva MC, Zahm JM, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, Milliot M, De Assis MC, Hologne C, Bonnet N, Merten M, Plotkowski MC, and Puchelle E. Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L543–L551, 2004. First published May 14, 2004; doi:10.1152/ajplung.00256.2003.
- Dayem M, Moreilhon C, Magnone V, Christen R, Ponzi G, and Barby P. Early gene expression in wounded human keratinocytes revealed by DNA microarray analysis. *Comp Funct Genom* 4: 47–55, 2003.
- de Bentzmann S, Roger P, and Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J* 9: 2145–2150, 1996.
- Delmotte P, Degroote S, Merten M, Bernigaud A, Van Seuningen I, Figarella C, Roussel P, and Perini JM. Influence of culture conditions on the alpha 1,2-fucosyltransferase and MUC gene expression of a transformed cell line MM-39 derived from human tracheal gland cells. *Biochimie* 83: 749–755, 2001.
- DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, and Prince A. Activation of NF-κB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101: 2598–2605, 1998.
- Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Truong F, Eckmann L, and Kagnoff MF. NF-κB is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol* 163: 1457–1466, 1999.
- Fieren MW, van den Bemd GJ, Ben-Efraim S, and Bonta IL. Prostaglandin E2 inhibits the release of tumor necrosis factor-α, rather than interleukin 1 beta, from human macrophages. *Immunol Lett* 31: 85–90, 1992.
- Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, and Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3: 33–41, 2002.
- Haddad JJ and Land SC. Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis. *Br J Pharmacol* 135: 520–536, 2002.
- Hosack D, Dennis G, Sherman B, Lane H, and Lempicki R. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4: R70, 2003.
- Hutchison ML and Govan JR. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 1: 1005–1014, 1999.
- Ichikawa JK, Norris A, Bangera MG, Geiss GK, van't Wout AB, Bumgarner RE, and Lory S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9659–9664, 2000.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, and Kaelin WG Jr. HIFα targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292: 464–468, 2001.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468–472, 2001.
- Kerr C. Experimental design for gene expression microarrays. *Technical Report (Biostatistics)* 2: 183–201, 2001.
- Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, and DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10948–10953, 2003.
- Kreft B, Bohnet S, Carstensen O, Hacker J, and Marre R. Differential expression of interleukin-6, intracellular adhesion molecule 1, and major histocompatibility complex class II molecules in renal carcinoma cells stimulated with S fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 61: 3060–3063, 1993.
- Kunsch C and Rosen CA. NF-κappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 13: 6137–6146, 1993.
- Lehmann V, Benninghoff B, and Droege W. Tumor necrosis factor-induced activation of peritoneal macrophages is regulated by prostaglandin E2 and cAMP. *J Immunol* 141: 587–591, 1988.
- Liebermann TA and Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-κappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10: 2327–2334, 1990.
- Lin CH, Kuan IH, Lee HM, Lee WS, Sheu JR, Ho YS, Wang CH, and Kuo HP. Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-κappa B-dependent pathway. *Br J Pharmacol* 134: 543–552, 2001.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520–532, 1998.
- Massion PP, Hebert CA, Leong S, Chan B, Inoue H, Grattan K, Sheppard D, and Nadel JA. *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil recruitment by stimulating interleukin-8 production in dog trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 268: L85–L94, 1995.
- Menzies BE and Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 66: 5994–5998, 1998.
- Merten MD, Kammouni W, Renaud W, Birg F, Mattei MG, and Figarella C. A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 520–528, 1996.
- Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, and Vane JR. Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 113: 1008–1014, 1994.
- Mori N and Prager D. Transactivation of the interleukin-1α promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins. *Blood* 87: 3410–3417, 1996.
- Moser C, Weiner DJ, Lysenko E, Bals R, Weiser JN, and Wilson JM. β-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun* 70: 3068–3072, 2002.

38. Novick RP and Muir TW. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2: 40–45, 1999.
39. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18: 6853–6866, 1999.
40. Pedron T, Thibault C, and Sansonetti PJ. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J Biol Chem* 278: 33878–33886, 2003.
41. Pilewski JM and Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79: S215–255, 1999.
42. Rane SG and Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19: 5662–5679, 2000.
43. Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hanze J, Duemmer N, Grandel U, Seeger W, and Ghofrani HA. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus* alpha-toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L207–L214, 2002; doi:10.1152/ajplung.00156.2001.
44. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, and Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374–378, 2003.
45. Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, and Klein JP. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect Immun* 63: 1380–1386, 1995.
46. Spengler RN, Spengler ML, Lincoln P, Remick DG, Strieter RM, and Kunkel SL. Dynamics of dibutyryl cyclic AMP- and prostaglandin E2-mediated suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha gene expression. *Infect Immun* 57: 2837–2841, 1989.
47. Stout RD, Li Y, Miller AR, and Lambe DW Jr. Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production. *Infect Immun* 62: 4160–4166, 1994.
48. Tummler B and Kiewitz C. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol Med Today* 5: 351–358, 1999.
49. Tusher VG, Tibshirani R, and Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5116–5121, 2001.
50. Verma QLIM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725–734, 2002.
- 50a. Voss A and Doebbeling BN. The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrobial Agents* 5: 101–106, 1995.
51. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, and Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18: 605–617, 2003.
52. Weinrauch Y and Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53: 155–187, 1999.
53. Wesson CA, Deringer J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, and Trumble WR. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect Immun* 68: 2998–3001, 2000.
54. Xie W and Herschman HR. v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* 270: 27622–27628, 1995.
55. Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, and Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 3: research0062, 2002.
56. Yao L, Lowy FD, and Berman JW. Interleukin-8 gene expression in *Staphylococcus aureus*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 64: 3407–3409, 1996.



### **ARTICLE 3 : REPONSES DIFFERENTIELLES DES CELLULES RESPIRATOIRES HUMAINES NORMALES ET MUCOVISCIDOSIQUES AUX FACTEURS DE VIRULENCE SOLUBLES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.**

La mucoviscidose (CF) est la maladie génétique la plus répandue de la population caucasienne. Elle est caractérisée entre autre, par une inflammation respiratoire chronique et des infections bactériennes, notamment par *S. aureus* dans les premières années de vie des patients puis par *P. aeruginosa*.

Après avoir observé que les facteurs de virulence de *S. aureus* induisent une réponse plus importante que *S. aureus* vivant chez les cellules épithéliales respiratoires humaines normales (article 2), nous nous sommes posés la question de savoir si la dynamique de la réponse transcriptionnelle des cellules aux facteurs de virulence solubles de *S. aureus* était différente pour les cellules épithéliales respiratoires humaines CF ou non-CF.

Dans cet article nous avons réalisé une dynamique d'interaction après 1, 3, 6, et 9 heures. Les interactions ont été réalisées entre les cellules épithéliales respiratoires MM-39 (lignée de cellules épithéliales respiratoires glandulaires non-CF fournies par M. Merten) ou KM-4 (lignée de cellules épithéliales respiratoires glandulaires CF fournies par M. Merten) et le surnageant (2 ou 20% de FV) de *S. aureus* (souche de référence 8325-4). La vidéomicroscopie associée au marquage des cellules par la sonde fluorescente iodure de propidium a permis d'analyser la perméabilité cellulaire sur une période de 20h d'incubation. Cette étude a montré que 20% de FV de *S. aureus* provoque une altération de la perméabilité cellulaire qui débute à 6h chez les cellules non-CF et à 9h chez les cellules CF. 2% de FV de *S. aureus* par contre ne provoque pas d'altération de la perméabilité cellulaire chez les cellules non-CF et les cellules CF au cours d'une interaction de 20h. Cette étude préliminaire nous a conduit à analyser la réponse transcriptionnelle par puces à ADN des cellules après interaction avec 2% de FV de *S. aureus*. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR et la technique ELISA a permis l'analyse de la sécrétion de différents facteurs de l'inflammation.

Nous avons montré que les cellules épithéliales respiratoires normales et CF répondent différemment aux FV de *S. aureus*. Il existe une régulation différentielle des gènes codants pour certains facteurs de transcription chez les cellules non-CF et les cellules CF. Le gène du

facteur de transcription ATF3 (activating transcription factor 3) est « up-régulé » dès la première heure d’interaction entre les cellules épithéliales respiratoires et les FV de *S. aureus*. Cette « up-régulation » est maintenue jusqu’à 9h d’interaction dans les cellules non-CF mais elle est rapidement diminuée (dès 3h) dans les cellules CF. Un profil de régulation similaire est observé pour les gènes codant pour les facteurs de transcription TLR2 et NF-κBIA. Il existe également une régulation différentielle des gènes codants pour certains facteurs de l’inflammation dans les cellules non-CF et les cellules CF. On observe une forte « up-régulation » du gène de l’IL-8 de façon continue dans les cellules non-CF et de façon transitoire (jusqu’à 6h) dans les cellules CF. On observe une faible « up-régulation » du gène de l’IL-6 de façon transitoire dans les cellules non-CF et les cellules CF (diminution à partir de 6h et 9h respectivement). L’expression du gène de l’IL-1 $\alpha$  est augmentée de façon continue dans les cellules non-CF et de façon transitoire dans les cellules CF (augmenté à 1h puis diminution jusqu’à 9h). On observe une forte « up-régulation » du gène COX2 dans les cellules non-CF et une faible « up-régulation » transitoire dans les cellules CF (jusqu’à 3h). Le gène pro-apoptotique INHBA (inhibin bêta A) est également régulé de manière différente dans les cellules non-CF et les cellules CF avec une « up-régulation » continue dans les cellules non-CF et transitoire dans les cellules CF (diminution à 9h). Il existe également une régulation des gènes codant pour les protéines liant le calcium, S100A8 et S100A9 (qui ont été identifiées comme marqueurs de la mucoviscidose), qui est augmentée dans les cellules CF alors qu’il n’y a pas de régulation de ces gènes dans les cellules non-CF.

Cette étude montre également que la sécrétion d’IL-8, IL-6 et TNF- $\alpha$  dans les cellules CF incubées avec les FV de *S. aureus* est dépendante du temps puisqu’elle augmente jusqu’à 6h d’interaction puis diminue après 9h d’interaction. Il existe également une augmentation significative, dans les cellules CF par rapport aux cellules non-CF, de la sécrétion d’IL-8, d’IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Contrairement aux cellules non-CF, le taux de sécrétion de PGE2 dans les cellules CF par rapport aux cellules CF non-stimulées est négatif et reste constant durant toute la période d’incubation.

Ces résultats montrent que les réponses précoce transcriptionsnelles et traductionnelle aux FV de *S. aureus*, indépendamment de toute perturbation de la perméabilité membranaire, sont différentes lorsque l’on compare les cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF. Les cellules CF sont plus sensibles que les cellules non-CF aux FV de *S. aureus*, et ceci plus particulièrement en ce qui concerne la régulation des facteurs pro-inflammatoires impliqués

dans la régulation de la réponse immunitaire innée. Ces résultats suggèrent que l'épithélium respiratoire mucoviscidosique répond plus rapidement et de façon plus importante à l'agression bactérienne que l'épithélium respiratoire non-CF. Il apparaît donc important, pour mieux comprendre les réponses cellulaires précoce et tardive à l'agression bactérienne, de réaliser des études dynamiques, tant pour l'étude des réponses transcriptionnelles que traductionnelles.

## **Responses of normal and cystic fibrosis human airway cells to *S. aureus* virulence factors**

Delphine Gras<sup>1\*</sup>, Chimène Moreilhon<sup>2,3\*</sup>, Jean-Marie Zahm<sup>1</sup>, Géraldine Rios<sup>2,3\*</sup>, Edith Puchelle<sup>1\*</sup>, and Pascal Barbry<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, U 514, Reims, F-51092, France ; Université Reims Champagne Ardenne, IFR 53, Reims, VF-51097, France ;

<sup>2</sup> CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097, Sophia Antipolis, F06560, France;

<sup>3</sup> Université de Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097, Sophia Antipolis, F06560, France

\* DG, CM, GR, EP and PB equally contributed to this work

 To whom correspondence should be addressed:

Pascal Barbry PhD: Phone: 00-33-4-93-95-77-93; Fax: 00-33-4-93-95-77-94;

E-mail: [barbry@ipmc.cnrs.fr](mailto:barbry@ipmc.cnrs.fr)

## **Summary**

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene. Chronic lung infection and inflammation are two hallmarks of CF. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the first pathogens identified in CF lungs. While *S. aureus* produces a large spectrum of virulence factors (VF) that are responsible for airway epithelial cell damage, the differences observed between normal and CF airway epithelial cells are currently unknown. The impact of *S. aureus* VF on the host response was evaluated after incubating non-CF and CF airway cells (MM-39 and KM-4 cell line, respectively). IL-8, IL-6 and TNF-alpha secretions were highly increased in CF cells, while PGE2 secretion was decreased, consistent with a pro-inflammatory phenotype of CF cells. However, analysis of the cells by videomicroscopy did not reveal any major difference in permeability between CF and non-CF cells. Gene expression profiling was used in order to quantify, at a transcriptional level, differences between CF and non-CF cells, after incubation with a low concentration of *S. aureus* virulence factors. A large part of infection-regulated transcripts was associated to the innate immune response, with activation of the TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B dependent pathways. While gene expression of several cytokines, such as IL-8 and IL-6 was altered during infection, the RNA expression of IL1- $\alpha$  and IL1- $\beta$  was already early detected. The S100 calcium binding proteins A8 and A9 (also known collectively as the CF antigen) as well as S100A11 were stimulated in CF cells, and to a lesser extent in non-CF cells, probably in association with a TNF $\alpha$ -dependent mechanism.

Key words: *S. aureus*, virulence factors, cystic fibrosis, airway epithelial cells, cellular permeability, transcriptional analysis, cytokine secretion.

## **Introduction**

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease caused by mutations of the gene encoding the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). CF pathogenesis is characterized by an altered fluid homeostasis at the airway surface liquid leading to dehydration, impaired mucociliary clearance, chronic inflammation and bacterial infection. Several studies have been performed to understand the influence of CFTR on the airway cells or tissues. Most of them support the concept that excessive inflammatory responses occur in the CF lung, even in the absence of detectable infection. Changes in levels of IL-8 and other proteins mediating inflammatory signalling as well as NF- $\kappa$ B have been associated with CF, in the absence of infection, raising the possibility that abnormalities in CFTR may constitutively alter pathways mediating inflammation [5].

CF is also characterized by chronic bacterial infections responsible for the morbidity and mortality of the disease. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), the predominant pathogen identified in the first years of life of CF patients [12, 25], generally precedes the airway chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [9, 17]. *S. aureus*, is known as a commensal pathogen of the nasal epithelium. However, the knowledge of the specific roles of *S. aureus* in the progression of CF disease is still very limited. It is suspected that early colonization of *S. aureus* may damage the CF airway epithelium and may lead to an excessive inflammatory response as earlier reported for *P. aeruginosa* in CF airway graft [27]. The pathogenicity of *S. aureus* is due to numerous toxins, exoenzymes, adhesins and immune modulating proteins that are produced and released in the airway lumen. *S. aureus* cell wall associated proteins as well as soluble virulence factors secreted during the late-phase growth can cause severe airway epithelial damage [4, 7, 8].

Using dynamic videomicroscopy, we have earlier shown a time and bacterial-concentration dependent increased effect of *S. aureus* on adherence, internalization and

associated cell damage in non-CF airway cells. During the first hours of infection (1 to 4hrs), we observed a defense response of the airway cells against *S. aureus* whereas in the later phases (4 to 24hrs), the number of airway cells with altered membrane permeability was markedly increased [4]. We have also shown that *S. aureus* soluble virulence factors induce higher transcriptional response, as compared to alive bacteria, in particular with an up-regulation of many pro-inflammatory genes that is accentuated during the early phase of interaction (1-6 hrs), compared to the late response (9-24 hrs) [20]. Transcriptional analysis of airway epithelial cells response to *P. aeruginosa* has shown that the early inflammatory response is characterized by expression of genes involved in epithelial barrier formation and host defense [30]. To our knowledge, the influence of *S. aureus* on the transcriptional response of airway epithelial cells according to the CF genotype has not yet been studied, and no data comparing the time-dependent response of CF *versus* non-CF airway cells during early *S. aureus* interaction has been reported. To that end, we analyzed the time-dependent (0 to 20 hrs) and concentration-dependent (2 and 20%) effects of soluble virulence factors (VF) from a reference 8325-4 *S. aureus* strain on non-CF airway cells (MM-39 cell line) and CF airway cells (KM-4 cell line). Combining DNA microarray and ELISA techniques, we analysed non-CF and CF airway cell transcriptional and translational responses to *S. aureus* VF after 1, 3, 6 and 9 hrs of infection.

## **Materials and Methods**

### Airway Epithelial Cell Culture

MM-39 or KM-4 (non-CF and CF transformed human tracheal gland cell lines respectively) were cultured at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere on culture plates coated with 2% type I collagen. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) F-12 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) supplemented with 1% Ultroser G serum substitute (Biosepra; Villeneuve, La Garenne, France), glucose (10 g/l), sodium pyruvate (0.33 g/l), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), and amphotericin B (2 µg/ml) as described by Merten et al. [19]. Cells were seeded at a density of 10<sup>6</sup> cells/ml, and experiments were performed at confluence. Two hours before each experiment, cells were washed 3 times with PBS and cultured in DMEM-F12 without antibiotics and without Ultroser G.

### Bacterial Strain and Culture Conditions

*S. aureus* strain (8325-4), a reference laboratory strain was a gift from T. J. Foster (Department of Microbiology, Dublin, Ireland). Bacteria were grown at 37°C overnight in Trypticase Soy Broth (TSB) under agitation to obtain stationary-phase bacteria. Bacterial culture was centrifuged 15 min at 4°C and supernatant was filtered (0.2 µm pore size) and aliquots were stored at -80°C. These supernatants containing the soluble virulence factors (VF) were controlled for their sterility by plating on solid agar.

Non-CF and CF airway epithelial cells were incubated with either 2% or 20% of *S. aureus* VF. TSB medium was used as a negative control in all experiments.

## Videomicroscopy analysis

A fluorescence staining method using propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) was used to study the necrosis of non-CF and CF airway epithelial cells when incubated with *S. aureus* virulence factors. Propidium iodide only penetrates into cells with damaged membranes, staining the cells red. Briefly, after cell culture confluence, medium was removed from the culture plates, and cells were washed three times with sterile PBS and incubated with 2% or 20% of *S. aureus* virulence factors and propidium iodide (1 µl/ml). Culture dishes were placed on the stage of an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an environmental chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% relative humidity) and with a charge-coupled device video camera (Coolsnap Fx; Roper Scientific, Tucson, AZ). Using Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA) software, we recorded time-lapse images every 30 min for 20 hrs as previously described [4]. At each time point, a phase-contrast image and a fluorescent image was recorded. Red fluorescence staining corresponding to propidium iodide was obtained through a 490-nm excitation filter/635-nm emission filter. Variations of the propidium iodide fluorescence intensity were expressed as the ratio of the fluorescence intensity at a given time to the initial fluorescence intensity.

## Microarray Technique

### *RNA extraction and array preparation*

At the end of each incubation period, cells were washed with PBS (0.1 M), and RNA was extracted with High Pure RNA Isolation Kit (Roche), according to the manufacturer's instructions.

Time course experiments (1, 3, 6 and 9 hrs) were performed using a home made microarray consisting ~25,000 distinct oligonucleotide probes covering most of the known human transcripts [13]. The final list of the 30,046 probes spotted on the microarray is available online <http://www.microarray.fr:8080/mediante>. All probes had a normalized length of ~51 pb (ranging from 51 to 52 pb), was resuspended in 35% DMSO, 100mM potassium phosphate at a final oligonucleotide concentration of 50 $\mu$ M. Microarrays were printed with a ChipWriter Pro (Bio-Rad) on commercial Hydrogel slides (Schott). Each oligonucleotide was spotted one time on each slide. Before hybridization, microarrays were rinsed in 0.2% SDS for 1 min, then for 1 min in distilled water, followed by 45 min in a 42°C blocking solution (5 X SSC; 0.1 % SDS; 0.1 mg/mL BSA). The arrays were rinsed in distilled water for 1 min, and spun dry.

*RNA labeling and hybridization.*

2  $\mu$ g of total RNA was amplified with the Amino Allyl MessageAmp aRNA kit (Ambion ref. 1752) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after first and second strand cDNA synthesis, cDNA was purified using the PCR purification kit (Qiagen) and concentrated with Millipore Microcon columns YM-30 (ref. 42410). cDNA was then transcribed *in vitro* with aaUTP (amplification) and purified using the PCR purification Kit (Qiagen ref. 28106). 5  $\mu$ g of the resulting aRNA was then dried under vacuum and coupled with either Cy3 or Cy5 monofunctional reactive dyes (Amersham). Unreacted dyes were quenched with 1M hydroxylamine. Dye labelled aRNAs were then repurified (PCR purification Kit Qiagen). Cy3 and Cy5 corresponding aRNA were pooled, concentrated with Millipore Microcon columns YM-30, and fragmented with the Ambion aRNA Fragmentation Reagents (ref. 8740) according to the manufacturer instructions. Fragmented Cy3 and Cy5 labelled aRNA were then added in 250 $\mu$ l ChipHybe 80 (Ventana ref. 760-127).

### *Hybridization*

Microarrays were hybridized in a Agilent hybridization station, according to the manufacturer protocol. After pre-treatment of microarrays, labelled reactions were added on slides. After 10 min denaturation at 70°C, hybridization was performed for 10 hrs at 48°C. Arrays were then washed according to Le Brigand et al. [14].

Microarrays were scanned with a ScanArray Express (version 2.0.19 microarray acquisition system; Packard BioScience, Rungis, France). The two red and green lasers operated at 633 nm and 543 nm to excite Cy5 and Cy3, respectively. The intensity was measured at 670 nm for Cy5 and 570 nm for Cy3. Laser power was set to 100%, and Photomultiplicator (PMT) power was set at 65% for all slides reading. Separate 16 bit TIFF images were obtained for Cy3 and Cy5.

### *Bioinformatic Analysis*

TIFF images containing the data from each fluorescence channel were quantified with the GenePix Pro 5.0 program (Axon Instruments) using an "irregular features" quantification method. Lowess normalization was performed using the Bioconductor program (version 6.1). Genes with a low intensity were discarded (i.e. those characterized by a 75th percentile intensity of less than 1,000 for all measurements).

Ontologies attached to each gene were then used to classify altered genes according to main biological themes. For that, we used Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) program, available at <http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm>, MEDIANTE, a local database containing diverse information about our probe sets (<http://www.microarray.fr/mediante/index?language=en>), and Ingenuity Pathways (<http://www.ingenuity.com>).

The entire microarray procedure was done independently three times for each experimental condition.

#### ELISA assay

Non-CF and CF cells were incubated with 2 % of *S. aureus* VF. Supernatants were collected at 1, 3, 6 and 9 hrs and IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2 concentrations were determined. The enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISA) for IL-8 (R&D systems, ELISA Quantikine ref. D8000C), IL-6 (R&D Systems, ELISA Quantikine ref. D6050) and TNF- $\alpha$  (R&D Systems, ELISA Quantikine HS ref. HSTA00C) were performed according to the manufacturer's instructions: all reagents, samples, and standards were prepared as instructed and 100 $\mu$ l (for IL-8 and IL-6) or 50 $\mu$ l (for TNF- $\alpha$ ) of assay diluent was added to each well of the 96 wells microplate. 50 $\mu$ l (for IL-8) or 100 $\mu$ l (for IL-6) or 200 $\mu$ l (for TNF- $\alpha$ ) of standard, control or samples were added to each well and incubated for 2hrs (for IL-8 and IL-6) or 3hrs (for TNF- $\alpha$ ). Microplate was washed 4 times with wash buffer and 100 $\mu$ l (for IL-8) or 200 $\mu$ l (for IL-6 and TNF- $\alpha$ ) of conjugate was added to each well and incubated for 1hr (for IL-8) or 2hrs (for IL-6 and TNF- $\alpha$ ). Microplate was washed 4 times and 200 $\mu$ l (for IL-8 and IL-6) or 50 $\mu$ l (for TNF- $\alpha$ ) of substrate solution was added to each well and incubated for 30min (for IL-8) or 20min (for IL-6) or 1hr (for TNF- $\alpha$ ) protected from light. 50 $\mu$ l of amplifier solution was added to each well and incubated for 30min (for TNF- $\alpha$ ). 50 $\mu$ l of stop solution was added to each well and optical density was determined, using a Xenius microplate spectrophotometer (SAFAS, MC Monaco) set to 450nm (for IL-8 and IL-6) or 490 nm (for TNF- $\alpha$ ).

PGE2 ELISA (R&D Systems, ELISA HS ref. DE2100) was also performed according to the manufacturer's instructions: all reagents, samples, and standards were prepared as instructed

and 100 $\mu$ l of standard or samples were added to each well. 50 $\mu$ l of PGE2 HS conjugate was added to each well. Then 50  $\mu$ l of PGE2 HS antibody solution was added to each well and incubated for 20hrs at 4°C. Microplate was washed 3 times and 200 $\mu$ l of pNPP substrate was added to each well and incubated for 1hr at 37°C. 50 $\mu$ l of stop solution was added to each well and optical density was determined, using a Xenius microplate spectrophotometer (SAFAS, MC Monaco) set to 405nm

Data were expressed as nanograms per milliliter (sensitivity:  $\geq$ 7.5 pg/ml for IL-8;  $\geq$ 0.7 pg/ml for IL-6;  $\geq$ 0.12 pg/ml for TNF- $\alpha$  and  $\geq$ 8.26 pg/ml for PGE2).

#### Statistical analysis

Results were expressed as means  $\pm$  SD of data obtained in at least three independent experiments. Statistical significance was set at a *P* value  $<$ 0.05, determined by the variance analysis test (ANOVA).

## **Results**

### *Dynamics of cellular membrane permeability during non-CF and CF airway cells incubation with S. aureus virulence factors*

In order to study the airway epithelial cell membrane integrity according to *S. aureus* VF concentration, we first performed a dynamic imaging of the airway non-CF and CF cell membrane permeability over a course of 20 hrs interaction with 2% or 20% *S. aureus* VF. As shown in figure 1, when incubated with VF at 2%, the time-dependent curve of cellular permeability in non-CF (Fig. 1a) and CF (Fig. 1b) cells was not significantly different compared to the TSB control medium showing that the integrity of the airway cells was preserved. The time course changes in the cellular permeability after a 20 % VF incubation were markedly different. In non-CF cells (Fig. 1a), no change in cellular permeability was observed during the 3 first hrs of incubation but progressively appeared after 3 hrs and significantly increased at 6hrs ( $p = 0.0001$ ) and 9hrs ( $p <0.0001$ ) compared to control. In CF cells, alterations in cellular permeability appeared at 9 hrs and then markedly increased (Fig. 1b).

### *Transcriptional differences between non-CF cells and CF cells*

Before studying the effect of *S. aureus* on the transcriptome of the cells, we first compared the transcriptome of MM-39 (non-CF) and KM-4 (CF) cells. After RNA extraction, RNAs were reverse transcribed into fluorescently labeled cDNAs. Samples were hybridized to human oligonucleotide microarrays comprising 30,046 probes, corresponding to about 25,000

distinct human transcripts, and then analyzed according to standard protocols (see EXPERIMENTAL PROCEDURES for microarray procedures).

Figure 2 shows an MA-plot comparing the average signal intensities between MM39 and KM4 epithelial cells. While some probes clearly exhibit a difference between the two cell lines, no large difference in gene expression was associated with specific chromosomal localizations, suggesting the absence of massive chromosomal rearrangements (data not shown).

However, many transcripts were differentially expressed with a ratio superior to 2 between the two cell types (Table 1). EASE program was also performed on this gene list.

EASE analysis revealed many genes implicated in "endopeptidase inhibitor activity" (CSTA; GALNT5; SERPINA3; SERPING1; SMAP; SPINT1; SPINT2; TIMP3; WFDC2) or implicated in "cytoplasm organization and biogenesis" (ABLIM1; ADRB2; ARHGDI; DCTN6; DDX1; GSN; ITGA6; K-ALPHA-1; KRT23; KRT4; KRT6E; PPP2CA; PSAP; RPL22 ) that were more expressed in non-CF cells compared to CF cells (both with a EASE score = 0.02).

Moreover, interleukins IL1A, IL1RN, IL20RA, S100 calcium binding protein S100A2, S100A7, S100A9, S100A14, S100P, prostaglandin synthases PTGES, PTGES3, PTGS2 as well as integrin ITGB1 were more expressed in non-CF cells compared to CF cells.

In opposite, EASE analysis revealed many genes implicated in "response to external stimulus" (ABCA3; C1S; C7; CALML3; CCL2; CD3G; CEACAM5; CEBPE; COL11A1; COL11A2; CR2; EFEMP1; FBN1; G1P2; GNLY; HLA-DOA; HLA-DPA1; HLA-DQB1; HLA-DQB2; HLA-DRB3; IGHG3; IGJ; IGSF6; IL4; ITGB2; KRTAP4-14; KRTAP4-5; MITF; MTND4L; NPY1R; PMP22; PTX3; SAA1; SAA2; SELL; TLR7; TLR9; TMPRSS3; TNFSF13B; VPREF1; WFS1) that were more expressed in CF versus non-CF cells (EASE score = 0.02).

Many transcripts encoding collagen polypeptides like COL5A1, COL6A1, COL9A3 as well as syndecan 2 (SDC2) were more expressed comparing the KM-4 versus MM-39 cells.

10 transcription factors differed between MM-39 (non-CF) cells and KM-4 (CF) cells. They are also reported in Table 1.

*Dynamic transcriptional response of non-CF and CF cells after *S. aureus* VF incubation*

In order to compare the dynamic transcriptional response of non-CF and CF airway cells following incubation with *S. aureus* VF, we selected the 2% VF experimental condition where the epithelial cells did not express a cellular permeability. The non-CF and CF cells were continuously exposed to 2% of *S. aureus* VF for 1, 3, 6 or 9 hrs. This dynamic study performed at a low concentration of *S. aureus* VF (2 %) allowed discriminating early and transiently activations from continuous activations of many genes involved in transcription, inflammation, apoptosis and calcium binding proteins.

Table 3 lists the genes that were significantly up or down-regulated during CF and non-CF cell incubation with 2 % of *S. aureus* VF at 1, 3, 6, and 9 hrs. Results are expressed as ratios representing the genes intensities relative to “control” (gene expression at similar time points).

#### Inflammation

Transcripts that were significantly regulated in at least 2 time points more in one cell type compared to the other are reported in table 3.

Gene list specific for each cell type were then assessed in comparison with the list of all genes that were at least significantly regulated in one time point whatever the cell type by EASE program.

EASE analysis revealed many genes with a GO biological process related to “defence or immune response” (BCAP31; BF; HRH1; NFKB1; S100A8; and SAA2) were more regulated in CF cells compared to non-CF cells (EASE score =0.15).

The gene encoding TLR2 was up-regulated in the non-CF and CF airway cells but we observed a continuous up-regulation for the non-CF cells and a transient up-regulation in the CF cells (increase up to 6hrs and decrease at 9 hrs).

Whereas IL-8 gene was highly up-regulated in a continuous manner in non-CF cells, a transient up-regulation (up to 6hrs) was observed for CF cells, followed by decrease at 9hrs (Fig. 3 and Table 1). IL-6 gene was slightly up-regulated in a transient manner in non-CF and CF cells (up-regulation up to 3hrs and decrease at 6 and 9 hrs)(Fig.3 and Table 1). IL-1  $\alpha$  gene was up-regulated in a continuous manner in non-CF cells and up-regulated in a transient manner in CF cells (up-regulation at 1hr and decrease up to 9hrs). The prostaglandin synthase 2 (PTGS2 or COX2) was highly up-regulated in non-CF cells and slightly up-regulated and in a transient manner in CF cells (Fig.3 and Table 1). Genes implicated in the control of the inflammatory response such as serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 (SERPINA3) were up-regulated in non-CF cells whereas they were not regulated in CF cells.

#### Transcription factors

A marked up-regulation of the activating transcription factor ATF3 gene was observed early (1 hr) after *S. aureus* VF incubation but, opposite to non-CF cells where the up-regulation was sustained, a rapid down-regulation was seen after 3 hrs in CF cells. A similar transcriptional profile was observed for NF- $\kappa$ B. The NF- $\kappa$ B complex activation was shown as an up-regulation of NF- $\kappa$ BIA in non-CF cells and a transient up-regulation in CF cells (up-regulation up to 6 hrs and decrease at 9 hrs) (Fig.3 and Table 1).

### Apoptosis

Pro-apoptotic genes as inhibin, beta A (INHBA) was up-regulated in a continuous manner in non-CF cells and in a transient manner in CF cells (up-regulation up to 6hrs and decrease at 9hrs).

### Calcium binding proteins

Calcium binding proteins S100A8 and S100A9 were up-regulated in a continuous manner in CF cells whereas there was no variation of the S100A8 or S100A9 genes intensities ratios in non-CF cells (Fig.3 and Table 1).

### *IL-8, IL-6, TNF-alpha and PGE2 secretion of non-CF and CF cells after *S. aureus* VF incubation*

IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2 secretion was analysed in non-CF and CF cells incubated or not with 2 % of *S. aureus* VF for 1, 3, 6 or 9 hours (Fig. 4). Compared to controls, we observed a time-dependent (increase up to 6 hrs and decrease at 9 hrs) secretion of IL-8 ( $p<0.001$ ), IL-6 ( $p<0.05$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p<0.001$ ) in CF cells incubated with 2 % of *S. aureus* VF. We also observed a significantly increase in CF cells as compared to non-CF cells for IL-8 ( $p<0.01$ ), IL-6 ( $p<0.001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p<0.001$ ) and PGE2 ( $p<0.0001$ ). In the contrary to non-CF cells, the percentage change in PGE2 release from CF cells was negative and did not change during the *S. aureus* VF course.

## Discussion

It has previously been shown that CF patients exhibit a marked increased airway inflammation. However, the origin of inflammation remains still controversial: Is it due to CFTR mutation by itself or is it due to recurrent bacterial infections?

DiMango et al. [5] showed that CF cells expressed more endogenous NF-κB in comparison with CF cells transfected with CFTR. NF-κB activation is increased in the CF context due to CFTR accumulation in the endoplasmic reticulum, absence of cytosolic IκB and decreased concentration of IL10.

Many studies have shown an increased inflammatory state after bacterial infections. Microarray analysis have been used to detect airway epithelial cells' transcriptional changes associated with CFTR in response to a *P. aeruginosa* infection [22, 30] but to our knowledge, the differential dynamic transcriptional response of non-CF and CF airway cells to *S. aureus*, an early pathogen in CF, has never been analyzed. We used a pangenomic DNA microarray containing ~25000 distinct probes to analyze the interaction between airway epithelial cells and *S. aureus* soluble virulence factors from stationary growth phase, that we earlier reported in non-CF airway cells able to modulate several genes involved in the regulation of transcription, inflammation and apoptosis [20].

In the present study, we addressed the following questions: 1) is a deficient CFTR responsible for an inflammatory state in the absence of any infection? 2) are *S. aureus* virulence factors able to induce a different temporal transcriptional and protein difference in non-CF (MM-39) and CF (KM4) airway cells? In order to avoid any influence of cellular permeability due to a direct cytotoxic effect of bacterial VF that could intervene or interfere in the differential dynamic response of the airway cells, we first analyzed the effect of *S. aureus* VF at 2 and 20 %. A low VF concentration (2 %) was chosen because it did not induce any change in the

permeability of the CF and non-CF epithelial cells over the time course analysis (1, 3, 6 and 9 hrs) compared to the control medium without *S. aureus* VF.

Zabner et al [34] showed that primary cultures of human CF and non-CF airway epithelial cells manifest small differences in their gene expression profile. Analysing the genes that were differentially expressed between the two cell lines at a basal level, we found that many transcripts encoding collagen polypeptides were more abundantly expressed in CF cells compared to non-CF cells. This might be an important factor in the lung disease phenotype observed in CF patients. Moreover, in comparison to non-CF cells, CF cells expressed many genes related to “response to external stimulus” such as transcripts encoding complement components and major histocompatibility complex when no infection was performed. This finding goes in favour of the hypothesis that CF cells or tissues harbour a constitutive inflammatory state even if no infection occurred.

Interestingly, non-CF cells expressed more transcripts encoding S100 calcium binding proteins than CF cells when no infection occurs. This is paralleled by results obtained from Guilbault et al. [11] who found a down-regulation of S100A6 and S100A13 in *Cftr*<sup>-/-</sup> mice and from Wright et al.[31] who showed a decreased expression of another S100 calcium binding protein named S100A16 in CF compared with non-CF control subjects. The increased expression of S100A9 in non-CF cells as compared to CF cells is however in contradiction with Xu et al [33] who showed an up-regulation of S100A9 in mCFTR(-) versus mCFTR(+) mice and Renaud et al [23] who found a significant increase of S100A9 mRNAs in cultured CF human tracheal gland cells.

When analysing the response to *S. aureus*, S100A8/S100A9 gene expression was highly increased in CF compared to non-CF cells. This is concordant with a recent study on the transcriptional response of non-CF human airway epithelial cells after stimulation with heat-

inactivated *P. aeruginosa* [28] which also shown that S100A8/A9 were among the most differentially expressed genes. Ahmad et al. [1] found that S100A8/A9 heterodimer may amplify pro-inflammatory responses in airway epithelial cells through stimulation of IL-8 production. This is in agreement with our results showing that in CF cells, binding proteins S100A8 and S100A9 were up-regulated in association with a high but transient up-regulation of NF $\kappa$ BIA and high levels of secreted IL-8 and IL-6. In non-CF cells, S100A8 and S100A9 were not regulated and there was a lower up-regulation of NF $\kappa$ BIA associated with IL-8 secretion and slight IL-6 secretion. The marked and continuous increased up-regulation of S100A8 and S100A9 after VF *S. aureus* incubation of CF cells suggests that these two calcium binding proteins may play a crucial role in the amplification of neutrophil migration by stimulating IL-8 release [1, 6].

Prostaglandin synthases PTGES, PTGES3, and COX-2, also called PTGS2 for “prostaglandin-endoperoxide synthase” were more expressed in non-CF cells compared to CF cells. Moreover, as we earlier reported [20], the expression of PTGS2 was induced and continuously up-regulated during the 9 hrs interaction in non-CF cells. On the opposite, the up-regulation of PTGS2 was only transient in CF cells and a progressive down-regulation was observed after a 3 hrs period of incubation. This transcriptional profile was concomitant with a PGE2 production increased in non-CF cells and decreased in CF cells. Lin *et al.*[16] have shown in a human pulmonary cell line that the *S. aureus* lipoteichoic acid activates the phospholipase C to induce, *via* protein kinase C, a NF- $\kappa$ B activation, an increase of PTGS2 expression and a PGE2 release. Medjane *et al.* [18] recently reported that resting CF cell release more PGE2 than control cell line and is associated with enhanced expression of COX-2 in CF cells. The marked difference in the transcriptional expression and time-dependent pattern that we observed for COX-2 and for the associated PGE2 release may be related to the different transcriptional response of IL-1 $\alpha$  in non-CF and CF cells. First, IL-1 $\alpha$ , IL1RN

(interleukin 1 receptor antagonist) were found more expressed in non-CF cells compared to CF cells. IL-1 $\alpha$  was also continuously up-regulated in non-CF cells whatever the time point of interaction with *S. aureus*, whereas a progressive decrease of up-regulation was observed in CF cells. It has been reported [24] that IL-1 $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine, is able to induce a rapid increased expression of COX-2 mRNA and further stimulate the prostaglandin release. Interestingly, we observed that genes encoding TLR7 and TLR9 were more expressed in CF cells compared to non-CF cells when no infection occurred. After *S. aureus* stimulation, the gene encoding TLR2 was continuously up-regulated in CF and non-CF cells but the marked up-regulation peaked down at 9 hrs in CF cells. These results confirm the involvement of TLR2 in the epithelial host response to staphylococcal infection. According to Muir *et al.* [21], the increased availability of TLR2 at the apical surface of CF epithelial cells is consistent with the increased pro-inflammatory response seen in CF airway cells and suggests that TLR2 is active in this latter early response.

It is well known that TLR activation by bacteria such as *P. aeruginosa* and *S. aureus*, triggers common signal transduction pathways *via* a number of kinases, adaptor proteins, IL-1 receptor kinases, TNFR-associated kinases and I $\kappa$ B kinase, able to activate NF- $\kappa$ B and induce an up-regulation of NF- $\kappa$ B regulated genes [10]. The profiles between NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ BIA were similar at time point 3, 6 and 9 hours infection, with NF- $\kappa$ B1 activation less marked than activation of NF- $\kappa$ BIA. The NF- $\kappa$ BIA gene transcriptional profile in *S. aureus*-stimulated CF airway cells showed a high initial activation (at 1hr) similar to that observed for non-CF cells but this up-regulation progressively decreased and followed a pattern similar to TLR2.

The NF- $\kappa$ B activation pattern was highly correlated to the IL-8 and IL-6 transcriptional and protein pattern. While in non-CF cells, the high activation of IL-8 was sustained all along the 9 hrs of bacterial interaction, in CF cells, there was a decline in this activation at 9 hrs. In CF airway cells, marked NF- $\kappa$ B activation and sustained IL-8 gene expression has been described

following stimulation by live *P. aeruginosa* [28] but, opposite to our data, a higher activation was observed at 8 hrs than at 4 hrs and the IL-8 activation was 3 fold higher in CF as compared to non-CF cells. Reiniger et al. [22] showed a reduced production of IL-6, IL-8 and CXCL1 in the CF human bronchial epithelial cells, that is partially due to lack of the CFTR-dependent NF-κB translocation in response to *P. aeruginosa* infection. Virella-Lowell et al. [29] showed that a great number of genes diverge between CF and CFTR corrected human bronchial epithelial cells in their transcriptional response to *P. aeruginosa* exposure. These include genes like IL-6 and IL-8. Taken together, these data suggest that the dynamic transcriptional response of airway cells to *S. aureus* VF stimulation may depend on CFTR mutation and vary in a time-dependent manner as shown in the present study. Furthermore, the type of bacterial stimulation including the bacterial strain, the bacterial multiplicity of infection and the cell lines may also modulate the airway cell transcriptional response.

Surprisingly, we were unable to detect in these experiments an alteration of TNF-α RNA expression in CF and non-CF cells, confirming our previous observation in non-CF cells after 3 hrs of *S. aureus* incubation [20]. A slight but significant increase of TNF-α after *S. aureus* stimulation was only observed in CF cells. These results are in agreement with those reported by Stout et al [26] who found that the addition of staphylococcal glycocalyx does not markedly modify TNF-α secretion.

The other type of differentially expressed genes in CF as compared to non-CF airway cells relates to genes encoding proteinase inhibitors such as serpin peptidase inhibitor A SERPIN A3 that are involved in the airway epithelial protection from bacterial and/or endogenously secreted proteinases. SERPINA3 is more expressed in non-CF cells compared to CF cells. Moreover, the absence of regulated transcription in CF cells of the serpin A3, that normally inhibits plasminogen activator type 1 and nexin, suggests that the CF airway epithelium may be more sensitive to the exposure of bacterial epithelial and serum-derived serine proteases.

Interestingly, at 6 and 9 hrs incubation time points, the secretory leukoproteinase inhibitor (SLPI) secretion was 2-fold lower in CF as compared to non-CF airway cells (data not shown). This is in accordance with Xu et al [32] who found decreased levels of SLPI after influenza infection in both non-CF and CF cells and lower SLPI secretion of CF cells compared to non-CF cells. SLPI is one of the targets of the transcription factor IRF-1 (Interferon Regulatory Factor 1) which represses its expression. Ichikawa et al. [13] showed an increase of IRF-1 in A549 airway epithelial cells after adherence of *P. aeruginosa*, but the effect of *S. aureus* is not reported.

Transcription factors, other DNA binding proteins, as well as [chromatin](#) structure are important as they regulate the activation of [transcription](#) and by extent regulate the response to pathogens. Differences in their expression may be at the origin of the CF pathology in the hypothesis that they are needed for a “correct” response to pathogens. We reported many transcription factors that were differentially expressed in CF cells versus non-CF cells. Among transcription factors more expressed in non-CF cells compared to CF cells, KLF5 is known to bind the epidermal growth factor response element. EGF has been shown to affect trafficking and function of ENaC channel in CF cells [3].

After infection with *S. aureus*, ATF3 was up-regulated earlier but disappeared after 3 hrs in CF cells, whereas it remained up-regulated in non-CF cells. ATF3 is known to greatly and rapidly increase, following a variety of pathogenic stimuli [15]. ATF3 can heterodimerize with Jun proteins and activate transcription of several genes.

One limitation of our study is the large number of altered genes, which makes difficult the identification of key factors responsible for the CF phenotype. In an attempt to fish out important markers of CF, we have compared our results with those from Xu et al and from Guilbault et al. Xu et al [32] have shown that gene expression of primary human airway epithelial cells was significantly modified by influenza viral infection in normal and CF cells,

with a similar pattern of gene response but with overall less number of responsive genes in CF cells. They also showed that CF cells have less IFN-related antiviral gene induction at 24hrs but greater inflammatory cytokine gene induction, like IL-8, at 1hr after infection. The study of Guilbault et al [11] on *Cftr*<sup>-/-</sup> mice (expressing lung dysfunction which mimics aspects of human CF lung disease), showed a distinct pattern of lung gene expression in these mice and their littermate controls. This study revealed many more genes up-regulated than down-regulated in the lungs of *Cftr*<sup>-/-</sup> mice than in wild-type controls. In *Cftr*<sup>-/-</sup> mice they showed, in agreement with our study, an up-regulation of S100A8 and S100A9 genes, APBB1IP, FMNL1, CTSH, CYP4B1, G0S2, LCN2 and SPOCK2 genes. While 11 transcripts were found in common with at least one of the two studies of Xu et al and Guilbault et al, none were found in the three studies.

In conclusion, many transcripts expressed in CF cells in comparison with non-CF cells are concordant with an inflammatory state of the cells even in the absence of infection. Moreover, even if many genes were regulated in the same way in the two cell types, the early transcriptional and translational responses to *S. aureus* virulence factors, independent on any *S. aureus*-induced cellular permeability, are different in CF airway cells as compared to non-CF airway cells. CFTR-time dependent related differences mainly concern the regulation of pro-inflammatory factors involved in the regulation of the innate immune response. After CF cell stimulation by *S. aureus* VF, the early activation of the NF-κB and associated genes, required for the immune defense of the airway epithelium and for the PMN recruitment, is generally transient and decrease after 3-6 hrs. At this time-point, it can be hypothesized that decreased transcriptional response of the CF airway epithelium may favour *P. aeruginosa* infection that will further contribute to the establishment of airway chronic infection. The verification of our findings in the nasal brushings of young CF patients before and during *S.*

*aureus* infection will validate our results and help for defining new targets for the early protection of the CF airway epithelium against *S. aureus*.

## References

1. Ahmad A, Bayley DL, He S, Stockley RA (2003) Myeloid related protein-8/14 stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:523-530
2. Barthe C, Figarella C, Carrere J, Guy-Crotte O (1991) Identification of 'cystic fibrosis protein' as a complex of two calcium-binding proteins present in human cells of myeloid origin. *Biochim Biophys Acta* 1096:175-177
3. Cao L, Owsianik G, Becq F, Nilius B. (2005) Chronic exposure to EGF affects trafficking and function of ENaC channel in cystic fibrosis cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 331:503-11
4. da Silva MC, Zahm JM, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, Milliot M, de Assis MC, Hologne C, Bonnet N, Merten M, Plotkowski MC, Puchelle E (2004) Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L543-L551
5. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. (1998) Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest.* 101:2598-605
6. Escotte S, Al Alam D, Le Naour R, Puchelle E, Guenounou M, Gangloff SC (2006) T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:348-354

7. Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels IH, Sinha B, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2003) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ* 10:1260-1272
8. Franklin D, Lowy MD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-32.
9. Gilligan PH (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4:35-51
10. Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill SJ, McElvaney NG (2005) TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol* 174:1638-1646
11. Guilbault C, Novak JP, Martin P, Boghdady ML, Saeed Z, Guiot MC, Hudson TJ, Radzioch D. (2006) Distinct pattern of lung gene expression in the Cftr-KO mice developing spontaneous lung disease compared with their littermate controls. *Physiol Genomics*. 25:179-93.
12. Hutchison ML, Govan JR (1999) Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 1:1005-1014
13. Ichikawa JK, Norris A, Bangera MG, Geiss GK, van 't Wout AB, Bumgarner RE, Lory S. (2000) Interaction of *pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9659-64.

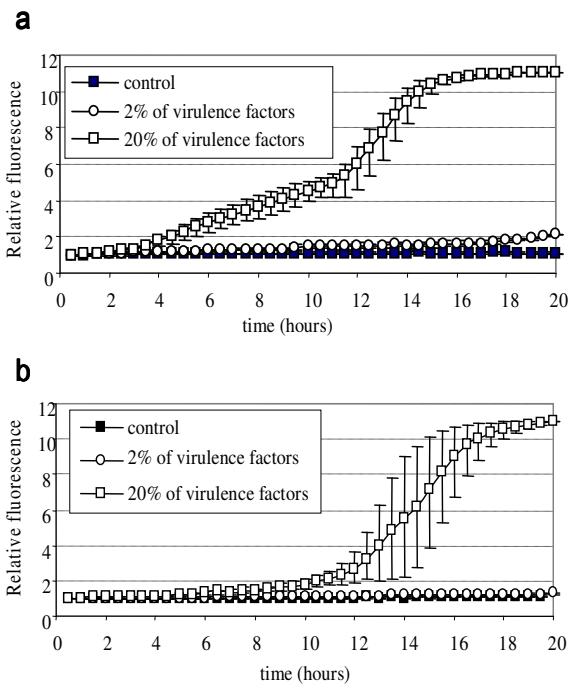
14. Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C, Rouillard JM, Jost B, Amiot F, Magnone V, Bole-Feysot C, Rostagno P, Virolle V, Defamie V, Dessen P, Williams G, Lyons P, Rios G, Mari B, Gulari E, Kastner P, Gidrol X, Freeman TC, Barbry P.(2006) An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res.* 34:e87.
15. Liang G, Wolfgang CD, Chen BP, Chen TH, Hai T (1996) ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* 271:1695-1701
16. Lin CH, Kuan IH, Lee HM, Lee WS, Sheu JR, Ho YS, Wang CH, Kuo HP (2001) Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Br J Pharmacol* 134:543-552
17. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15:194-222
18. Medjane S, Raymond B, Wu Y, Touqui L (2005) Impact of CFTR DeltaF508 mutation on prostaglandin E2 production and type IIA phospholipase A2 expression by pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L816-L824
19. Merten MD, Kammouni W, Renaud W, Birg F, Mattei MG, Figarella C (1996) A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:520-528
20. Moreilhon C, Gras D, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, Magnone V, Merten M, Groux H, Puchelle E, Barbry P (2005) Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors

induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics* 20:244-255

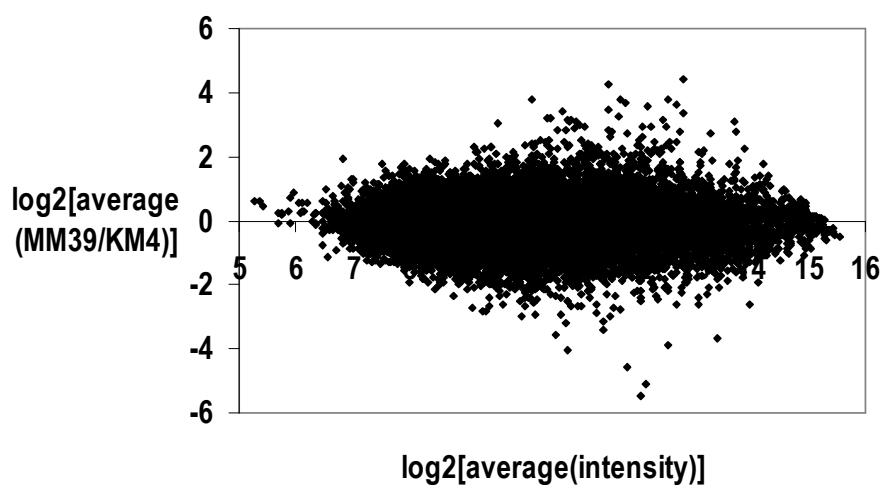
21. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, Prince A (2004) Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:777-783
22. Reiniger N, Ichikawa JK, Pier GB (2005) Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection of human bronchial epithelial cells. *Infect Immun* 73:6822-6830
23. Renaud W, Merten M, Figarella C (1994) Increased coexpression of CFTR and S100 calcium binding proteins MRP8 and MRP14 mRNAs in cystic fibrosis human tracheal gland cells. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1518-1525
24. Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T (1994) Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 269:11769-11775
25. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352:1992-2001
26. Stout RD, Li Y, Miller AR, Lambe DW, Jr. (1994) Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production. *Infect Immun* 62:4160-4166

27. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, Hinnrasky J, Jacquot J, Peault B, Puchelle E (2000) Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. Am J Respir Cell Mol Biol 23:121-127
28. Tummler B, Kiewitz C (1999) Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. Mol Med Today 5:351-358
29. Virella-Lowell I, Herlihy JD, Liu B, Lopez C, Cruz P, Muller C, Baker HV, Flotte TR. (2004) Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell Line. Mol Ther. 10:562-73.
30. Vos JB, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS, Datson NA (2005) Transcriptional response of bronchial epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*: identification of early mediators of host defense. Physiol Genomics 21:324-336
31. Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JG, Guggino WB, Boyle MP. (2006) Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 35:327-36.
32. Xu W, Zheng S, Goggans TM, Kiser P, Quinones-Mateu ME, Janocha AJ, Comhair SA, Slee R, Williams BR, Erzurum SC. (2006) Cystic fibrosis and normal human airway epithelial cell response to influenza a viral infection. J Interferon Cytokine Res. 26:609-27.
33. Xu Y, Clark JC, Aronow BJ, Dey CR, Liu C, Wooldridge JL, Whitsett JA.(2003) Transcriptional adaptation to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiency. J Biol Chem. 278:7674-82.

34. Zabner J, Scheetz TE, Almabrazi HG, Casavant TL, Huang J, Keshavjee S, McCray PB, Jr. (2005) CFTR DeltaF508 mutation has minimal effect on the gene expression profile of differentiated human airway epithelia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289:L545-L553



**Figure 1**



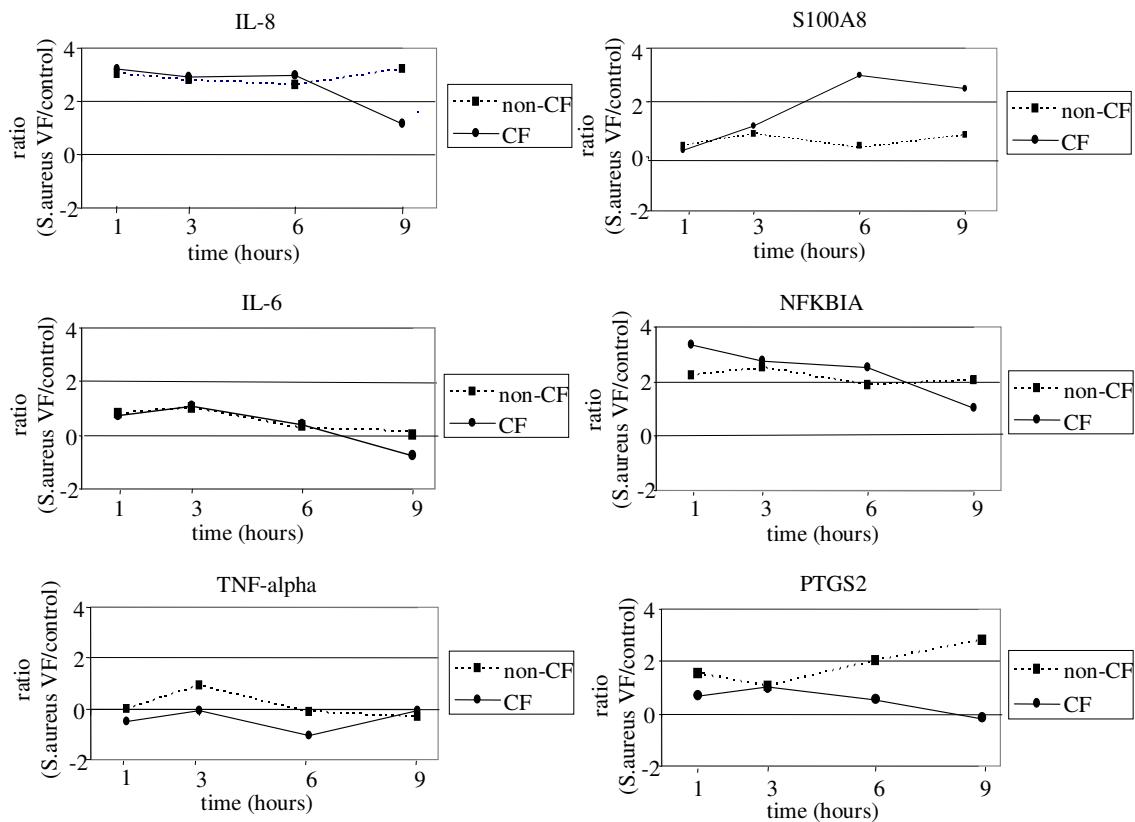
**Figure 2**

	SYMBOL	log2(average(intensity))	log2(MM39/KM4)
<b>Overexpressed in CF cells in comparision to non-CF cells</b>	VIM	12,14	-5,08
	SDC2	11,81	-4,59
	COL6A1	10,78	-4,02
	LY6K	12,54	-3,88
	MTND4L	13,40	-3,66
	PCDHGA8;PCDHGC3;PCDH	10,57	-3,56
	HSPA8;LOC158714	11,40	-3,42
	SAA2	10,75	-3,19
	KRTAP4-7;KRTAP4.9;KRTA	11,40	-3,16
<b>Overexpressed in non-CF cells in comparision to CF cells</b>	SCEL	9,55	3,05
	GATA3	10,92	3,08
	ELF3	10,81	3,08
	S100A14	13,70	3,11
	SERPINA3	10,76	3,16
	EMP2	12,45	3,16
	KLK10	10,82	3,16
	SBSN	10,40	3,22
	RARRES1	10,48	3,22
	MUC20	11,67	3,24
	C2orf28	12,81	3,38
	UPK1B	10,69	3,41
	KRT23	11,50	3,48
	ALDH1A3	12,17	3,56
	KRT13	12,69	3,63
	KRT4	11,79	3,67
	AGR2	12,53	3,76
	PTGS2	11,69	3,80
	RAB25	10,13	3,81
	SPOCK2	11,49	4,27
	S100P	12,80	4,40

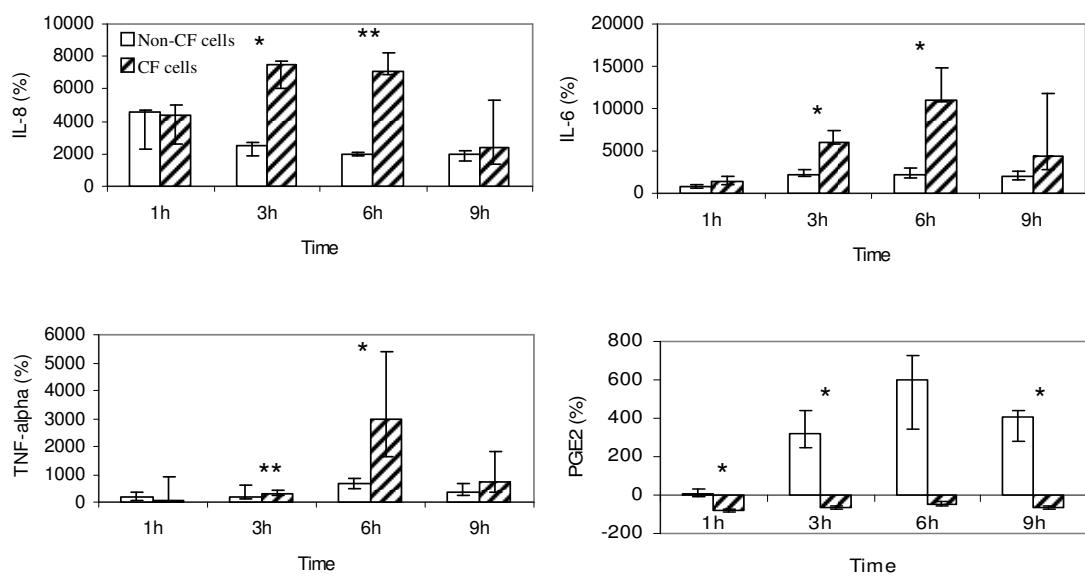
**Table 1**

gene	LocusLink number	Name	non-CF				CF			
			1h	3h	6h	9h	1h	3h	6h	9h
<b>Transcription</b>										
ATF3	172856	activating transcription factor 3	1,3258	2,2532	2,0797	2,2919	2,0174	0,7806	0,4769	0,4119
NFKBIA	35137	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells	2,2379	2,5100	1,8887	2,0597	3,3309	2,7308	2,5423	1,0207
TLR2	98099	toll-like receptor 2	0,4626	1,3640	2,2041	2,0650	0,7163	1,7683	2,5153	0,6681
<b>Inflammation</b>										
SERPINA3	89130	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	-0,2960	0,8910	1,6200	1,9628	-0,0415	0,4731	0,0968	0,3311
PTGS2	87362	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1,5045	1,0017	2,0343	2,8011	0,6712	1,0046	0,5711	-0,1549
IL8	90008	interleukin 8	3,0312	2,7926	2,6259	3,2036	3,2172	2,9140	2,9861	1,1311
IL-6		interleukin 6	0,7657	0,9911	0,2217	0,1452	0,7457	1,0536	0,3789	-0,7738
IL-1 alpha		interleukin 1 alpha	2,5810	2,8930	2,5570	2,6870	1,6759	1,4714	1,0746	-0,4909
TNF		tumor necrosis factor	-0,0401	0,9022	-0,1298	-0,3110	-0,5002	-0,1014	-1,0629	-0,0956
<b>Apoptosis</b>										
INHBA	149098	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	0,4750	1,7132	2,0136	2,2634	1,9288	2,8444	2,7708	0,3029
<b>Calcium binding proteins</b>										
S100A8	99252	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	0,3968	0,8407	0,3139	0,7907	0,2294	1,1180	3,0017	2,4856
S100A9	97731	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	0,2384	0,1632	0,1752	0,3643	0,8679	1,2271	2,6737	2,1087

**Table 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

Figure 1: Time course analysis of cellular permeability of non-CF (MM-39) cells (a) and CF (KM-4) cells (b) over 20 h of interaction with 2% or 20% of *S. aureus* (8325-4) virulence factors. Results correspond to the median (quartile 1, quartile 3) and are representative of three independent experiments.

Figure 2: MA plot representing the log<sub>2</sub>(ratio) between non-CF (MM-39) and CF (KM-4) cells before *S. aureus* infection, according the average log<sub>2</sub>(intensity). Spots with a positive log<sub>2</sub>(ratio) are associated with transcripts that are overexpressed in non-CF cells (or underexpressed in CF cells), while spots with a negative log<sub>2</sub>(ratio) are associated with transcripts that are underexpressed in non-CF cells (or overexpressed in CF cells). Values were compiled from all experiments.

Table 1: Most overexpressed genes selected from figure 2 in non-CF (MM-39) and CF (KM-4) cells before *S. aureus* virulence factors interaction.

Table 2: Selection of the most overexpressed genes in non-CF (MM-39) and CF (KM-4) airway cells during their interaction (1, 3, 6 and 9hrs) with *S. aureus* virulence factors. For each gene, symbol, Locuslink number, and name are shown. Ratios represent « non-CF+ 2% VF » or « CF+ 2% VF » genes intensities relative to « control » gene intensities. Although IL-6 and TNF were not found significantly altered during our experiments, they were included here, as they are discussed in the text.

Figure 3: IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , PTGS2, S100A8 and NF- $\kappa$ BIA ratios representing « non-CF+ 2% VF » and « CF+ 2% VF » genes intensities relative to « control » gene intensities

Figure 4: Percentage of variation of IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2 secretion by non-CF (MM-39) and CF (KM-4) cells incubated with 2% of *S. aureus* virulence factors compared to control cells. Results correspond to the median (quartile 1, quartile 3) and are representative of three independent experiments. CF vs non-CF: \* p < 0.05 \*\* p < 0.01

Name	log2(intensity)	MM39 1hr	MM39 3hrs	MM39 6hrs	MM39 9hrs	KM4 1hr	KM4 3hrs	KM4 6hrs	KM4 9hrs
PARP1	12,83	-0.93	-1.10	-0.47	-0.42	0.02	-0.43	0.22	0.33
IL1A	10,96	2.35	2.16	2.77	2.04	0.83	1.16	0.35	0.11
CTSL	13,19	-0.26	-0.15	1.15	0.73	0.17	0.91	1.66	1.56
CEBPD	13,04	-0.04	0.58	1.58	1.12	1.28	1.49	2.04	1.77
PTGS2	12,06	1.37	0.80	2.46	2.16	0.22	0.13	0.13	0.19
F3	11,20	0.96	1.03	1.60	0.35	-0.24	0.16	-0.21	-0.14
ZFP36	11,95	0.82	0.87	1.07	0.36	0.58	0.30	-0.26	-0.28
IL6	11,87	0.82	0.78	1.04	-0.19	0.29	0.11	-0.45	-0.46
SOD2	12,73	0.09	1.12	2.59	2.29	1.12	1.94	2.57	2.80
RAC1	13,48	-1.30	-0.93	0.21	0.46	0.54	-0.88	1.46	1.17
BCL2A1	10,15	0.38	0.98	1.66	1.06	0.57	0.01	0.49	0.33
LOX	10,95	-0.15	1.07	1.95	1.38	-0.10	0.53	0.76	0.98
ITGA5	9,30	-0.09	0.60	1.60	1.26	0.06	0.31	0.49	0.74
S100A8	12,88	0.41	0.26	0.46	0.30	0.03	0.60	1.62	1.93
NFKB1	10,70	-0.49	0.37	1.32	1.12	0.94	1.22	0.95	0.98
NFKBIA	13,59	1.83	1.56	2.00	1.24	2.91	2.48	1.40	1.36
CCL20	11,32	2.41	1.88	2.66	2.81	2.85	2.39	1.25	0.71
LIF	12,09	0.76	1.00	1.46	0.76	1.03	1.60	0.12	-0.68
CXCL2	12,13	3.56	2.64	3.46	2.82	3.55	3.11	2.70	2.39
INHBA	8,99	0.29	0.92	2.16	1.53	0.80	1.59	1.18	0.58
CXCL2	11,35	2.33	1.90	2.47	2.25	3.21	2.76	1.61	2.06
CXCL1	13,96	2.10	2.39	2.48	2.14	3.30	2.62	1.97	0.78
ODC1	14,36	0.15	-0.01	1.11	0.79	0.57	0.37	1.18	0.11
ADM	11,92	0.04	0.97	1.43	1.58	1.23	0.91	1.48	0.70
PLAU	10,29	0.15	0.41	1.76	1.49	1.04	0.53	1.21	0.85
IL8	13,38	2.28	2.19	2.58	2.63	3.29	3.06	1.85	1.17
TLR2	12,32	0.37	0.83	2.55	1.73	0.73	1.55	1.94	1.15
SEPP1	9,20	-1.50	-1.38	-1.94	-1.06	0.08	-0.20	-0.28	-0.11
TPO	9,20	0.84	0.10	1.69	1.18	0.03	-0.01	-0.01	-0.18
ATF3	10,30	0.96	1.91	2.25	1.58	0.94	0.90	0.06	0.19
ULBP2	10,00	-1.18	-0.84	-0.36	-0.47	-0.30	-0.08	-0.36	-0.11
ATF3	10,30	0.87	1.78	1.69	1.48	1.03	0.29	0.16	0.39
XCL1	10,41	0.28	1.31	1.12	0.59	0.73	0.50	0.23	0.11
PDPN	11,65	-0.79	-1.11	-1.05	-0.36	-0.04	0.06	0.21	0.53
IER3	14,67	1.40	0.42	1.00	1.12	0.90	0.10	0.61	0.95
G0S2	11,29	1.47	2.32	3.28	2.51	0.84	0.98	0.75	0.87
BTG2	14,47	1.38	0.76	0.77	-0.36	0.29	0.15	-0.49	-0.69
DUSP6	9,87	1.59	1.38	3.16	1.69	1.09	0.17	1.25	0.83
TM4SF1	15,53	-0.59	-0.13	-0.01	0.42	0.58	0.19	1.35	1.10
BCL7A	9,66	-0.48	-0.68	-0.22	0.19	1.03	-0.18	0.94	0.64
MT2A	14,04	-0.56	0.10	0.95	1.28	0.95	1.14	1.72	1.53
CDC25C	9,84	-0.75	-1.21	-2.03	-1.00	0.08	-0.57	-0.18	-0.42
SKP1A	14,09	-0.96	-1.04	-0.72	-0.47	-0.13	-0.73	-0.15	-0.33
MAFF	12,09	1.32	1.44	1.74	0.03	-0.02	0.58	-0.55	-0.38
DUSP1	12,64	2.61	2.24	2.45	1.87	2.29	1.73	0.69	0.56
BCL3	12,19	0.11	0.09	0.99	0.89	1.25	1.07	1.22	1.05
ADRB2	10,68	0.03	0.28	1.01	0.81	-0.01	-0.13	-0.32	-0.11
PLAUR	10,60	0.92	1.11	2.40	1.64	0.84	1.01	1.04	0.86
KRT6B	10,59	0.08	0.94	1.43	1.00	0.60	0.49	0.30	-0.26
PLK3	10,72	0.19	0.91	1.67	0.95	0.39	0.82	0.04	0.16
AQP5	10,23	1.21	1.02	-0.15	-0.32	-0.54	-0.19	0.04	-0.19
SERPINA3	10,65	-0.52	0.48	1.84	1.53	-0.06	0.31	0.03	0.26
AKAP12	11,22	-0.10	0.07	2.58	1.90	0.46	0.41	0.66	0.70
NFKBIZ	10,89	2.78	1.80	2.37	1.69	3.67	1.55	0.99	0.86
TFPI2	10,55	-0.57	0.23	1.64	0.83	0.33	-0.21	0.71	0.34
LAMC2	12,01	-0.21	-0.03	1.23	1.13	0.19	0.39	0.63	0.40
SGK	10,44	-0.09	1.28	2.15	1.05	1.30	0.78	0.81	1.08
THBD	12,02	-0.17	0.62	2.01	1.34	0.92	1.08	0.97	0.48
NFKBIE	11,52	0.48	0.80	0.86	1.07	0.87	0.96	0.52	0.74
P13	11,46	-0.22	0.65	1.97	1.29	0.40	1.38	0.91	1.09
HNRPA2B1	14,94	-0.70	-0.81	-0.18	0.03	0.43	-0.37	1.23	1.09
IREB2	9,26	-1.20	-0.71	-0.68	-0.79	-0.25	-0.25	-0.38	-0.79
RIS1	13,18	0.16	0.79	2.91	1.95	0.33	1.12	1.40	0.58
TNFAIP2	13,77	0.67	1.13	0.94	0.59	1.57	1.92	2.27	1.61
EPAS1	15,25	-0.51	-0.46	0.22	0.12	0.44	0.34	2.00	1.17
ID2	10,90	-0.63	-0.94	-1.45	-0.93	-0.25	-0.05	-0.37	-0.35
SAA2	11,57	-0.24	0.40	0.74	0.36	0.28	1.10	1.89	2.26
IK	11,75	-1.11	-1.29	-0.98	-0.10	0.32	-1.03	0.39	0.35
FLI1	8,12	-0.28	-0.01	-0.99	-0.91	-0.06	0.05	-0.69	-0.85
ID2	10,62	-0.40	-0.44	-1.25	-1.03	-0.60	0.33	0.14	0.21

PTGER4	8,62	0,20	0,61	1,04	0,70	-0,01	0,11	0,36	1,04
S100A11	13,32	-0,74	-0,67	0,48	0,20	0,14	0,47	1,48	1,36
VPS33A	12,18	0,03	-0,28	0,08	0,37	0,63	1,16	1,41	1,61
GOLGA8A	11,58	0,48	0,28	0,49	0,21	0,94	0,57	1,06	0,97
<b>BC017937</b>	11,74	1,31	0,92	0,51	-0,46	-0,31	0,42	-0,95	-1,25
SCD5	11,47	-0,91	-1,12	-1,14	-0,14	0,39	-0,55	-0,14	0,27
METTL7A	12,92	-0,98	-0,88	-1,20	-0,74	0,33	-0,33	0,50	-0,03
PCMTD1	11,46	-0,18	-0,92	-1,05	-0,33	0,16	-0,30	0,22	0,39
AY010114	11,55	0,16	0,37	0,02	-0,04	-0,47	-0,02	-1,36	-1,68
<b>PJCG9</b>	10,80	0,99	0,89	0,17	-0,20	-0,01	0,33	-0,42	-0,31
RXFP3	10,13	1,00	0,57	0,28	-0,57	-0,67	-0,04	-0,90	-0,83
<b>HSA17957</b>	11,34	0,52	0,49	-0,03	-0,23	-1,00	-0,08	-1,25	-0,24
<b>CD46</b>	12,01	-1,24	-0,93	-0,35	0,09	0,16	-0,72	0,72	0,30
ZCRB1	13,26	-1,27	-1,34	-0,85	-0,49	0,06	-1,38	0,12	-0,20
LOC375761	9,28	-0,54	-0,07	-0,71	-0,63	-0,54	-0,20	-1,27	-1,43
<b>BC010432</b>	8,64	-0,11	0,19	0,17	-1,01	-0,38	-0,02	-0,80	-1,04
C9orf93	8,79	-0,93	0,37	-1,01	-0,74	-0,74	-0,78	-1,43	-1,03
CEP55	9,52	-1,01	-1,33	-0,49	0,41	0,85	-0,81	-0,18	0,28
DCUN1D3	10,39	0,20	0,95	1,30	0,72	0,59	0,65	0,33	0,09
<b>R74478</b>	12,00	-0,22	-0,29	0,01	0,40	0,26	-1,35	-0,09	-1,58
H3F3B	11,15	-1,42	-1,12	-0,24	-0,65	-0,17	-1,67	-0,02	0,24
<b>LOC152586</b>	8,14	0,65	-0,28	-1,15	-0,08	-0,08	-0,13	0,33	0,80
ENST00000313934	8,07	-0,83	-0,49	-0,63	-0,63	-0,49	-0,42	-1,65	-1,05
C15orf48	9,93	0,03	0,37	2,03	1,47	0,51	0,85	1,56	1,49
<b>HSA227860</b>	9,46	0,14	0,63	1,10	0,83	0,48	0,84	0,68	0,46
HSM801128	14,85	0,17	0,61	1,54	1,12	0,83	0,97	0,77	0,73
<b>BC038371</b>	8,19	-0,62	-0,57	-1,49	-1,28	-1,20	-0,58	-0,95	-1,24
FLT3	8,58	1,50	0,71	-0,49	-0,37	0,19	0,10	-0,49	-0,17
HRH1	10,36	-0,12	-0,32	0,25	0,51	0,49	-0,05	1,03	1,32
ATP1A1	11,39	1,05	0,70	0,57	-0,08	-0,13	0,43	-0,29	-0,32
HPRT1	12,16	-1,37	-1,30	-0,10	0,20	-0,93	-0,72	0,52	0,33
<b>GORASP2</b>	11,21	-1,17	-1,33	-0,69	-0,14	-0,17	-0,52	0,28	0,38
LSM1	12,00	-1,03	-0,98	-0,77	-0,43	0,00	-0,34	-0,12	0,19
CLDN1	12,84	-0,53	-0,73	0,51	0,49	0,75	0,80	1,60	1,25
IMP4	10,92	-1,24	-1,09	-0,34	0,09	-0,28	-0,48	0,55	0,59
PLRG1	9,78	-1,32	-1,57	-0,79	-0,27	-0,49	-0,58	-0,11	0,15
C2orf25	13,19	-0,87	-1,54	-0,81	-0,58	0,05	-0,91	-0,05	-0,20
MRLC2	13,59	-1,07	-1,17	-0,25	-0,10	0,08	-0,71	0,51	0,92
PBEF1	13,94	-0,30	0,37	1,48	0,83	0,75	1,79	2,08	1,48
C20orf172	10,96	-1,01	-1,03	-0,70	-0,14	0,01	-0,48	-0,13	0,26
EGR3	10,83	1,10	1,42	1,07	0,25	0,33	0,55	-0,30	-0,22
C20orf102	11,23	-0,49	-0,92	-0,94	-0,47	-0,07	-0,14	0,38	0,47
SUGT1	10,39	-1,05	-1,46	-1,00	-0,36	-0,18	-0,91	0,04	-0,02
S100A9	12,38	-0,43	-0,07	0,96	0,70	0,35	0,55	1,33	1,86
DNAJB2	12,07	-0,69	-1,01	-1,33	-1,23	0,15	-0,63	-0,18	0,16
CYP1B1	13,22	-1,14	-1,98	-1,39	-0,45	-0,07	-1,00	0,40	0,09
PRO1843	12,65	0,57	0,39	0,22	-0,43	-0,33	-0,26	-1,63	-1,21
VAV3	11,39	-0,77	-1,43	-1,91	-1,05	-0,15	-0,93	-0,31	0,14
SSB	12,33	-1,28	-1,35	-0,99	-0,55	-0,26	-1,09	-0,18	-0,08
NAP1L5	9,33	-0,97	-1,16	-1,43	-0,67	-0,21	-0,65	-0,21	-0,34
FLJ36665	14,51	0,12	0,58	1,10	1,59	1,11	1,91	2,30	1,75
ZNF627	10,53	-0,39	-0,82	-0,92	-0,37	-0,19	-0,21	0,07	0,13
CALD1	11,28	-1,14	-1,05	-0,63	-0,11	0,04	-0,28	-0,22	0,18
SLC39A14	12,49	-0,32	0,40	1,81	1,21	0,59	1,12	2,00	1,56
BRWD2	10,68	-0,49	-1,08	-0,91	-0,37	0,31	-0,59	-0,17	-0,30
BCAP31	14,58	-0,63	-0,36	0,12	0,12	0,55	-0,28	1,31	1,10
GNPTG	12,63	-1,01	-1,09	-0,88	-0,77	-0,65	-0,96	-0,09	-0,12
COX17	12,23	-1,14	-1,29	-0,49	-0,10	-0,02	-1,22	0,32	0,78
GALM	9,77	-0,90	-0,33	-1,12	-0,84	0,06	-0,10	-0,44	-0,56
NDUFAB1	12,69	-0,89	-0,74	-0,38	0,19	0,30	-0,66	1,19	1,39
IER3IP1	12,22	-0,42	-0,50	-0,43	-0,05	0,31	-0,22	1,24	0,90
DDEF2	12,31	-1,46	-1,10	-0,13	-0,12	0,06	-0,19	0,28	0,28
EIF5	14,21	-1,24	-1,29	-0,39	-0,22	0,36	-0,48	0,44	0,01
RNF113B	9,56	-1,13	-1,21	-1,89	-1,92	-0,77	-1,18	-1,28	-1,48
PTTG2	13,07	-0,92	-1,32	-1,37	-0,58	-0,49	-1,10	-0,30	-0,18
SLCO4A1	12,92	-0,42	-0,17	1,41	1,00	0,33	0,65	1,48	1,35
MAGED1	11,46	-0,80	-0,61	-1,45	-0,55	0,03	-0,59	-0,21	0,07
SF3B5	10,42	-1,36	-1,01	-0,72	-0,82	-0,55	-0,90	-0,51	-0,10
ISG20	11,46	0,29	0,60	1,83	1,12	-0,28	0,54	0,59	0,45
SUGT1P	8,27	-0,28	-0,26	-0,65	-0,53	-0,60	-0,46	-0,77	-1,28
DEK	12,56	-1,04	-0,92	-0,56	-0,13	0,22	-0,45	0,02	-0,04
CITED2	9,57	-1,57	-0,76	0,44	0,54	1,01	-0,25	1,46	1,12
FLJ36031	11,37	-0,31	0,49	1,09	1,00	0,76	1,22	1,31	1,13
HIST1H2BD	10,57	-0,72	-0,65	-1,41	-0,73	-0,04	-0,60	-0,09	-0,23
SEMA6D	9,88	-0,39	-0,19	-1,23	-1,16	-0,26	0,00	-0,42	-0,04
BZW1	13,53	-0,19	-0,13	1,03	0,92	0,57	0,55	1,44	0,83

FJX1	12,02	0.54	0.90	1.38	0.56	-0.07	0.88	-0.11	-0.04
SFRS9	13,14	-1.46	-1.54	-0.61	-0.52	0.13	-1.15	-0.29	-0.13
NBR1	12,15	-0.59	-1.09	-1.52	-0.52	-0.11	-0.73	0.13	-0.24
H1F0	11,41	-1.04	-0.73	-0.26	0.30	0.14	-0.23	0.60	0.18
LOC286167	11,67	1.20	0.87	1.34	-0.18	-0.36	0.80	-0.49	-0.44
BRD8	12,95	-0.14	-1.22	-1.19	-0.25	0.30	-1.19	0.22	0.27
KIAA1524	11,80	1.35	0.98	1.15	-0.22	-0.36	0.64	-0.09	-0.21
TROAP	11,11	-0.95	-0.83	-0.71	-0.65	-0.93	-0.75	-0.32	-0.05
SLC40A1	10,14	-0.20	-0.60	-2.05	-0.78	0.01	-0.15	-0.14	-0.29
HS3ST1	9,36	0.02	0.97	2.75	1.44	0.20	0.07	0.07	0.34
TSPAN13	10,05	-1.28	-1.19	-0.56	0.12	-0.24	-0.13	-0.14	-0.10
MT1G	12,79	0.12	0.46	1.41	0.79	0.46	1.22	1.23	1.46
APOL4	12,81	0.05	0.11	0.10	-0.44	0.23	-0.24	-1.22	-1.55
HAS3	9,69	0.08	0.16	1.67	0.98	-0.06	0.19	0.20	-0.25
TRIB1	13,03	1.32	1.79	2.54	1.70	1.30	1.65	1.24	0.96
PMF1	12,51	-1.27	-1.08	-0.84	-0.34	-0.09	-0.72	-0.50	-0.36
MGC11324	8,14	0.23	-0.15	1.67	1.26	0.13	-0.15	0.52	0.56
SLC9A6	10,87	-1.01	-1.16	-0.72	-0.09	-0.07	-0.67	-0.30	-0.30
CTTN	12,50	-1.02	-1.02	0.03	0.06	0.28	-0.69	0.34	0.02
SAT	14,62	0.57	0.56	1.37	1.26	0.61	0.20	1.35	0.74
DUSP4	10,94	0.01	1.04	2.42	1.58	0.31	0.65	0.96	0.82
NCOA7	13,60	0.19	0.17	0.66	0.97	1.24	0.98	0.70	0.84
MICAL2	11,74	-0.38	0.22	1.87	1.63	-0.15	0.11	0.81	0.58
SLC6A14	9,52	-0.20	0.46	1.70	1.23	0.00	0.42	-0.01	0.07
SLC35B3	10,75	-0.62	-0.90	-1.34	-0.28	-0.21	-0.86	-0.17	-0.31
LOC221711	8,75	0.76	1.82	-0.06	0.14	-0.08	0.71	-0.02	0.32
MAST1	12,23	1.06	1.39	1.18	1.00	1.86	0.30	-0.14	0.00
DHCR7	8,16	-0.74	0.68	-0.86	-0.69	-0.38	-0.40	-1.16	-1.28
RPL15	13,28	-1.02	-1.10	-0.67	-0.35	0.40	-1.52	-0.09	0.06
TXNL4A	12,38	-1.21	-1.16	-0.81	-0.23	0.15	-1.54	-0.51	0.24
DAPK1	11,64	-0.92	-1.36	-1.40	-0.39	-0.14	-1.31	-0.95	-0.63
ST7	12,13	-2.11	-1.49	-1.82	-1.54	-1.92	-1.60	-2.03	-2.46
ARHGEF10	10,99	0.05	-1.07	-1.13	-0.44	0.05	-0.88	0.06	-0.52
TIPARP	12,07	-0.26	-0.07	1.45	1.07	0.23	0.16	-0.42	-0.42
KIAA1754	12,89	0.20	0.86	1.04	0.83	0.90	1.58	0.97	0.55
DDX21	14,00	-0.35	-0.43	1.34	0.97	0.38	0.48	1.34	0.46
PLEK2	12,10	-0.34	0.01	1.21	0.98	0.24	-0.18	0.65	0.28
C1orf42	9,85	-0.04	0.50	1.86	1.15	1.16	-0.18	0.63	0.45
ANXA3	10,76	-1.11	-0.93	-0.01	0.43	0.15	-0.93	0.04	0.02
FLJ32575	8,13	-0.12	-0.17	-1.25	-1.54	-0.80	-0.37	-1.10	-1.25
PPIF	11,99	-0.24	0.13	0.98	1.16	0.25	-0.06	0.70	0.74
AREG	9,36	0.40	0.14	0.64	0.12	1.16	-1.14	0.68	0.05
DKK1	13,08	-0.76	0.29	1.29	1.05	0.55	0.16	1.21	0.40
SLC25A37	8,54	-1.04	-0.15	1.47	1.03	0.71	-0.32	0.94	-0.63
PLXNA2	8,35	-0.72	-0.11	-0.47	-0.90	-0.17	1.66	-0.44	-2.77
ZC3H12A	12,48	1.01	1.35	1.63	1.02	1.84	2.08	0.41	0.37
CDCP1	11,30	-0.35	0.07	1.42	1.10	0.01	0.37	0.63	1.07
CCNL1	12,36	0.61	0.58	1.19	0.83	1.41	1.47	0.47	-0.29
EIF2C2	10,41	-0.21	0.45	1.54	0.91	0.30	0.65	1.01	0.77

Appendix: Overexpressed (red) or underexpressed (green) genes in non-CF (MM-39) and CF (KM-4) airway cells during their interaction (1, 3, 6 and 9hrs) with *S. aureus* virulence factors. Ratios represent « non-CF+ 2% VF » or « CF+ 2% VF » genes intensities relative to « control » gene intensities.

Durant ces dernières décennies, des avancées importantes ont été réalisées dans la compréhension des processus moléculaires et cellulaires impliqués dans les interactions entre les pathogènes et les cellules hôtes. Bien que *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) soit un pathogène majeur de l'appareil respiratoire humain, ses interactions avec l'épithélium respiratoire ont été très peu étudiées. En revanche, son implication dans les infections observées dans la mucoviscidose est largement reconnue. La mucoviscidose est une maladie génétique complexe dans laquelle les mutations du gène *cftr*, l'inflammation bronchique et l'infection bactérienne respiratoire sont étroitement liées.

Les principaux objectifs de ce travail de thèse étaient de caractériser les interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines normales ou mucoviscidosiques (CF) et *S. aureus* ou ses facteurs de virulence solubles.

La première étude a concerné l'analyse de l'interaction dynamique entre les cellules épithéliales respiratoires humaines et *S. aureus*. Cette étude révèle que les cellules épithéliales respiratoires sont capables de se défendre en phase précoce d'interaction (1h) puisque près de 50% des bactéries entières présentent une altération de leur perméabilité membranaire (un faible pourcentage de ces bactéries a adhéré aux cellules) alors que toutes les cellules maintiennent l'intégrité de leur perméabilité membranaire. De plus, il n'y a pas de modification significative de la sécrétion constitutive de SLPI (protéine antibactérienne) par ces cellules après 1h d'interaction. La défense cellulaire semble par contre inefficace lors de la phase plus tardive d'interaction (24h) puisque la plupart des cellules épithéliales présentent une altération de leur perméabilité membranaire. On observe un plus grand nombre de bactéries qui ont adhéré aux cellules et un faible pourcentage de bactéries internalisées lors des interactions avec  $10^8$  CFU/mL. De plus la diminution significative de la sécrétion de SLPI par les cellules, est associée à une augmentation de la sécrétion d'alpha-toxine (facteur de virulence soluble sécrété par *S. aureus*) après 24h d'interaction. Ces résultats sont fonction de la concentration bactérienne et les interactions réalisées à  $10^8$  CFU/mL révèlent un pourcentage de bactéries adhérées, un taux de sécrétion d'alpha-toxine et une diminution du taux de sécrétion de SLPI plus élevés que pour  $10^6$  ou  $10^4$  CFU/mL.

Ces résultats suggèrent que les cellules ont une activité de défense efficace, en partie due à la sécrétion de SLPI, pendant les étapes initiales du processus infectieux. Après une interaction prolongée entre *S. aureus* et les cellules de l'épithélium respiratoire, on observe une altération

des cellules en partie due à la sécrétion de facteurs de virulence bactériens solubles comme l’α-toxine.

Etant donné l’implication apparente d’un facteur de virulence de *S. aureus* tel que l’alpha-toxine, dans l’altération des cellules, il nous a paru intéressant d’orienter notre étude suivante sur la comparaison des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires et *S. aureus* vivant ou ses facteurs de virulence solubles.

L’étude des réponses transcriptionnelles des cellules épithéliales respiratoires humaines en interaction avec *S. aureus* vivant ou ses facteurs de virulence solubles a permis de mettre en évidence des modulations de gènes impliqués dans la transcription, l’inflammation et l’apoptose. Pour la grande majorité de ces gènes, l’augmentation de la régulation observée est plus importante lorsque les cellules épithéliales sont en contact avec les facteurs de virulence solubles tels que les toxines, les hémolysines et les enzymes dégradant les tissus, comparativement aux données obtenues avec les bactéries vivantes. Cette étude révèle plus particulièrement une augmentation de la régulation de la voie JAK/STAT or très peu d’études ont porté sur l’induction de la voie JAK/STAT par *S. aureus* (Rajagopalan *et al.*, 2006) notamment dans les cellules épithéliales respiratoires. Les résultats concernant l’implication de la voie NF-κB ainsi que la sécrétion de différentes cytokines des cellules épithéliales respiratoires en interaction avec *S. aureus* a été récemment confirmée par les travaux réalisés dans le laboratoire par Fragaki *et al.*, (Fragaki *et al.*, 2006). L’augmentation de la régulation de COX2 dans les cellules épithéliales respiratoires notamment par les facteurs de virulence de *S. aureus* confirme les études réalisées par Rose *et al.*, sur les cellules épithéliales respiratoires A549 et par Lin *et al.*, sur cellules épithéliales respiratoires (Rose *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 2001). Cette étude montre également que l’infection à *S. aureus* entraîne une nécrose cellulaire plutôt qu’une apoptose, ce qui confirme notre étude précédente.

Ces résultats suggèrent que *S. aureus* entraîne l’activation de nombreuses voies de signalisation principalement impliquées dans l’inflammation. Ils révèlent également que les cellules épithéliales respiratoires humaines sont très sensibles aux facteurs de virulence solubles de *S. aureus*.

Il nous a donc paru intéressant d’orienter notre étude suivante vers l’interaction entre les cellules épithéliales respiratoires et les facteurs de virulence solubles de *S. aureus*. Dans la mucoviscidose, *S. aureus* est un des premiers pathogènes à coloniser le tractus respiratoire chez les enfants mucoviscidosiques. Nous avons donc orienté notre étude vers la comparaison

dynamique des réponses transcriptionnelles des cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF et CF au cours de leur interaction avec les facteurs de virulence de *S. aureus*.

Cette nouvelle étude nous a permis de mettre en évidence une forte modulation d'un ensemble de gènes à caractère pro-inflammatoire dans les cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF. Le profil général de régulation des différents gènes décrits dans cette étude est une augmentation de la régulation similaire jusqu'à 6h pour les cellules épithéliales respiratoires non-CF et CF en interaction avec les facteurs de virulence de *S. aureus*. Cette réponse transcriptionnelle diminue après 9h d'incubation pour les cellules CF alors qu'elle est maintenue pour les cellules non-CF. L'expression du gène codant pour TLR2 par exemple est augmentée de façon continue dans les cellules non-CF et de façon transitoire dans les cellules CF (diminution à 6h). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Muir *et al.*, démontrant que l'augmentation de la disponibilité de TLR2 à la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires CF est associée à l'augmentation de la réponse pro-inflammatoire précoce (Muir *et al.*, 2004). Comme cela a été observé lors de l'étude précédente, la régulation de COX-2 est augmentée de façon continue dans les cellules non-CF. Dans les cellules CF par contre, l'augmentation de la régulation de COX-2 n'est que transitoire et diminue à partir de 3h d'interaction avec les facteurs de virulence de *S. aureus*. Bien que n'ayant pu observer de modification de l'expression transcriptionnelle du TNF- $\alpha$ , nous avons mis en évidence une augmentation significative de la sécrétion de TNF- $\alpha$  uniquement dans les cellules CF en interaction avec les facteurs de virulence solubles. Dans les cellules CF l'expression des protéines S100A8 et S100A9 est fortement augmentée, l'activation de NFKBIA est forte mais transitoire et la sécrétion d'IL-8 et d'IL-6 est importante. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Renaud *et al.*, qui ont montré une augmentation significative des ARNm de S100A8 et S100A9 dans des cellules glandulaires trachéales humaines CF (Renaud *et al.*, 1994). Dans les cellules non-CF, S100A8 et S100A9 ne sont pas régulées par les facteurs de virulence de *S. aureus* et l'augmentation de la régulation de NFKBIA ainsi que la sécrétion d'IL-6 sont plus faibles.

Ces résultats mettent en évidence une réponse transcriptionnelle et traductionnelle aux facteurs de virulence solubles de *S. aureus* différente dans les cellules épithéliales respiratoires non-CF et CF. Ces différences concernent avant tout les facteurs pro-inflammatoires impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire innée. Après stimulation des cellules CF par les facteurs de virulence de *S. aureus*, l'activation précoce de NF- $\kappa$ B et des gènes associés, nécessaires pour la défense immunitaire et le recrutement des

PMN, est généralement transitoire et diminue après 3 ou 6 heures d'interaction. La diminution de la réponse transcriptionnelle pourrait favoriser l'infection par *P. aeruginosa* qui plus tard contribuera à l'établissement de l'infection respiratoire chronique.

L'ensemble de ces études nous a permis de mettre en évidence que :

1. les cellules épithéliales respiratoires humaines, lors d'une interaction avec *S. aureus*, mettent en place une défense efficace contre cette infection qui devient inefficace après une interaction prolongée
2. les facteurs de virulence solubles de *S. aureus* sont plus délétères que *S. aureus* vivant pour les cellules épithéliales respiratoires humaines
3. les cellules épithéliales respiratoires humaines CF sont plus sensibles aux facteurs de virulence de *S. aureus* que les cellules épithéliales respiratoires humaines non-CF

Afin de compléter nos résultats, il serait intéressant de comparer les réponses des cellules épithéliales respiratoires de surface primaires, isolées par exemple de polypes nasaux non-CF ou CF ou encore isolées de brossages nasaux chez de jeunes patients mucoviscidosiques avant et pendant une infection par *S. aureus*. Ces cellules devraient être cultivées en interface air-liquide. Ce modèle, actuellement développé dans le laboratoire, permet d'obtenir à partir de cellules épithéliales de surface isolées par brossage ou dissociation enzymatique, un épithélium respiratoire parfaitement différentié (Lesimple *et al.*, 2006). Ces cellules peuvent également être cultivées dans un modèle de xénogreffe bronchique humanisée en souris nude qui a été décrit dans la discussion générale et qui existe au laboratoire. Néanmoins les limites incontournables de telles études restent liées au faible nombre de tissus épithéliaux mucoviscidosques auxquelles nous avons actuellement accès. Les cellules épithéliales respiratoires de surface primaires pourraient être utilisées pour comparer leurs réponses aux interactions avec la souche de référence 8325-4 de *S. aureus* et des souches cliniques CF de *S. aureus*.

Comme nous l'avons suggéré dans la conclusion de la dernière étude, les lésions occasionnées par les facteurs de virulence de *S. aureus* pourraient favoriser l'infection chronique de l'épithélium respiratoire par *P. aeruginosa*. Nous avons réalisé des études préliminaires qui confirment cette hypothèse. Nous avons étudié la réponse dynamique des cellules épithéliales respiratoires non-CF (MM-39) ou CF (KM-4) aux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

précédés ou non des facteurs de virulence de *S. aureus*. Ces interactions bactéries/cellules ont été réalisées en interface air-liquide.

La réponse pro-inflammatoire, étudiée *via* la sécrétion d'IL-8, s'est révélée dépendante du temps, plus importante pour les cellules CF que les cellules non-CF et plus importante pour les cellules incubées avec les FV de *S. aureus* qu'avec les FV de *P. aeruginosa*. Un effet de « priming » est observé lorsque les cellules sont d'abord incubées avec les FV de *S. aureus* puis avec les FV de *P. aeruginosa*. La réponse de défense, étudiée *via* la sécrétion de SLPI, est dépendante du temps pour les cellules CF et plus marquée pour les cellules CF que les cellules non-CF. La réponse est plus importante pour les cellules incubées avec les FV de *S. aureus* qu'avec les FV de *P. aeruginosa*. Un effet de « priming » est observé lorsque les cellules sont d'abord incubées avec les FV de *S. aureus* puis avec les FV de *P. aeruginosa*.

Cette étude préliminaire révèle que les réponses pro-inflammatoires (IL-8) et de défense (SLPI) sont plus importantes pour les cellules CF que pour les cellules non-CF avec un effet de “priming” de *S. aureus* sur l'interaction de *P. aeruginosa*.

Cette étude préliminaire sera poursuivie en utilisant différentes souches cliniques de *S. aureus* recueillies à des stades précoce de la mucoviscidose grâce à notre étroite collaboration avec le Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose (Pr Abely, CHU de Reims), ceci dans le cadre d'un Contrat d'Interface entre l'INSERM et le CHU de Reims. Ce projet intitulé « Analyse fonctionnelle par imagerie dynamique de l'épithélium respiratoire chez des nourrissons CF » sera développé afin de répondre aux questions suivantes :

1. L'épithélium respiratoire natif de nourrissons CF est-il plus sensible à l'agression bactérienne que l'épithélium non-CF ?
2. Cet épithélium présente t-il à ce stade très précoce de la maladie des anomalies fonctionnelles (fréquence ciliaire, efflux de Cl<sup>-</sup>, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, expression de CFTR, fonctionnalité des jonctions communicantes) ?
3. Ces anomalies sont-elles amplifiées par l'ajout de bactéries (vivantes ou facteurs de virulence solubles) identifiées très précocement dans la mucoviscidose comme *S. aureus* ?

Grâce au dépistage néo-natal de la mucoviscidose, ces études seront réalisées chez des nourrissons CF après brossage de l'épithélium respiratoire. Ce projet a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique et un consentement écrit et éclairé des parents d'enfants mucoviscidiques. La faisabilité de la méthode de brossage nasal et la possibilité de recueillir des cellules épithéliales natives formant des structures tridimensionnelles

(sphéroïdes) en milieu liquide ont été démontrées (Abely *et al.*, Ped Pulmonol., Suppl 29, p 235). L'étude de la fonctionnalité de l'épithélium respiratoire CF et non-CF inclura la réponse dynamique de la perméabilité membranaire des cellules au cours de l'incubation des sphéroïdes avec *S. aureus*. Le recueil du milieu de culture après interaction bactérienne permettra d'évaluer la réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales natives après infection bactérienne.

## BIBLIOGRAPHIE

**AARBIOU J, ERTMANN M, VAN WS, VAN NP, ROOK D, RABE KF et al.**

Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro.

J Leukoc Biol 2002 ; 72 (1) : 167-174.

**ABELY M, MOSLER K, CORAUX C, FRAGAKI K, ZHAM JM, BAJOLAT O, et al.**

Nasal epithelial brushing technique applied to the analysis of the functional properties of the airway epithelium in CF infants.

Ped. Pulmonol. 2006 ; suppl 29 : 235

**ARBIBE L, MIRA JP, TEUSCH N, KLINE L, GUHA M, MACKMAN N et al.**

Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway.

Nat Immunol 2000 ; 1 (6) : 533-540.

**ARMSTRONG DS, GRIMWOOD K, CARLIN JB, CARZINO R, GUTIERREZ JP, HULL J et al.**

Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 156 (4 Pt 1) : 1197-1204.

**ARMSTRONG DS, GRIMWOOD K, CARZINO R, CARLIN JB, OLINSKY A, PHELAN PD.**

Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis.

BMJ 1995 ; 310 (6994) : 1571-1572.

**ARMSTRONG DS, HOOK SM, JAMSEN KM, NIXON GM, CARZINO R, CARLIN JB et al.**

Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening.

Pediatr Pulmonol 2005 ; 40 (6) : 500-510.

**AURON PE.**

The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction.

Cytokine Growth Factor Rev 1998 ; 9 (3-4) : 221-237.

**AYERS MM, JEFFERY PK.**

Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium.

Eur Respir J 1988 ; 1 (1) : 58-80.

**BALDWIN AS, JR.**

The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.

Annu Rev Immunol 1996 ; 14:649-683.

**BAYER MG, HEINRICHS JH, CHEUNG AL.**

The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*.

J Bacteriol 1996 ; 178 (15) : 4563-4570.

**BAZAN JF, BACON KB, HARDIMAN G, WANG W, SOO K, ROSSI D et al.**

A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.

Nature 1997 ; 385 (6617) : 640-644.

**BECKER MN, SAUER MS, MUHLEBACH MS, HIRSH AJ, WU Q, VERGHESE MW et al.**

Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells.

Am J Respir Crit Care Med 2004 ; 169 (5) : 645-653.

**BERTRAND CA, FRIZZELL RA.**

The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion.

Am J Physiol Cell Physiol 2003 ; 285 (1) : C1-18.

**BHAKDI S, FUSSLE R, TRANUM-JENSEN J.**

Staphylococcal alpha-toxin: oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles.

Proc Natl Acad Sci U S A 1981 ; 78 (9) : 5475-5479.

**BONFIELD TL, KONSTAN MW, BURFEIND P, PANUSKA JR, HILLIARD JB, BERGER M.**

Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1995 ;13(3) : 257-61.

**BOUCHER RC.**

New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.

Eur Respir J. 2004 ;23(1) : 146-58. Review.

**BRONNER S, MONTEIL H, PREVOST G.**

Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microbiol Rev 2004 ; 28 (2) : 183-200.

**BRUZZONE R, WHITE TW, GOODENOUGH DA.**

The cellular Internet: on-line with connexins.

Bioessays 1996 ; 18 (9) : 709-718.

**CANNON CL, KOWALSKI MP, STOPAK KS, PIER GB.**

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 (2) : 188-197.

**CHERTOV O, MICHEL DF, XU L, WANG JM, TANI K, MURPHY WJ et al.**

Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils.

J Biol Chem 1996 ; 271 (6) : 2935-2940.

**CHEUNG AL, YING P.**

Regulation of alpha- and beta-hemolysins by the sar locus of *Staphylococcus aureus*.

J Bacteriol 1994 ; 176 (3) : 580-585.

**CHMIEL JF, BERGER M, KONSTAN MW.**

The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease.  
Clin Rev Allergy Immunol 2002 ; 23 (1) : 5-27.

**CHOI KC, AUERSPERG N, LEUNG PC.**

Mitogen-activated protein kinases in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium.  
Reprod Biol Endocrinol 2003 ; 171.

**COLEMAN FT, MUESCHENBORN S, MELULENI G, RAY C, CAREY VJ, VARGAS SO et al.**

Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection.  
Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ; 100 (4) : 1949-1954.

**CORAUX C, KILEZTKY C, POLETTE M, HINNRASKY J, ZAHM JM, DEVILLIER P et al.**

Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist.  
Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 30 (5) : 605-612.

**DAVIDSON DJ, DORIN JR, MCLACHLAN G, RANALDI V, LAMB D, DOHERTY C et al.**

Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens.  
Nat Genet 1995 ; 9 (4) : 351-357.

**DAVIDSON DJ, WEBB S, TEAGUE P, GOVAN JR, DORIN JR.**

Lung pathology in response to repeated exposure to *Staphylococcus aureus* in congenic residual function cystic fibrosis mice does not increase in response to decreased CFTR levels or increased bacterial load.  
Pathobiology 2004 ; 71 (3) : 152-158.

**DE BENTZMANN S, ROGER P, DUPUIT F, BAJOLET-LAUDINAT O, FUCHEY C, PLOTKOWSKI MC et al.**

Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells.  
Infect Immun 1996 ; 64 (5) : 1582-1588.

**DE BENTZMANN S, MONGODIN E, ROGER P, PUCHELLE E.**

Bacterial adherence to airway epithelium  
Eur Respir Rev 2000 , 10 (70) : 125-132.

**DELMOTTE P, DEGROOTE S, MERTEN MD, VAN S, I, BERNIGAUD A, FIGARELLA C et al.**

Influence of TNFalpha on the sialylation of mucins produced by a transformed cell line MM-39 derived from human tracheal gland cells.  
Glycoconj J 2001 ; 18 (6) : 487-497.

**DI A, BROWN ME, DERIY LV, LI C, SZETO FL, CHEN Y et al.**

CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity.  
Nat Cell Biol 2006 ; 8 (9) : 933-944.

**DIMANGO E, ZAR HJ, BRYAN R, PRINCE A.**

Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8.

J Clin Invest. 1995 ;96(5) : 2204-10.

**DOWNER R, ROCHE F, PARK PW, MECHAM RP, FOSTER TJ.**

The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein.

J Biol Chem 2002 ; 277 (1) : 243-250.

**DUPUIT F, GAILLARD D, HINNRASKY J, MONGODIN E, DE BENTZMANN S, COPRENI E et al.**

Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 278 (1) : L165-L176.

**DZIARSKI R, TAPPING RI, TOBIAS PS.**

Binding of bacterial peptidoglycan to CD14.

J Biol Chem 1998 ; 273 (15) : 8680-8690.

**ELLISON RT, III, GIEHL TJ.**

Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme.

J Clin Invest 1991 ; 88 (4) : 1080-1091.

**ESCOTTE S, AL ALAM D, LE NAOUR R, PUCHELLE E, GUENOUNOU M, GANGLOFF SC.**

T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (3) : 348-354.

**ESCOTTE S, DANIEL C, GAILLARD D, BENOIT S, JACQUOT J, DUSSER D, TRIGLIA JM, MAJER-TEBOUL C, PUCHELLE E.**

Fluticasone propionate inhibits lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in human cystic fibrosis airway grafts.

J Pharmacol Exp Ther. 2002 ; 302(3) : 1151-7.

**ESEN N, TANGA FY, DELEO JA, KIELIAN T.**

Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*.

J Neurochem 2004 ; 88 (3) : 746-758.

**FANGER GR.**

Regulation of the MAPK family members: role of subcellular localization and architectural organization.

Histol Histopathol 1999 ; 14 (3) : 887-894.

**FOSTER TJ, HOOK M.**

Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*.

Trends Microbiol 1998 ; 6 (12) : 484-488.

**FOSTER TJ, MCDEVITT D.**

Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence.

FEMS Microbiol Lett 1994 ; 118 (3) : 199-205.

**FOURNIER B, PHILPOTT DJ.**

Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system.  
Clin Microbiol Rev 2005 ; 18 (3) : 521-540.

**FRAGAKI K, KILEZTKY C, TRENTESAUX C, ZAHM JM, BAJOLET O, JOHNSON M et al.**

Downregulation by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist and corticosteroid of *Staphylococcus aureus*-induced airway epithelial inflammatory mediator production.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006 ; 291 (1) : L11-L18.

**FRANKE WW, GOLDSCHMIDT MD, ZIMBELMANN R, MUELLER HM, SCHILLER DL, COWIN P.**

Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein.  
Proc Natl Acad Sci U S A 1989 ; 86 (11) : 4027-4031.

**FRANKEN C, MEIJER CJ, DIJKMAN JH.**

Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans.  
J Histochem Cytochem 1989 ; 37 (4) : 493-498.

**FUCHS S, HOLLINS AJ, LAUE M, SCHAEFER UF, ROEMER K, GUMBLETON M et al.**

Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C.  
Cell Tissue Res 2003 ; 311 (1) : 31-45.

**FUJISAWA T, KATO Y, ATSUTA J, TERADA A, IGUCHI K, KAMIYA H et al.**

Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines.  
J Allergy Clin Immunol 2000 ; 105 (1 Pt 1) : 126-133.

**GARRINGTON TP, JOHNSON GL.**

Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.  
Curr Opin Cell Biol 1999 ; 11 (2) : 211-218.

**GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB.**

NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.  
Annu Rev Immunol 1998 ; 16:225-260.

**GIBSON RL, BURNS JL, RAMSEY BW.**

Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis.  
Am J Respir Crit Care Med 2003 ; 168 (8) : 918-951.

**GIRARDIN SE, BONECA IG, CARNEIRO LA, ANTIGNAC A, JEHANNO M, VIALA J et al.**

Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan.  
Science 2003a ; 300 (5625) : 1584-1587.

**GIRARDIN SE, BONECA IG, VIALA J, CHAMAILLARD M, LABIGNE A, THOMAS G et al.**

Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.  
J Biol Chem 2003b ; 278 (11) : 8869-8872.

**GIRARDIN SE, PHILPOTT DJ.**

Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity.  
Eur J Immunol 2004 ; 34 (7) : 1777-1782.

**GODFREY RW, SEVERS NJ, JEFFERY PK.**

Freeze-fracture morphology and quantification of human bronchial epithelial tight junctions.  
Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 6 (4) : 453-458.

**GOMEZ MI, LEE A, REDDY B, MUIR A, SOONG G, PITT A et al.**

Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.

Nat Med 2004 ; 10 (8) : 842-848.

**GOVAN JR, BROWN PH, MADDISON J, DOHERTY CJ, NELSON JW, DODD M, et al.**

Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis.  
Lancet. 1993 Jul 3;342(8862):15-9.

**GREEN KJ, JONES JC.**

Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components.  
FASEB J 1996 ; 10 (8) : 871-881.

**GREENE C, TAGGART C, LOWE G, GALLAGHER P, MCELVANEY N, O'NEILL S.**

Local impairment of anti-neutrophil elastase capacity in community-acquired pneumonia.  
J Infect Dis 2003 ; 188 (5) : 769-776.

**GREENE CM, CARROLL TP, SMITH SG, TAGGART CC, DEVANEY J, GRIFFIN S et al.**

TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells.  
J Immunol 2005 ; 174 (3) : 1638-1646.

**GUILLOT L, LE GR, BLOCH S, ESCRIOU N, AKIRA S, CHIGNARD M et al.**

Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus.  
J Biol Chem 2005 ; 280 (7) : 5571-5580.

**HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, SCHRODER JM.**

Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.

J Biol Chem 2001 ; 276 (8) : 5707-5713.

**HARKEMA JR, MARIASSY A, ST. GEORGE J, HYDE DM, PLOPPER CG;**

Epithelial cells of the conducting airways: a species comparison

In:

The airway epithelium: physiology, pathophysiology and pharmacology

Ed by Farmer SG and Hay DWP

New York: Dekker; 1991 : 3-39

**HARWIG SS, GANZ T, LEHRER RI.**

Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing.

Methods Enzymol 1994 ; 236:160-172.

**HECZKO PB, HOFFLER U, KASPROWICZ A, PULVERER G.**

Quantitative studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of Staphylococcus aureus.

J Med Microbiol 1981 ; 14 (3) : 233-241.

**HEECKEREN A, WALENGA R, KONSTAN MW, BONFIELD T, DAVIS PB, FERKOL T.**

Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with Pseudomonas aeruginosa.

J Clin Invest 1997 ; 100 (11) : 2810-2815.

**HEINRICH PC, BEHRMANN I, MULLER-NEWEN G, SCHAPER F, GRAEVE L.**

Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.

Biochem J 1998 ; 334 ( Pt 2):297-314.

**HERARD AL, PIERROT D, HINNRASKY J, KAPLAN H, SHEPPARD D, PUCHELLE E et al.**

Fibronectin and its alpha 5 beta 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium.

Am J Physiol 1996 ; 271 (5 Pt 1) : L726-L733.

**HIEMSTRA PS, MAASSEN RJ, STOLK J, HEINZEL-WIELAND R, STEFFENS GJ, DIJKMAN JH.**

Antibacterial activity of antileukoprotease.

Infect Immun 1996 ; 64 (11) : 4520-4524.

**HOFFMANN N, RASMUSSEN TB, JENSEN PO, STUB C, HENTZER M, MOLIN S et al.**

Novel mouse model of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection mimicking cystic fibrosis.

Infect Immun 2005 ; 73 (4) : 2504-2514.

**HUBEAU C, PUCHELLE E, GAILLARD D.**

Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis.

J Allergy Clin Immunol 2001 ; 108 (4) : 524-529.

**INOHARA N, KOSEKI T, DEL PL, HU Y, YEE C, CHEN S et al.**

Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB.

J Biol Chem 1999 ; 274 (21) : 14560-14567.

**JARRY TM, CHEUNG AL.**

Staphylococcus aureus escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart.  
Infect Immun 2006 ; 74 (5) : 2568-2577.

**JEFFERY PK, LI D.**

Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes.  
Eur Respir J 1997 ; 10 (7) : 1655-1662.

**JIN F, NATHAN CF, RADZIOCH D, DING A.**

Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor.  
Infect Immun 1998 ; 66 (6) : 2447-2452.

**JOHNSON GL, LAPADAT R.**

Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.  
Science 2002 ; 298 (5600) : 1911-1912.

**JONAS D, WALEV I, BERGER T, LIEBETRAU M, PALMER M, BHAKDI S.**

Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation.  
Infect Immun 1994 ; 62 (4) : 1304-12.

**JONSSON K, SIGNAS C, MULLER HP, LINDBERG M.**

Two different genes encode fibronectin binding proteins in Staphylococcus aureus. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene.  
Eur J Biochem 1991 ; 202 (3) : 1041-1048.

**KAISHO T, AKIRA S.**

Toll-like receptor function and signaling.  
J Allergy Clin Immunol 2006 ; 117 (5) : 979-987.

**KAMMOUNI W, FIGARELLA C, MARCHAND S, MERTEN M.**

Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells.  
Infect Immun. 1997 ;65(12) : 5176-83.

**KARIN M, BEN-NERIAH Y.**

Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.  
Annu Rev Immunol 2000 ; 18:621-663.

**KELLER R, FISCHER W, KEIST R, BASSETTI S.**

Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids.  
Infect Immun 1992 ; 60 (9) : 3664-3672.

**KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK,  
CHAKRAVARTI A et al.**

Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.  
Science 1989 ; 245 (4922) : 1073-1080.

**KIKUCHI T, ABE T, SATOH K, NARUMI K, SAKAI T, ABE S et al.**

Cis-acting region associated with lung cell-specific expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene.

Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ; 17 (3) : 361-367.

**KILE BT, ALEXANDER WS.**

The suppressors of cytokine signalling (SOCS).

Cell Mol Life Sci 2001 ; 58 (11) : 1627-1635.

**KISSELEVA T, BHATTACHARYA S, BRAUNSTEIN J, SCHINDLER CW.**

Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges.

Gene 2002 ; 285 (1-2) : 1-24.

**KNOWLES M, GATZY J, BOUCHER R.**

Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium.

J Clin Invest 1983 ; 71 (5) : 1410-1417.

**KONSTAN MW, CHENG PW, BOAT TF.**

A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium.

Exp Lung Res 1982 ; 3 (2) : 175-181.

**KULKA M, DERY R, NAHIRNEY D, DUSZYK M, BEFUS AD.**

Differential regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by interferon gamma in mast cells and epithelial cells.

J Pharmacol Exp Ther 2005 ; 315 (2) : 563-570.

**KUNSCH C, LANG RK, ROSEN CA, SHANNON MF.**

Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6.

J Immunol 1994 ; 153 (1) : 153-164.

**LALLEMAND JY, STOVEN V, ANNREAU JP, BOUCHER J, BLANQUET S,**

**BARTHE J et al.**

Induction by antitumoral drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis?

Lancet 1997 ; 350 (9079) : 711-712.

**LAUWERYNS JM, VAN LA.**

The intrapulmonary neuroepithelial bodies after vagotomy: demonstration of their sensory neuroreceptor-like innervation.

Experientia 1983 ; 39 (10) : 1123-1124.

**LESIMPLE P, VAN SEUNINGEN, I, BUISINE MP, COPIN MC, HINZ M, HOFFMANN W et al.**

Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation.

Am J Respir Cell Mol Biol 2006 .

**LEUBE RE, RUSTAD TJ.**

Squamous cell metaplasia in the human lung: molecular characteristics of epithelial stratification.

Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1991 ; 61 (4) : 227-253.

**LEVINE SJ, ADAMIK B, HAWARI FI, ISLAM A, YU ZX, LIAO DW et al.**

Proteasome inhibition induces TNFR1 shedding from human airway epithelial (NCI-H292) cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005 ; 289 (2) : L233-L243.

**LIN CH, KUAN IH, LEE HM, LEE WS, SHEU JR, HO YS et al.**

Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway.

Br J Pharmacol 2001 ; 134 (3) : 543-552.

**LIU C, XU Z, GUPTA D, DZIARSKI R.**

Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules.

J Biol Chem 2001 ; 276 (37) : 34686-34694.

**LOWY FD.**

*Staphylococcus aureus* infections.

N Engl J Med 1998 ; 339 (8) : 520-532.

**MACHEN TE.**

Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory?

Am J Physiol Cell Physiol 2006 ; 291 (2) : C218-C230.

**MARTIN E, GANZ T, LEHRER RI.**

Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates.

J Leukoc Biol 1995 ; 58 (2) : 128-136.

**MASHBURN LM, JETT AM, AKINS DR, WHITELEY M.**

*Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture.

J Bacteriol 2005 ; 187 (2) : 554-566.

**MATSUSAKA T, FUJIKAWA K, NISHIO Y, MUKAIDA N, MATSUSHIMA K, KISHIMOTO T et al.**

Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993 ; 90 (21) : 10193-10197.

**MCKEVITT AI, BAJAKSOUZIAN S, KLINGER JD, WOODS DE.**

Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*.

Infect Immun. 1989 Mar;57(3):771-8.

**MCMORRAN BJ, PALMER JS, LUNN DP, OCEANDY D, COSTELLOE EO, THOMAS GR et al.**

G551D CF mice display an abnormal host response and have impaired clearance of Pseudomonas lung disease.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 281 (3) : L740-L747.

**MERTEN MD, KAMMOUNI W, RENAUD W, BIRG F, MATTEI MG, FIGARELLA C.**

A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1996 ; 15(4) : 520-8.

**MEYER KC, SHARMA A.**

Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis.  
Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 156 (5) : 1536-1540.

**MICHEL T, REICHHART JM, HOFFMANN JA, ROYET J.**

Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein.  
Nature 2001 ; 414 (6865) : 756-759.

**MICHELSEN KS, AICHER A, MOHAUPT M, HARTUNG T, DIMMELER S, KIRSCHNING CJ et al.**

The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2.  
J Biol Chem 2001 ; 276 (28) : 25680-25686.

**MONGODIN E, BAJOLET O, CUTRONA J, BONNET N, DUPUIT F, PUCHELLE E et al.**

Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium.

Infect Immun 2002 ; 70 (2) : 620-630.

**MOREILHON C, GRAS D, HOLOGNE C, BAJOLET O, COTTREZ F, MAGNONE V et al.**

Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells.

Physiol Genomics 2005 ; 20 (3) : 244-255.

**MUHLEBACH MS, STEWART PW, LEIGH MW, NOAH TL.**

Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients.

Am J Respir Crit Care Med 1999 ; 160 (1) : 186-191.

**MUIR A, SOONG G, SOKOL S, REDDY B, GOMEZ MI, VAN HA et al.**

Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 30 (6) : 777-783.

**MURPHY CJ, FOSTER BA, MANNIS MJ, SELSTED ME, REID TW.**

Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts.

J Cell Physiol 1993 ; 155 (2) : 408-413.

**MURPHY PM.**

Chemokine receptor cloning.

Methods Mol Biol 2000 ; 13889-98.

**ORENSTEIN DM, WINNIE GB, ALTMAN H.**

Cystic fibrosis: a 2002 update.

J Pediatr 2002 ; 140 (2) : 156-164.

**ORLINICK JR, CHAO MV.**

TNF-related ligands and their receptors.

Cell Signal 1998 ; 10 (8) : 543-551.

**OSTEDGAARD LS, BALDURSSON O, WELSH MJ.**

Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by its R domain.

J Biol Chem 2001 ; 276 (11) : 7689-7692.

**OZINSKY A, UNDERHILL DM, FONTENOT JD, HAJJAR AM, SMITH KD, WILSON CB et al.**

The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000 ; 97 (25) : 13766-13771.

**PALMQVIST N, FOSTER T, TARKOWSKI A, JOSEFSSON E.**

Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death.

Microb Pathog 2002 ; 33 (5) : 239-249.

**PARK KS, WELLS JM, ZORN AM, WERT SE, LAUBACH VE, FERNANDEZ LG et al.**

Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (2) : 151-157.

**PEREZ A, ISSLER AC, COTTON CU, KELLEY TJ, VERKMAN AS, DAVIS PB.**

CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006 .

**PERFETTO B, DONNARUMMA G, CRISCUOLO D, PAOLETTI I, GRIMALDI E, TUFANO MA et al.**

Bacterial components induce cytokine and intercellular adhesion molecules-1 and activate transcription factors in dermal fibroblasts.

Res Microbiol 2003 ; 154 (5) : 337-344.

**PFEFFER KD, HUECKSTEADT TP, HOIDAL JR.**

Expression and regulation of tumor necrosis factor in macrophages from cystic fibrosis patients.

Am J Respir Cell Mol Biol 1993 ; 9 (5) : 511-519.

**PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS.**

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 (22) : 12088-12093.

**PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS, GOLDBERG JB.**

How mutant CFTR may contribute to Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis.  
Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 154 (4 Pt 2) : S175-S182.

**PLOTKOWSKI MC, DE BENTZMANN S, PEREIRA SH, ZAHM JM, BAJOLET-LAUDINAT O, ROGER P, PUCHELLE E.**

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(5) : 880-90.

**PUCHELLE E, LE SIMPLE P, HAJJ R, CORAUX C.**

[Regeneration of injured airway epithelium].  
Ann Pharm Fr 2006 ; 64 (2) : 107-113.

**QUINTON PM.**

Missing Cl conductance in cystic fibrosis.  
Am J Physiol 1986 ; 251 (4 Pt 1) : C649-C652.

**RAJAGOPALAN G, IIJIMA K, SINGH M, KITA H, PATEL R, DAVID CS.**

Intranasal exposure to bacterial superantigens induces airway inflammation in HLA class II transgenic mice.  
Infect Immun 2006 ; 74 (2) : 1284-1296.

**RATNER AJ, BRYAN R, WEBER A, NGUYEN S, BARNES D, PITT A et al.**

Cystic fibrosis pathogens activate Ca<sup>2+</sup>-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells.  
J Biol Chem 2001 ; 276 (22) : 19267-19275.

**RAYNER C, WILSON R.**

Mucus-bacteria interaction

In:

Airway mucus: basic mechanisms and clinical perspectives  
Ed by Rogers DF and Letherem M  
Basel: Birkhauser ; 1997 : 211-225

**RENAUD W, MERTEN M, FIGARELLA C.**

Increased coexpression of CFTR and S100 calcium binding proteins MRP8 and MRP14 mRNAs in cystic fibrosis human tracheal gland cells.  
Biochem Biophys Res Commun 1994 ; 201 (3) : 1518-1525.

**RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z et al.**

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.  
Science 1989 ; 245 (4922) : 1066-1073.

**ROBINSON MJ, COBB MH.**

Mitogen-activated protein kinase pathways.  
Curr Opin Cell Biol 1997 ; 9 (2) : 180-186.

**ROGAN MP, GERAGHTY P, GREENE CM, O'NEILL SJ, TAGGART CC,  
MCELVANEY NG.**

Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence.  
Respir Res 2006 ; 729.

**ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M et al.**

Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.  
Science 1989 ; 245 (4922) : 1059-1065.

**ROONEY SA, YOUNG SL, MENDELSON CR.**

Molecular and cellular processing of lung surfactant.  
FASEB J 1994 ; 8 (12) : 957-967.

**ROSE MC.**

Characterization of human tracheobronchial mucin glycoproteins.  
Methods Enzymol 1989 ; 1793-17.

**ROWE SM, MILLER S, SORSCHER EJ.**

Cystic fibrosis.  
N Engl J Med 2005 ; 352 (19) : 1992-2001.

**RUBIN BK, RAMIREZ O, ZAYAS JG, FINEGAN B, KING M.**

Collection and analysis of respiratory mucus from subjects without lung disease.  
Am Rev Respir Dis 1990 ; 141 (4 Pt 1) : 1040-1043.

**SAADANE A, SOLTYS J, BERGER M.**

Acute *Pseudomonas* challenge in cystic fibrosis mice causes prolonged nuclear factor-kappa B activation, cytokine secretion, and persistent lung inflammation.  
J Allergy Clin Immunol 2006 ; 117 (5) : 1163-1169.

**SAIMAN L, CACALANO G, PRINCE A.**

*Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*.  
Infect Immun. 1990 Aug ; 58 (8) : 2578-84.

**SCHNARE M, BARTON GM, HOLT AC, TAKEDA K, AKIRA S, MEDZHITOVA R.**

Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses.  
Nat Immunol 2001 ; 2 (10) : 947-950.

**SCHWAB UE, WOLD AE, CARSON JL, LEIGH MW, CHENG PW, GILLIGAN PH et al.**

Increased adherence of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis lungs to airway epithelial cells.  
Am Rev Respir Dis 1993 ; 148 (2) : 365-369.

**SERMET-GAUDELUS I, VALLEE B, URBIN I, TOROSSI T, MARIANOVSKI R,  
FAJAC A et al.**

Normal function of the cystic fibrosis conductance regulator protein can be associated with homozygous (Delta)F508 mutation.  
Pediatr Res 2002 ; 52 (5) : 628-635.

**SHORT DB, TROTTER KW, RECZEK D, KREDA SM, BRETSCHER A, BOUCHER RC et al.**

An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton.

J Biol Chem 1998 ; 273 (31) : 19797-19801.

**SHUAI K.**

Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins.  
Oncogene 2000 ; 19 (21) : 2638-2644.

**SHUTER J, HATCHER VB, LOWY FD.**

Staphylococcus aureus binding to human nasal mucin.  
Infect Immun 1996 ; 64 (1) : 310-318.

**SIEBENLIST U, FRANZOSO G, BROWN K.**

Structure, regulation and function of NF-kappa B.  
Annu Rev Cell Biol 1994 ; 10:405-455.

**SIGNAS C, RAUCCI G, JONSSON K, LINDGREN PE, ANANTHARAMAIAH GM, HOOK M et al.**

Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides.  
Proc Natl Acad Sci U S A 1989 ; 86 (2) : 699-703.

**SINGH PK, TACK BF, MCCRAY PB, JR., WELSH MJ.**

Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 279 (5) : L799-L805.

**SINHA B, FRANCOIS P, QUE YA, HUSSAIN M, HEILMANN C, MOREILLON P et al.**

Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells.

Infect Immun 2000 ; 68 (12) : 6871-6878.

**SLEIGH MA, BLAKE JR, LIRON N.**

The propulsion of mucus by cilia.

Am Rev Respir Dis 1988 ; 137 (3) : 726-741.

**STEIN B, BALDWIN AS, JR., BALLARD DW, GREENE WC, ANGEL P, HERRLICH P.**

Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function.

EMBO J 1993 ; 12 (10) : 3879-3891.

**STOTLAND PK, RADZIOCH D, STEVENSON MM.**

Mouse models of chronic lung infection with Pseudomonas aeruginosa: models for the study of cystic fibrosis.

Pediatr Pulmonol 2000 ; 30 (5) : 413-424.

**STUTMAN HR, LIEBERMAN JM, NUSSBAUM E, MARKS MI.**

Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial.

J Pediatr 2002 ; 140 (3) : 299-305.

**SWITALSKI LM, PATTI JM, BUTCHER W, GRISTINA AG, SPEZIALE P, HOOK M.**

A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage.

Mol Microbiol 1993 ; 7 (1) : 99-107.

**TABARY O, ZAHM JM, HINNARSKY J, COUETIL JP, CORNILLET P, GUENOUNOU M et al.**

Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro.

Am J Pathol 1998 ; 153 (3) : 921-930.

**TAKEDA K, AKIRA S.**

Toll-like receptors in innate immunity.

Int Immunol 2005 ; 17 (1) : 1-14.

**TIROUVANZIAM R, DE BS, HUBEAU C, HINNARSKY J, JACQUOT J, PEAULT B et al.**

Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts.

Am J Respir Cell Mol Biol 2000 ; 23 (2) : 121-127.

**TRAVASSOS LH, GIRARDIN SE, PHILPOTT DJ, BLANOT D, NAHORI MA, WERTS C et al.**

Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. EMBO Rep 2004 ; 5 (10) : 1000-1006.

**TRAVIS SM, CONWAY BA, ZABNER J, SMITH JJ, ANDERSON NN, SINGH PK et al.**

Activity of abundant antimicrobials of the human airway.

Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (5) : 872-879.

**TRIVIER D, HOUDRET N, COURCOL RJ, LAMBLIN G, ROUSSEL P, DAVRIL M.**

The binding of surface proteins from *Staphylococcus aureus* to human bronchial mucins.

Eur Respir J 1997 ; 10 (4) : 804-810.

**TUFANO MA, CIPOLLARO DE LG, IANNIELLO R, GALDIERO M, GALDIERO F.**

Protein A and other surface components of *Staphylococcus aureus* stimulate production of IL-1 alpha, IL-4, IL-6, TNF and IFN-gamma.

Eur Cytokine Netw 1991 ; 2 (5) : 361-366.

**UEHARA A, FUJIMOTO Y, KAWASAKI A, KUSUMOTO S, FUKASE K, TAKADA H.**

Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1.

J Immunol 2006 ; 177 (3) : 1796-1804.

**ULRICH M, HERBERT S, BERGER J, BELLON G, LOUIS D, MUNKER G et al.**  
Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence.  
Am J Respir Cell Mol Biol 1998 ; 19 (1) : 83-91.

**VAN HEECKEREN AM, SCHLUCHTER MD, DRUMM ML, DAVIS PB.**  
Role of Cftr genotype in the response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 287 (5) : L944-L952.

**VANDAMME P, HOLMES B, COENYE T, GORIS J, MAHENTHIRALINGAM E, LIPUMA JJ.,et al.**  
*Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story.  
Res Microbiol. 2003 Mar ; 154 (2) : 91-6.

**VANDAMME P, HENRY D, COENYE T, NZULA S, VANCANNEYT M, LIPUMA JJ, .et al.**  
*Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools.  
FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Jun 3 ; 33 (2) : 143-9.

**VANDENABEELE P, DECLERCQ W, BEYAERT R, FIERS W.**  
Two tumour necrosis factor receptors: structure and function.  
Trends Cell Biol 1995 ; 5 (10) : 392-399.

**VIDAL VF, CASTERAN N, RIENDEAU CJ, KORNFELD H, DARCISSAC EC, CAPRON A et al.**  
Macrophage stimulation with Murabutide, an HIV-suppressive muramyl peptide derivative, selectively activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, C/EBP $\beta$  and STAT1: role of CD14 and Toll-like receptors 2 and 4.  
Eur J Immunol 2001 ; 31 (7) : 1962-1971.

**VOGELMEIER C, HUBBARD RC, FELLS GA, SCHNEBLI HP, THOMPSON RC, FRITZ H et al.**  
Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor.  
J Clin Invest 1991 ; 87 (2) : 482-488.

**VOYNOW JA, GENDLER SJ, ROSE MC.**  
Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases.  
Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (6) : 661-665.

**WALEV I, RESKE K, PALMER M, VALEVA A, BHAKDI S.**  
Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes.  
EMBO J 1995 ; 14 (8) : 1607-1614.

**WALEV I, WELLER U, STRAUCH S, FOSTER T, BHAKDI S.**  
Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*.  
Infect Immun 1996 ; 64 (8) : 2974-2979.

**WANG Q, DZIARSKI R, KIRSCHNING CJ, MUZIO M, GUPTA D.**  
Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8.  
Infect Immun 2001 ; 69 (4) : 2270-2276.

**WESCHE H, KORHERR C, KRACHT M, FALK W, RESCH K, MARTIN MU.**  
The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases).  
J Biol Chem 1997 ; 272 (12) : 7727-7731.

**WIDDICOMBE JG, PACK RJ.**  
The Clara cell.  
Eur J Respir Dis 1982 ; 63 (3) : 202-220.

**WOLZ C, POHLMANN-DIETZE P, STEINHUBER A, CHIEN YT, MANNA A, VAN WAMEL W et al.**  
Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus sar in Staphylococcus aureus.  
Mol Microbiol 2000 ; 36 (1) : 230-243.

**WORLITZSCH D, TARRAN R, ULRICH M, SCHWAB U, CEKICI A, MEYER KC, et al.**  
Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients.  
J Clin Invest. 2002 ;109(3) : 317-25.

**WU Q, LU Z, VERGHESE MW, RANDELL SH.**  
Airway epithelial cell tolerance to Pseudomonas aeruginosa.  
Respir Res 2005 ; 626.

**XU M, WANG Z, LOCKSLEY RM.**  
Innate immune responses in peptidoglycan recognition protein L-deficient mice.  
Mol Cell Biol 2004 ; 24 (18) : 7949-7957.

**YAMADA KM, GEIGER B.**  
Molecular interactions in cell adhesion complexes.  
Curr Opin Cell Biol 1997 ; 9 (1) : 76-85.

**YARON A, HATZUBAI A, DAVIS M, LAVON I, AMIT S, MANNING AM et al.**  
Identification of the receptor component of the IkappaBalphab-ubiquitin ligase.  
Nature 1998 ; 396 (6711) : 590-594.

**YOSHIMURA A, LIEN E, INGALLS RR, TUOMANEN E, DZIARSKI R, GOLENBOCK D.**  
Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2.  
J Immunol 1999 ; 163 (1) : 1-5.

**ZAHM JM, CHEVILLARD M, PUCHELLE E.**

Wound repair of human surface respiratory epithelium.  
Am J Respir Cell Mol Biol 1991 ; 5 (3) : 242-248.

**ZHANG P, SUMMER WR, BAGBY GJ, NELSON S.**

Innate immunity and pulmonary host defense.  
Immunol Rev 2000 ; 17339-51.

**ZHANG Y, DEWITT DL, MCNEELY TB, WAHL SM, WAHL LM.**

Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases.  
J Clin Invest 1997 ; 99 (5) : 894-900.

**ZLOTNIK A, YOSHIE O.**

Chemokines: a new classification system and their role in immunity.  
Immunity 2000 ; 12 (2) : 121-127.

La mucoviscidose (CF) est la maladie génétique autosomale récessive la plus fréquente au sein de la population caucasienne. Elle est caractérisée par une inflammation respiratoire chronique et des infections bactériennes répétées. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est un des premiers pathogènes à coloniser l'appareil respiratoire des patients mucoviscidosiques. Il précède généralement la colonisation chronique de l'épithélium respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, le rôle spécifique de *S. aureus* dans la réponse inflammatoire et les lésions de l'épithélium est encore mal connu.

Nos résultats montrent que l'intégrité membranaire des cellules épithéliales respiratoires humaines (HAEC) normales est altérée après une interaction prolongée (24h) avec *S. aureus*. Le déséquilibre entre les facteurs de virulence bactériens solubles (FV) secrétés et la sécrétion de protéines à activité antibactérienne est en relation avec la charge bactérienne. De plus, l'étude de la réponse transcriptionnelle des HAEC après interaction dynamique avec *S. aureus* montre que les cellules épithéliales sont plus sensibles aux FV de *S. aureus* qu'à *S. aureus* vivant. De même, l'étude des réponses précocees transcriptionnelles et traductionnelles des HAEC non-CF et CF, révèle que les cellules CF sont plus sensibles que les cellules non-CF aux FV de *S. aureus*, et ceci plus particulièrement en ce qui concerne la régulation des facteurs pro-inflammatoires.

Ces résultats suggèrent que l'épithélium respiratoire, en particulier l'épithélium respiratoire CF, est particulièrement sensible aux FV de *S. aureus* notamment au niveau de la perméabilité membranaire et de la réponse pro-inflammatoire des HAEC.

**Mots Clés :** Mucoviscidose, *Staphylococcus aureus*, Facteurs de virulence solubles, Cellules épithéliales respiratoires humaines, Réponse transcriptionnelle, Réponse traductionnelle.

---

Cystic fibrosis (CF) is the most frequent recessive genetic disease among the caucasian population. CF disease is characterised by chronic respiratory inflammation and bacterial infections. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the first pathogens that colonises the respiratory tract of CF patients and generally precedes *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonisation. There is a balance between respiratory epithelial cell mechanisms of defence and injury induced by bacteria such as *S. aureus*. However, only few studies have been carried out on the specific role of *S. aureus* in inflammatory and airway epithelial injury responses.

Our results show that normal human airway epithelial cells (HAEC) membrane integrity is altered after prolonged interaction (24h) with alive *S. aureus*. Imbalance between secreted bacterial soluble virulence factors (VF) and antibacterial proteins secretion is related to bacterial concentration. Moreover, the transcriptional response of epithelial cells demonstrates higher sensitivity to *S. aureus* VF than to *S. aureus* alive. Early dynamic transcriptional and translational responses study of non-CF and CF HAEC show that CF cells are more sensitive to *S. aureus* VF than non-CF cells, in particular for the pro-inflammatory factor regulation implicated in innate immunity response regulation.

These results suggest that respiratory epithelium, in particular the CF respiratory epithelium, is particularly sensitive to *S. aureus* VF mainly regarding membrane permeability and HAEC pro-inflammatory response.

**Key words :** Cystic fibrosis, *Staphylococcus aureus*, Soluble virulence factors, Human respiratory epithelial cells, Transcriptional response, Translational response.