

2m11.3100.4

Université de Montréal

**Conséquence du choc hypotonique sur le transport sodique
des cellules épithéliales alvéolaires de type II**

par
Marie-Claude Tessier
Département de Médecine, Université de Montréal
Faculté de médecine

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

Avril, 2003

© Marie-Claude Tessier, 2003



W

4

U58

2003

v.150

C

C

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Conséquence du choc hypotonique sur le transport sodique
des cellules épithéliales alvéolaires de type II**

présenté par :
Marie-Claude Tessier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur :	_____	Pierre Haddad
Directeur de recherche :	_____	Yves Berthiaume
Codirecteur de recherche :	_____	Ryszard Grygorczyk
Membre du jury :	_____	Emmanuelle Brochiero

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

La transplantation pulmonaire demeure l'option thérapeutique finale pour les patients atteints d'insuffisance respiratoire causée par plusieurs maladies dont la fibrose kystique. Malgré le taux de réussite de ces transplantations, il persiste des situations de dysfonction immédiate du greffon secondaire à des lésions d'ischémie-reperfusion. Lors de ce processus lésionnel on note une augmentation du volume cellulaire. Les mécanismes impliqués dans ces changements de volume cellulaire demeurent toutefois plus ou moins connus, mais ils pourraient être reliés à des modifications de l'ATP cellulaire.

Plusieurs travaux démontrent que les changements de volume causés par les chocs hypotoniques entraînent la libération d'ATP. L'ATP est impliquée dans le mécanisme de diminution compensatrice de volume et modifie le transport de différents ions. Le but de cette étude était de déterminer, au niveau des cellules épithéliales alvéolaires de type II chez le rat adulte, l'impact du choc hypotonique sur le transport ionique et l'implication de l'ATP dans ce processus. Les travaux effectués dans ce mémoire démontrent que le choc hypotonique (20 %) entraîne une augmentation du courant de court-circuit (I_{sc}) de 50 %, liée principalement à une augmentation du transport sodique (Na^+), et cause une libération d'ATP significative. Toutefois, l'application d'ATP (100 μM) exogène entraîne une diminution du transport de Na^+ de 25 %. De plus, la présence d'inhibiteurs purinergiques ne modifient pas le I_{sc} observé lors de choc hypotonique. Par conséquent, le choc hypotonique entraîne une augmentation du transport sodique qui n'est toutefois pas reliée à un effet autocrine/paracrine par l'ATP libérée.

Mots-clés : ATP, cellules épithéliales alvéolaires, fibrose kystique, lésions ischémie-reperfusion, récepteur purinergique, transplantation pulmonaire, transport ionique.

SUMMARY

Lung transplantation is the final option for patients with respiratory failure present in diseases such as cystic fibrosis. Despite the success level of transplantation, graft dysfunction secondary to ischemia-reperfusion injury remains. During this injury process we observe an increase in cell volume. The exact mechanism underlying ischemic injury due to cell swelling is still unknown but it could be related to a modification in cellular ATP content.

Some studies have demonstrated that cell swelling induced by hypotonic shock, which causes ATP release, is implicated in regulatory volume decrease mechanisms and modifies ion transport. The objective of this study was to characterize, in adult rat alveolar type II cells, the impact of hypotonic shock on ion transport and the role of released ATP. Work done in this Masters thesis shows that hypotonic shock (20 %) increases total short-circuit current (I_{sc}) by 50 %, due in most part to sodium transport increase. It also induces significant ATP release. However, extracellular ATP application (100 μ M) reduces Na^+ transport by 25 %. Moreover, the presence of purinergics inhibitors has no effect on the increase in I_{sc} induced by hypotonic shock. Therefore, the increase in Na^+ transport induced by hypotonic shock is not related to an autocrine/paracrine effect of released ATP.

Keywords: ATP, alveolar epithelial cells, cystic fibrosis, ischemia/reperfusion injury, purinergic receptor, lung transplantation, ion transport.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Sommaire</i>	iii
<i>Summary</i>	iv
<i>Liste des tableaux</i>	viii
<i>Liste des figures</i>	ix
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	xi
<i>Remerciements</i>	xiv

CHAPITRE 1 :INTRODUCTION..... 1

1.1 POUMON.....	2
1.1.1 <i>Structure et Fonction générale</i>	2
1.1.2 <i>Alvéole</i>	2
1.1.3 <i>Épithélium alvéolaire</i>	4
1.1.4 <i>Transport des ions au niveau épithélial pulmonaire</i>	6
1.1.4.1 <i>Introduction</i>	6
1.1.4.2 <i>Canaux sodiques</i>	7
1.1.4.3 <i>Canaux chlores</i>	8
1.2 FIBROSE KYSTIQUE.....	10
1.2.1 <i>Introduction</i>	10
1.2.2 <i>Atteinte physiologique</i>	11
1.3 TRANSPLANTATION PULMONAIRE.....	12
1.3.1 <i>Introduction</i>	12
1.3.2 <i>Lésions d'ischémie-reperfusion</i>	13
1.3.2.1 <i>Introduction</i>	13
1.3.2.2 <i>Processus inflammatoire</i>	14
1.3.3 <i>Lésions d'ischémie-préservation-reperfusion</i>	17

1.3.3.1 Introduction.....	17
1.3.3.2 Changements de volume cellulaire.....	17
1.4 ADÉNOSINE TRIPHOSPHATE.....	23
1.4.1 <i>Introduction</i>	23
1.4.2 <i>Libération de l'ATP</i>	24
1.4.3 <i>Récepteurs purinergiques</i>	25
1.4.3.1 Classification.....	25
1.4.3.2 Voie de signalisation intracellulaire.....	26
1.4.4 <i>Effet de l'application d'ATP extracellulaire</i>	27
1.5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	28
CHAPITRE 2 :ARTICLE 1.....	30
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	35
Results.....	38
Discussion.....	41
Acknowledgements.....	45
Figure legends.....	46
References.....	58
CHAPITRE 3: DISCUSSION.....	64
3.1 IMPACT DU CHOC HYPOTONIQUE SUR LE I_{sc} TOTAL.....	66
3.1.1 <i>Impact du choc hypotonique sur la R_{te}</i>	66
3.1.2 <i>Impact du choc hypotonique sur le transport du Na^+</i>	67

3.1.2.1 Type cellulaire	68
3.1.2.2 Méthodologie.....	68
3.1.2.3 Mécanisme.....	70
3.2 EST-CE QUE L'ATP EST IMPLIQUÉE DANS LES CHANGEMENTS DE I_{sc} INDUITS PAR LE CHOC HYPOTONIQUE?	77
3.2.1 <i>Caractérisation de la cinétique de libération d'ATP induite par le choc hypotonique</i>	77
3.2.2 <i>Impact de l'application d'ATP sur le I_{sc} total</i>	82
3.2.3 <i>Impact des inhibiteurs purinergiques sur les changements de I_{sc} induits par le choc hypotonique</i>	85
3.2.3.1 Suramine.....	86
3.2.3.2 Apyrase.....	88
3.3 EST-CE QUE L'ADÉNOSINE EST IMPLIQUÉE DANS LES CHANGEMENTS DE I_{sc} INDUITS PAR LE CHOC HYPOTONIQUE?	89
3.3.1 <i>Impact de l'adénosine sur le I_{sc} total</i>	90
CHAPITRE 4 :CONCLUSION	91
<i>Bibliographie</i>	xv

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE 1 :INTRODUCTION**

Tableau I :Composition de différentes solutions de préservation..... p.19

CHAPITRE 2 :ARTICLE 1

Table I :Electrophysiological characteristics of the alveolar
epithelial cell monolayers..... p.49

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 :INTRODUCTION

- Figure 1** :Représentation de l'appareil respiratoire..... p.2
- Figure 2** :Structure des alvéoles..... p.3
- Figure 3** :Schéma de la structure de l'épithélium alvéolaire p.5
- Figure 4** :Schéma du transport ionique des cellules épithéliales
alvéolaires..... p.6
- Figure 5** :Schéma du mécanisme de l'atteinte pulmonaire de la fibrose
kystique ainsi que les différents traitements utilisés actuelle-
ment et proposés pour le futur..... p.12
- Figure 6** :Schéma du processus inflammatoire impliqué dans les lésions
d'ischémie-reperfusion..... p.16

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

- Figure 1** :Effect of 20% hypotonic shock on I_{sc} p.50

- Figure 2** :Effect of amiloride pretreatment on 20% hypotonic shock-induced changes in I_{sc} p.51
- Figure 3** :ATP accumulation on the apical side of alveolar epithelial cell monolayers after 20% hypotonic shock..... p.52
- Figure 4** :Effect of ATP on I_{sc} p.53
- Figure 5** :Effect of amiloride pretreatment on ATP-induced changes in I_{sc} p.55
- Figure 6** :Effect of purinergic inhibitors on changes in I_{sc} induced by 20% hypotonic shock..... p.56
- Figure 7** :Effect of adenosine on I_{sc} p.57

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A3P5P	<i>Adenosine-3'-phosphate-5'-phosphate</i>
A3P5PS	<i>Adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate</i>
A549	Lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain
A6	Lignée cellulaire de cellules épithéliales rénales
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATI	<i>Alveolar type I cells</i>
ATII	<i>Alveolar type II cells</i>
ATP	Adénosine triphosphate
Ca²⁺_i	Calcium intracellulaire
Calu-3	Lignée cellulaire d'adénocarcinome d'une effusion pleurale pulmonaire humaine
CAMK II	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CAP	<i>Channel-activating protease</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CIC	Classe particulière de canaux Cl ⁻
cm²	Centimètre carré
cNOS	<i>Constitutive nitric oxide synthase</i>
DAG	Diacyl glycérol
Ecto-ATPase	Ecto-adénosine triphosphatase
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FBS	<i>Foetal bovine serum</i>

FDLE	<i>Foetal distal lung epithelia</i>
GTPase	Guanosine triphosphatase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HTC	Lignée cellulaire d'hépatome de rat
iNOS	<i>Inducible nitric oxyde synthase</i>
IK	<i>Intermediate conductance calcium activated potassium channel</i>
IP₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
I_{sc}	Courant de court-circuit
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LPD	<i>Low potassium dextran solution</i>
LTB₄	Leucotriène B ₄
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney cells lines</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
mpkCCD(c14)	<i>Mouse cortical collecting duct cell line</i>
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
mV	Millivolt
Na⁺/H⁺	Échangeur sodium/proton
Na⁺/HCO₃⁻	Co-transporteur sodium/bicarbonate
Na⁺/K⁺ ATPase	Pompe sodium/potassium adénosine triphosphatase
Na⁺/K⁺/2Cl⁻	Co-transporteur sodium/potassium/2 chlores
Nedd-4	<i>Neuronal precursor cell expressed developmentally down-regulated 4</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NO	Oxyde nitrique
NSCC	<i>Non selective cationic channel</i>
O₂⁻	Radical superoxyde
OH⁻	Radical hydroxyl

ONOO⁻	Peroxynitrite
ORCC	<i>Outwardly Rectifying Chloride Channel</i>
p38	p38 MAP Kinase
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PKC	Protéine kinase C
PLA₂	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMN	Neutrophile polymorphonucléaire
ROMK	Renally derived K _{ATP} channel
R_{te}	Résistance transépithéliale
RVD	<i>Regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>Regulatory volume increase</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor- beta</i>
TNF-α, -β	<i>Tumor necrosis factor-alpha, - beta</i>
μA	Microampère
UTP	Uridine triphosphate
UW	<i>University of Wisconsin solution</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VSOAC	<i>Volume-sensitive organic anion channel</i>
V_{te}	Différence de potentiel transépithéliale

Remerciements

La maîtrise a été pour moi une merveilleuse expérience tant au niveau professionnel que personnel. Premièrement quel choc ce fût pour moi, qui venait d'une campagne pas si lointaine, d'aller étudier en ville. Toute une adaptation! Je commence à peine à m'y faire. Une chose est sûre, c'est que Montréal m'aura permise, grâce à son transport en commun, de développer ma patience... J'ai aussi rencontré plein de gens intéressants et vécu de nouvelles expériences. Nous n'avons qu'à penser au Sushi! Professionnellement, la maîtrise a mise au défi ma curiosité, mes habiletés, ma volonté et mes capacités. Je n'ai pas lâché prise et je crois que j'ai relevé ce défi avec succès! Toutefois, cette réussite n'est pas seulement le fruit de mes efforts, mais elle est aussi attribuable aux personnes formidables qui m'entourent.

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr. Yves Berthiaume, mon directeur de recherche, non seulement pour m'avoir dirigée dans ma démarche scientifique mais aussi pour son humanité, sa compréhension et son écoute. Par ailleurs, j'aimerais remercier le Dr. Ryszard Grygorczyk, mon codirecteur de recherche, pour sa précieuse aide technique et aussi pour son aide en anglais. J'aimerais remercier de façon générale tout le laboratoire pour l'ambiance de travail qui est plus qu'agréable. Plus spécialement, j'aimerais remercier Héléne Chabot (ass. de recherche pour le Dr. Grygorczyk) parce qu'elle a toujours une solution aux problèmes techniques, mais aussi pour toutes nos conversations sur les aberrations du système et de la société. D'autre part, j'aimerais remercier Chantal Massé (ass. de recherche pour le Dr. Berthiaume) pour toutes ses réponses à mes questions si simples mais si importantes en même temps. J'aimerais aussi remercier le Dr. Emmanuelle Brochiero, jeune chercheuse, qui est pour moi un modèle de par sa réussite, sa disponibilité, sa simplicité et sa franchise. En terminant, j'aimerais remercier Rosalie Fréchette pour tout le bonheur que j'ai eu à travailler avec elle, pour son sourire, son humour et son amitié; mon copain François pour son amour et son soutien dans les périodes difficiles et finalement, Carmen et Lucie, pour les corrections en grammaire.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION



1.1 Poumon

1.1.1 Structure et Fonction générale

Le système respiratoire se divise en deux zones principales qui assurent l'oxygénation du sang et l'élimination du gaz carbonique. La zone conductrice, qui comprend le nez, le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches et les bronchioles, permet d'acheminer l'air vers les poumons. La zone respiratoire, composée de bronchioles respiratoires et des alvéoles, constitue pour sa part le site des échanges gazeux (110).

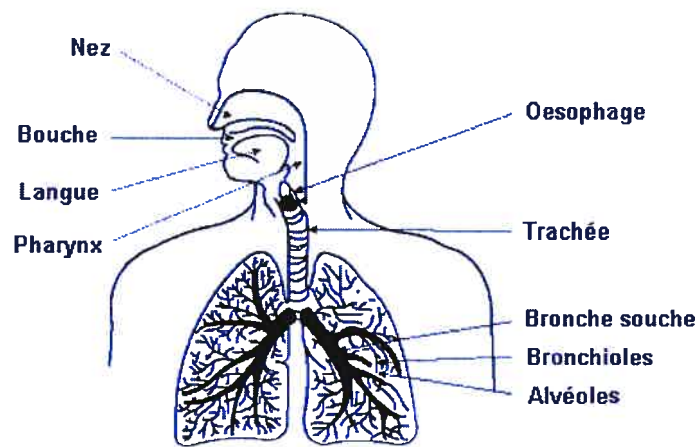


Figure 1 : Représentation de l'appareil respiratoire

1.1.2 Alvéole

La structure de l'alvéole est composée de cellules alvéolaires de type I (ATI) et de type II (ATII), aussi nommées pneumocytes. On retrouve également, dans les alvéoles, les macrophages alvéolaires qui ont pour rôle de phagocyter les débris inhalés et les bactéries. Ils constituent un mécanisme de défense important.

Chaque alvéole contient aussi des capillaires sanguins dans lesquels le sang circule (110). Une mince paroi d'environ $0,5\ \mu\text{m}$, appelée membrane alvéolo-capillaire, sépare l'alvéole des capillaires sanguins. Cette minceur favorise la diffusion rapide des gaz respiratoires (116).

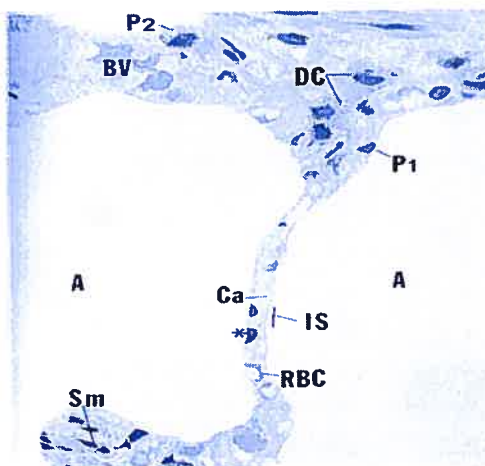


Figure 2 : Structure des alvéoles¹. Les alvéoles (A) sont séparées par une cloison interalvéolaire (IS). Toute l'alvéole ainsi que les cloisons interalvéolaires sont recouvertes de capillaires (Ca), de pneumocytes de type I (P1) et de type II (P2). On peut observer dans un des capillaires un noyau (*) de cellule du revêtement endothélial qui fait saillie dans la lumière contenant des globules rouges (RBC). Au niveau des cloisons interalvéolaires (IS) plus épaisses, on retrouve des vaisseaux sanguins (BV) et des éléments conjonctifs tels que les macrophages (DC). Vous remarquerez aussi la présence de cellules musculaires lisses (Sm) à l'entrée des alvéoles.

Les cellules ATI sont des cellules pavimenteuses c'est-à-dire de forme allongée et très mince ce qui facilite les échanges air-sang. Elles couvrent 90 % des sacs alvéolaires et des alvéoles, mais ne représentent qu'environ 40 % de la population de cellules épithéliales alvéolaires. De forme cuboïde, les cellules ATII représentent, pour leur part, 60 % de la population et n'occupent que 5 à 10 % de la

¹ Gartner, L.P. et Hiatt, J.L. Atlas d'histologie, éditions de Boeck Université, p.191

surface des alvéoles (110). Le surfactant, produit par ces cellules, est composé de phospholipides et de lipoprotéines (43). Il réduit la tension superficielle du liquide alvéolaire ce qui permet de maintenir une faible quantité de liquide à la surface des alvéoles (131). Le surfactant assure également la stabilité mécanique de l'alvéole afin de l'empêcher de se collaber à chaque respiration. L'origine du liquide alvéolaire présent entre le surfactant et les cellules épithéliales est inconnue, cependant il permet de maintenir l'humidité des cellules alvéolaires (43). Les cellules ATII ont aussi un rôle de précurseurs des cellules ATI que ce soit lors du développement normal du poumon ou suite à des lésions qui requièrent une réparation de l'épithélium alvéolaire. De plus, les cellules ATII semblent être impliquées dans la clairance alvéolaire (78).

1.1.3 Épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire, formé des cellules ATI et ATII, a pour rôle le contrôle de la quantité et de la qualité du film liquidien, et ce grâce à ses fonctions de transport ionique. L'épithélium est constitué de cellules épithéliales polarisées c'est-à-dire que les cellules possèdent une membrane apicale (luminale) et basolatérale (en contact avec l'interstitium) dont la composition protéique diffère. Les cellules épithéliales sont rattachées entre elles à leurs pôles apicaux grâce à des jonctions serrées. Ces jonctions forment un espace intercellulaire qui sépare les membranes basolatérales les unes des autres. L'ensemble du complexe jonctionnel et de l'espace intercellulaire constitue la voie paracellulaire au travers de laquelle il peut y avoir du transport passif des électrolytes et de l'eau. Soulignons que ce transport

passif est secondaire au transport actif transcellulaire qui correspond au passage à travers la cellule des électrolytes via des canaux ioniques au niveau apical et de la pompe Na^+/K^+ ATPase au niveau basolatéral (43). Par ailleurs, l'épithélium alvéolaire est dit serré, car ces jonctions permettent de former un épithélium de haute résistance. Cette particularité de l'épithélium est caractérisé par une voie paracellulaire faible contrairement à un épithélium de type lâche. Ce dernier possède une voie paracellulaire de grande conductivité et par conséquent une faible résistance transépithéliale. Le tubule proximale rénale est un bon exemple d'épithélium dit lâche où l'on retrouve des transports transcellulaires actifs et des transports paracellulaires passifs (Na^+ et Cl^-) secondaires à des différences transépithéliales de concentration et de potentiel électrique (87).

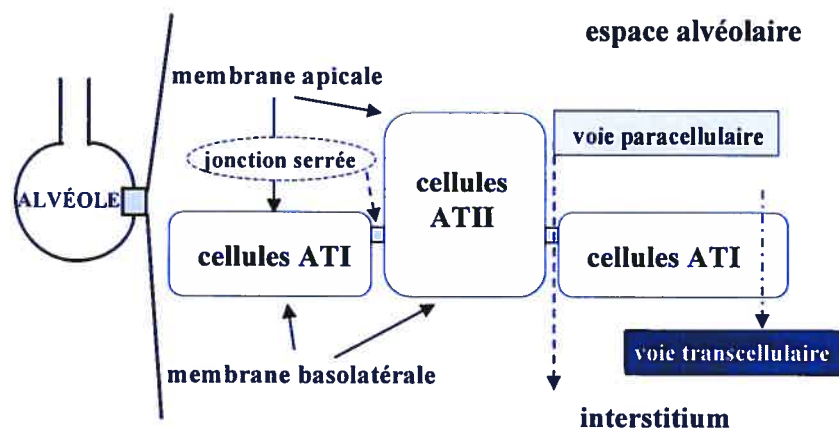


Figure 3 : Schéma de la structure de l'épithélium alvéolaire

1.1.4 Transport des ions au niveau épithélial pulmonaire

1.1.4.1 Introduction

Il existe de nombreux canaux ioniques de part et d'autre de la monocouche des cellules épithéliales alvéolaires. Au niveau des cellules ATI, on retrouve, entre autre, le canal sodique apical ENaC (*epithelial sodium channel*) et la pompe Na^+/K^+ ATPase à la membrane basolatérale (56). Pour ce qui est des cellules ATII, on retrouve principalement au niveau apical des canaux sodiques (Na^+) tel que ENaC, plusieurs types de canaux chlores (Cl^-) dont le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) et des canaux potassiques (K^+) (26; 84) (23). Au niveau basolatéral se trouve la pompe Na^+/K^+ ATPase, des canaux K^+ et le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (68; 127). Par ailleurs, des canaux perméables à l'eau sont présent au niveau de la membrane apicale des cellules ATI mais semblent être absent au niveau des cellules ATII. Il s'agit d'aquaporines de type 5. Il existe différents type d'aquaporines dans le poumon qui permettent l'absorption de molécules d'eau par les cellules épithéliales. Toutefois, le rôle exacte de celles-ci demeure incertain et des études plus approfondies sont nécessaires (119).

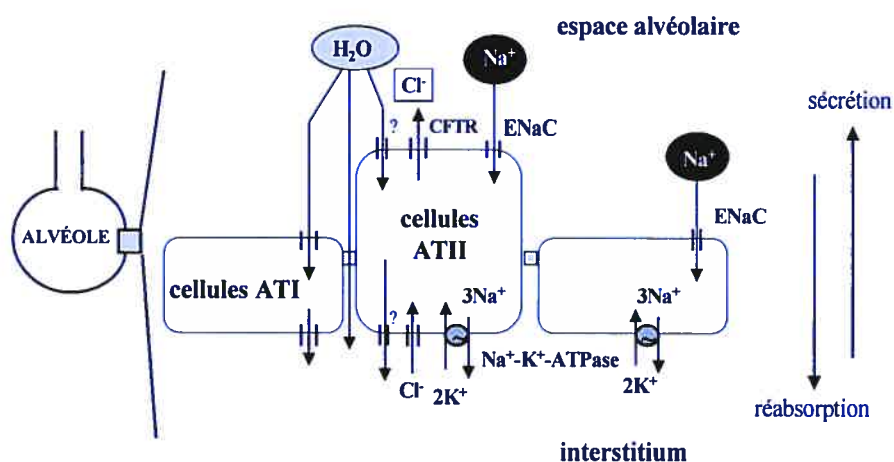


Figure 4 : Schéma du transport ionique des cellules épithéliales alvéolaires

1.1.4.2 Canaux sodiques

Le transport sodique constitue la partie la plus importante du transport ionique des cellules alvéolaires. D'une part, parce qu'il est responsable de la majorité (50-90 %) du courant de court-circuit (I_{sc}) généré par les cellules alvéolaires en chambre de Ussing. En effet, on observe suite à l'application d'amiloride 1-10 μM du côté apical de la monocouche une inhibition presque complète du courant transépithélial (78). D'autre part, parce qu'il a pour rôle de maintenir un niveau d'hydratation adéquat du liquide retrouvé à la surface aérienne des alvéoles (35). En effet, l'absorption de Na^+ , c'est-à-dire une entrée de Na^+ de l'espace alvéolaire vers les structures sous-épithéliales, s'accompagne d'un mouvement d'eau ce qui limite l'hydratation du mucus (35).

L'absorption passive de Na^+ au niveau apical, c'est-à-dire favorisée par le gradient électrochimique, est possible grâce à la pompe Na^+/K^+ ATPase. En effet, cette dernière entraîne une sortie de Na^+ vers le pôle sanguin contre son gradient de concentration par un mode de transport actif et est par conséquent le « moteur » de l'influx de Na^+ à la membrane apicale (6).

Au niveau de la membrane apicale, l'absorption de Na^+ s'effectue principalement par deux types de canaux apicaux : ENaC, qui est un canal sélectif au Na^+ , et le NSCC (*non selective cationic channel*), qui est un canal cationique non sélectif. Le canal sodique appelé ENaC est composé de trois sous-unités, alpha (α), bêta (β) et

gamma (γ), et forme un tétramère (2α , 1β et 1γ) (15). Ces différentes sous-unités ont été clonées chez le rat par Canessa et coll., plus précisément en 1993 pour la sous-unité α (14), suivie en 1994 des sous-unités β et γ (16). Ce canal est hautement sensible à l'amiloride puisqu'une concentration aussi faible que $1\ \mu\text{M}$ est suffisante pour l'inhiber (35). Pour ce qui est du NSCC, Feng et coll. ont montré sa présence au niveau de la membrane apicale des cellules ATII chez le rat adulte en 1993 (32). Comme ENaC, le NSCC est sensible à l'amiloride, mais à une concentration supérieure, soit d'environ $10\ \mu\text{M}$. De plus, l'activité de ce canal est dépendante du niveau de calcium intracellulaire ($\text{Ca}^{2+}_i > 0.1\ \text{mM}$) (78). Par ailleurs, l'entrée de Na^+ est également possible par d'autres types de transporteurs tels que : le co-transporteur Na^+ -D-glucose (85) et Na^+ -acides aminés (55). Cependant, ceux-ci sont responsables d'une faible fraction de l'influx total de Na^+ (78).

Au niveau de la membrane basolatérale, le transport de sodium se traduit d'une part par un influx de Na^+ à travers le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ sensible au furosémide et au bumétanide (103), l'échangeur Na^+/H^+ (71) ou le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (70). D'autre part, il y a un efflux de Na^+ par la pompe Na^+/K^+ ATPase sensible à la ouabaine (23).

1.1.4.3 Canaux chlores

La sécrétion de chlore (Cl^-), c'est-à-dire de la structure sous-épithéliale vers l'espace aérien, se traduit par une entrée de Cl^- dans la cellule épithéliale via le co-

transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ basolatéral, suivi de la sortie d'ions Cl^- à la membrane apicale au travers des canaux Cl^- . Toutefois, cet efflux est possible grâce à l'activation des canaux K^+ qui permettent le maintien d'un gradient électrique favorable. En absence de cette co-activation, l'ouverture des canaux Cl^- apicaux ne produirait pas en elle-même de flux sortant puisque la sécrétion de Cl^- s'effectue dans le sens d'un gradient chimique défavorable (23). Il existe différents types de canaux Cl^- tels que les canaux activés par l' AMP_c et ceux qui sont sensibles à l'augmentation du Ca^{2+}_i . Notons que ces derniers peuvent aussi être directement activés par l'ATP extracellulaire via les récepteurs purinergiques (112). Finalement, il y a les canaux Cl^- activés lors de changements de volume cellulaire où l'on retrouve les canaux de la famille des ClC et plus particulièrement le ClC-2 (129). Ce dernier est activé par les chocs hypotoniques, la diminution du pH intracellulaire et l'hyperpolarisation. De plus, il pourrait constituer une alternative dans le transport de Cl^- chez les patients atteints de la fibrose kystique souffrant d'un défaut du canal CFTR (129).

Le CFTR est un canal Cl^- de faible conductance (7-11 pS) de la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) activés par l' AMP_c . En plus de sa fonction de canal ionique, le CFTR influence d'autres processus cellulaires (89). Entre autre, certains résultats expérimentaux suggèrent que le CFTR pourrait modifier l'activité d'autres types de canaux tels que le ORCC (*outwardly rectifying chloride channel*) (18), ENaC (126) et possiblement ROMK2 (renally derived K_{ATP} channel) (13). Le ORCC est un canal Cl^- à courant rectifiant sortant sensible au

voltage, à l'AMP_c et à l'augmentation du Ca²⁺_i (105). Soulignons que l'activité du canal ORCC est diminuée en l'absence d'un CFTR fonctionnel (2). De plus, des études ont démontré qu'en absence du CFTR, l'AMP_c augmenterait le courant amiloride-sensible (ENaC), tandis que la co-expression avec le CFTR aurait l'effet opposé (111). Toutefois, l'existence d'une relation directe entre le CFTR et ENaC n'a jamais été démontrée avec exactitude jusqu'à ce jour (64).

1.2 Fibrose kystique

1.2.1 Introduction

La fibrose kystique est une maladie héréditaire autosomique récessive (1/4) dont 1 nouveau-né sur 2500 naissances serait atteint dans la population caucasienne (12). Cette maladie, aussi appelée mucoviscidose, est causée par une mutation du gène CFTR qui est situé sur le bras long du chromosome 7. Ce gène, cloné en 1989 au « *Hospital for Sick children* » à Toronto par Riordan et coll. (98), est constitué d'environ 230 000 paires de bases définissant 27 exons (19). Depuis sa découverte, plus de 850 mutations du CFTR ont été décrites et sont regroupées sous 5 classes (133). Le gène de la fibrose kystique est exprimé dans de nombreuses cellules épithéliales, soit au niveau du pancréas, de l'intestin, des glandes sudoripares, des glandes salivaires, de l'épididyme et du poumon (19). Au niveau des voies aériennes, il s'exprime plus précisément au niveau de l'épithélium de surface et surtout au niveau des glandes sous-muqueuses (89).

1.2.2 Atteinte physiologique

De part la localisation de CFTR dans divers organes, la fibrose kystique occasionne de multiples problèmes allant, par exemple, de déficits vitaminiques causés par la malabsorption des graisses, à la stérilité chez l'homme (24). Cependant, 90 % de la morbidité et mortalité causées par cette maladie est associée à l'atteinte pulmonaire. La fibrose kystique, caractérisée par une altération de la fonction épithéliale, entraîne une diminution de la sécrétion d'ions Cl^- et une hyperabsorption d'ions Na^+ (12). Ces anomalies entraînent une absorption excessive d'eau ce qui entraîne une déshydratation du mucus et par le fait même une diminution de la clairance mucociliaire pulmonaire (19). De plus, les patients atteints de la fibrose kystique sont affligés d'infections chroniques et récurrentes à *Staphylococcus aureus*, *Hemophilus influenza* et de façon plus importante par la bactérie opportuniste à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* (4). Malgré l'utilisation d'antibiotiques, ces colonisations entraînent une forte stimulation du système immunitaire et causent de l'inflammation. Celle-ci peut être réduite à l'aide d'anti-inflammatoires. Cependant, la chronicité de ces infections cause à long terme des dommages tissulaires, des bronchiectasies. L'ensemble des ces lésions entraîneront à plus ou moins long terme une insuffisance respiratoire. Lorsque l'atteinte fonctionnelle est trop grande, la seule option thérapeutique demeure la transplantation pulmonaire (19).

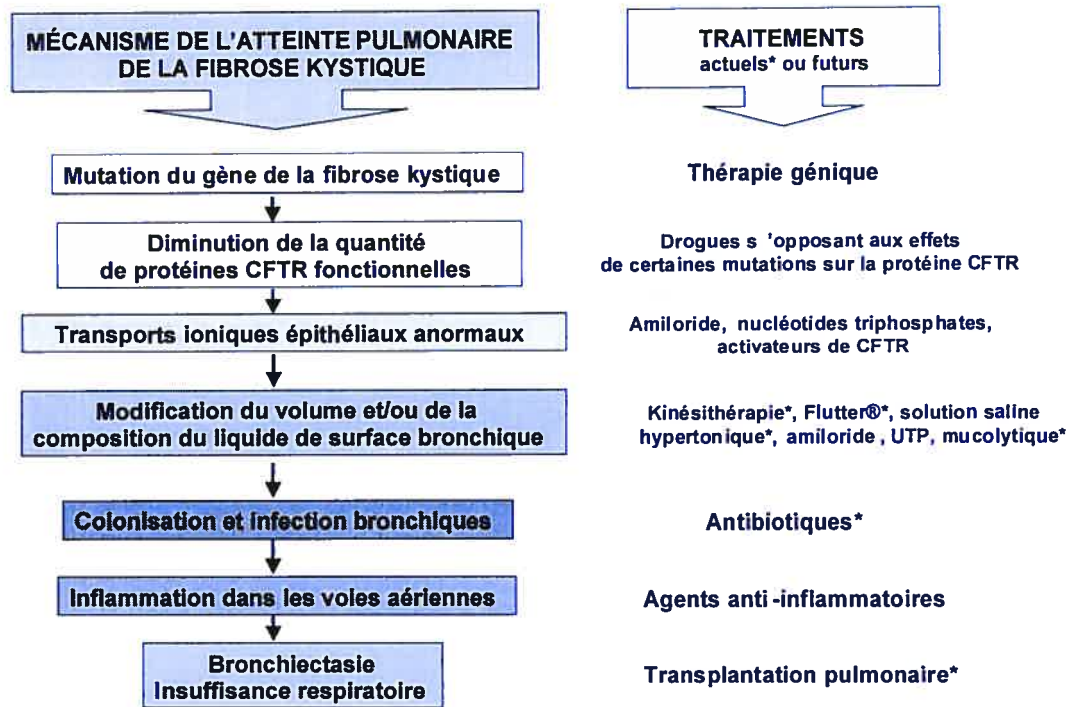


Figure 5 : Schéma du mécanisme de l'atteinte pulmonaire de la fibrose kystique ainsi que les différents traitements utilisés actuellement (*) et proposés pour le futur.

1.3 Transplantation pulmonaire

1.3.1 Introduction

La première tentative de transplantation pulmonaire humaine a eu lieu en 1963 aux États-Unis. Cependant ce n'est qu'en 1983 qu'elle fût réussie avec succès par l'équipe du Docteur J.D. Cooper au « *General Hospital* » de Toronto (31). Depuis, la transplantation pulmonaire demeure l'option thérapeutique finale non seulement pour les patients atteints de la fibrose kystique mais aussi pour tous ceux atteints d'une maladie avec une composante de détresse respiratoire. Entre autre, on retrouve des maladies comme la fibrose pulmonaire, les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) et l'hypertension pulmonaire (17).

Malgré le taux de réussite des transplantations, les taux de survie chez les patients atteints de la fibrose kystique ne sont que d'environ 80, 59 et 38 %, respectivement 1, 5 et 10 ans suivant la transplantation (30). Cela s'explique par de nombreux problèmes secondaires à la transplantation tels que les rejets de greffes, les infections et les lésions d'ischémie-reperfusion (17). Cependant, les lésions d'ischémie-reperfusion sont responsables surtout des dysfonctions initiales du greffon (3).

1.3.2 Lésions d'ischémie-reperfusion

1.3.2.1 Introduction

L'ischémie est causée par l'interruption de la perfusion sanguine. Elle entraîne des dommages irréversibles à l'organe en quelques minutes lorsque celui-ci n'est pas préservé à froid. En fait, la préservation hypothermique permet de le conserver pour une plus grande période de temps (3). Par exemple, le rein peut être préservé entre 24 et 36 heures, tandis que le poumon ne peut être préservé plus de 10 à 12 heures (53). Par la suite, il y a la reperfusion de l'organe qui engendre aussi des lésions cellulaires (3).

Les premières observations cliniques de lésions d'ischémie-reperfusion consistent en une hypoxémie, une diminution de la compliance pulmonaire et un œdème (53; 125). Au niveau histologique, on observe des dommages alvéolaires diffus (125). Le maintien de l'intégrité des cellules endothéliales ainsi que des cellules ATII a

été démontré comme étant essentiel à la préservation pulmonaire. Entre autre, au niveau des cellules ATII, la production de surfactant protège contre l'œdème pulmonaire sous des conditions physiologiques ainsi que durant des lésions pulmonaires (83). De plus, le maintien de la clairance des fluides alvéolaires par les cellules ATII permet aux patients un rétablissement plus rapide (125). En effet, les sujets ayant une diminution de la clairance alvéolaire présentaient des dommages tissulaires importants, visibles en radiographie, et souffraient d'un œdème pulmonaire. Par conséquent, il demeure important de limiter les dommages tissulaires induits suite à l'ischémie ou à un traumatisme tissulaire (125).

1.3.2.2 *Processus inflammatoire*

En premier lieu, l'ischémie-reperfusion entraîne la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un puissant agent oxydant, ainsi que des radicaux libres incluant le radical hydroxyl ($OH\cdot$), et le radical superoxyde ($O_2\cdot^-$) (3). Ceux-ci sont produits par différents types cellulaires chez le rat tels que les cellules endothéliales, les cellules ATII, les cellules de Clara, les cellules ciliées et les macrophages (48).

De plus, l'ischémie-reperfusion résulte en une dysfonction sévère de l'endothélium, caractérisée par une diminution de l'expression de cNOS (*constitutive nitric oxide synthase*), qui a pour conséquence de diminuer la libération d'oxyde nitrique (NO) endogène. Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette diminution sont inconnus (3). La voie du cNOS possède un mécanisme de régulation négative qui

permet de contrôler la synthèse du NO. Cette voie engendre normalement la libération de faibles quantités de NO, c'est-à-dire inférieures à 1 μM . Ce dernier est reconnu pour son rôle protecteur des tissus. En effet, il permet entre autre de diminuer l'agrégation plaquettaire, d'atténuer l'adhérence des leucocytes à l'endothélium et de réduire l'accumulation de H_2O_2 .

L'absence de NO endogène favorise la formation de H_2O_2 . En effet, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui n'est pas neutralisé par le NO forme du H_2O_2 par l'activité de la SOD (*superoxide dismutase*). Le H_2O_2 peut promouvoir l'activation de la phospholipase A2 (PLA_2) qui stimule la libération de médiateurs inflammatoires (PAF et LTB_4) par les cellules endothéliales. De plus, pendant la reperfusion, le H_2O_2 est converti en OH^{\cdot} qui est hautement dommageable pour les tissus.

Par ailleurs, durant la reperfusion, une augmentation de l'expression du iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) est aussi observée. Ce dernier entraîne une augmentation de la synthèse de NO supérieure à 1 μM . Contrairement à la voie du cNOS, la voie du iNOS ne possède pas de mécanisme de régulation négative et est par conséquent très néfaste pour la cellule. D'une part, elle a pour conséquence l'activation du facteur de transcription NF- κB (*nuclear factor-kappa B*) et d'autre part, elle forme le peroxynitrite (ONOO^{\cdot}) qui est très toxique. Le NF- κB régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus inflammatoire. Il induit rapidement l'expression de cytokines (TNF- α et β), diverses interleukines, chemokines, enzymes et molécules d'adhésion (3). Par ailleurs, l'activation des

molécules d'adhésion des cellules endothéliales entraînent l'adhésion des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) recrutés sur les lieux (3; 48). Ces derniers causent des dommages tissulaires de multiples façons, entre autre, par la sécrétion d'enzymes protéolytiques tel que l'élastase (3; 48), par la production de radicaux libres et possiblement par l'obstruction physique des capillaires aggravant l'ischémie (3). Afin de réduire les lésions d'ischémie-reperfusion causées par tout ce processus inflammatoire, il existe plusieurs stratégies présentement à l'étude telles que l'augmentation du NO endogène, l'utilisation d'antioxydants et des inhibiteurs de l'interaction des neutrophiles avec les cellules endothéliales (3).

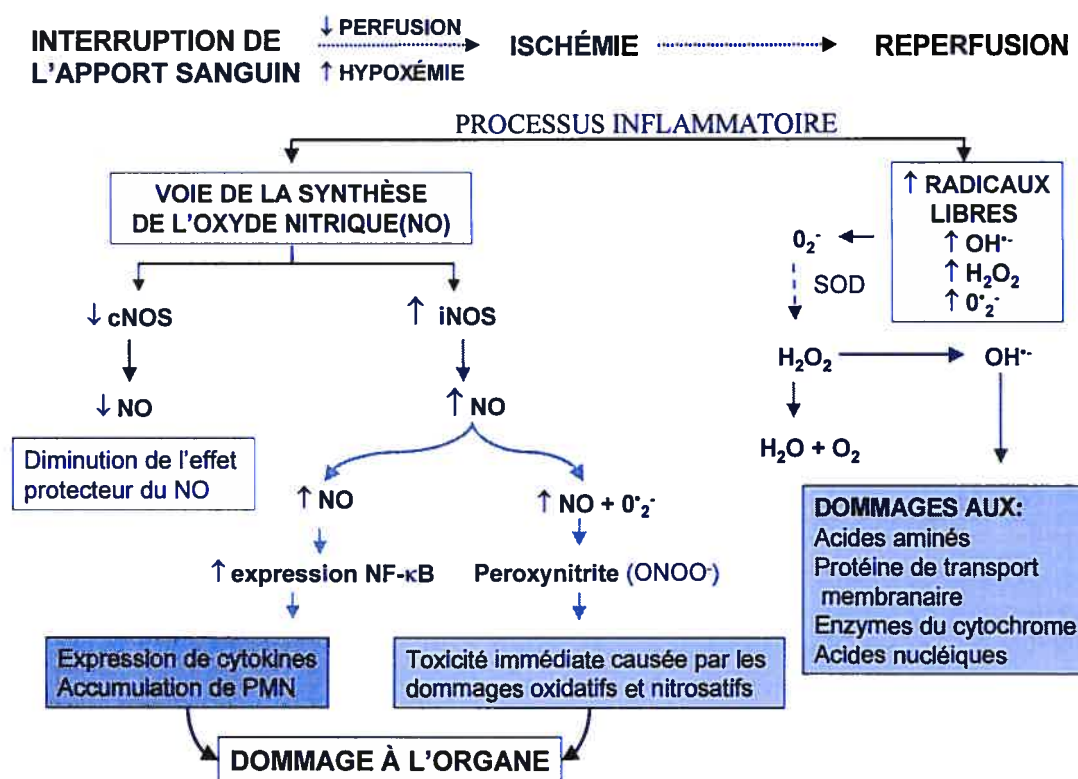


Figure 6 : Schéma du processus inflammatoire impliqué dans les lésions d'ischémie-reperfusion

1.3.3 Lésions d'ischémie-préservation-reperfusion

1.3.3.1 Introduction

Depuis quelques années, de nombreuses études montrent que la préservation de l'organe et les lésions de reperfusion pourraient causer des complications post-transplantation. Ces complications incluent les dysfonctions initiales du greffon. La reperfusion entraîne des dommages tissulaires par le même processus inflammatoire décrit ci-haut. En ce qui a trait à la préservation à froid, elle causerait des dommages dont le mécanisme est inconnu (3).

Afin de préserver l'organe, il existe différents types de solutions de préservation tels que la solution Euro-Collins, Celsior, la solution de l'Université du Wisconsin (UW) et la solution dextran faible en potassium (LPD) (44; 99; 114). Le but de l'utilisation de ces solutions est de minimiser les lésions ischémiques à froid en : 1) minimisant l'augmentation du volume cellulaire causée par l'hypothermie, 2) prévenant l'acidose intracellulaire, 3) prévenant la formation d'œdème interstitiel, 4) prévenant les lésions dues aux radicaux libres et en 5) fournissant des substrats pour régénérer les composés phosphates hautement énergétiques durant la reperfusion (7).

1.3.3.2 Changement de volume cellulaire

Un des rôles des solutions de préservation est de minimiser les changements de volume cellulaire, comme énuméré ci-haut. En effet, l'hypothermie supprime l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase et diminue la différence de potentiel

membranaire. Conséquemment, les ions Na^+ et Cl^- entrent dans la cellule selon leur gradient de concentration. Ceci entraîne une accumulation d'eau et par le fait même le gonflement de la cellule (7). Afin de réduire les changements de volume cellulaire, les solutions de préservation, comme décrit au **tableau I** (99), doivent être hypertoniques ou contenir des substrats imperméants efficace pour la cellule comme le lactobionate, le mannitol ou le raffinose (7). Toutefois, la préservation des organes avec les différentes solutions de préservation cause tout de même des dommages tissulaires. Par ailleurs, la durée de préservation demeure limitée particulièrement au niveau de la transplantation pulmonaire et cardiaque (53; 109). Afin de préserver les organes pour une plus longue période sans causer de lésions, de meilleures méthodes et solutions de préservation sont nécessaires (3). Pour ce faire, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes induits lors de lésions ischémiques. Premièrement, il a été démontré que le contenu cellulaire en ATP (adénosine triphosphate) est diminué de 45 et 50% respectivement lors de lésions d'ischémie-reperfusion de l'intestin chez le rat et de lésions ischémiques du myocarde chez le chien (36; 95). Par ailleurs, une étude effectuée au niveau des cellules du tubule proximal démontre la présence au niveau de la membrane basolatérale d'un canal cationique non-sélectif « *stretch-activated* » activé par le choc hypotonique et inhibé par l'ATP intracellulaire (49). Ce canal pourrait donc être impliqué dans la régulation du volume cellulaire et être important lorsque le contenu cellulaire en ATP est diminué (49). D'autre part, des travaux effectués sur des cellules gliales suggèrent qu'une diminution du contenu cellulaire en ATP

serait l'initiateur d'une séquence d'événement menant à l'augmentation du volume cellulaire (57).

Tableau I : Composition de différentes solutions de préservation

Composant	Celsior	UW	Euro-Collins
Potassium (mmol/L)	15	125	107
Sodium (mmol/L)	100	30	9,3
Magnésium (mmol/L)	13	5	4,7
Chlore (mmol/L)	41,5	0	14
Calcium (mmol/L)	0,26	0	0
Bicarbonate (mmol/L)	0	0	9,3
Histidine (mmol/L)	30	0	0
Phosphate (mmol/L)	0	25	55
Sulfate (mmol/L)	0	5	4,7
Lactobionate (mmol/L)	80	100	0
Mannitol (mmol/L)	60	0	31,7
Raffinose (mmol/L)	0	30	0
Hydroxyethylamidon (g/L)	0	0,5	0
Gluthation (mmol/L)	3	3	0
Allopurinol (mmol/L)	0	1	0
Glucose (g/L)	0	0	0,56
Glutamate (mmol/L)	20	0	0
Adénosine (mmol/L)	0	5	0
Insuline (Unités/L)	0	40	0
Dexaméthasone (mg/L)	0	8	0
Osmolarité (mOsm/L)	360	320	452

Les changements de volume cellulaire peuvent être causés, entre autre, par les chocs osmotiques qui entraînent une sortie ou une entrée d'eau de ou dans la cellule. Une augmentation de l'osmolarité causée par le choc hypertonique entraîne une diminution du volume de la cellule, tandis qu'une diminution de l'osmolarité causée par un choc hypotonique entraîne une augmentation du volume cellulaire

(72). Les changements de volume cellulaire ont des conséquences sur le transport ionique.

En effet, des études démontrent que le choc hypotonique entraîne une augmentation de l'absorption de Na^+ au niveau des cellules rénales A6. Il est important de souligner que les cellules A6 sont une lignée cellulaire provenant de cellules rénales de *Xenopus laevis* dont les propriétés de transport sodique sont apparentées aux cellules rénales du tubule distal de mammifères. Elles constituent un modèle populaire pour l'étude des mécanismes de régulation du transport de Na^+ . D'autre part, ces cellules forment un épithélium ayant des caractéristiques communes avec l'épithélium alvéolaire. En effet, on dénote la présence de jonctions serrées, l'expression à la membrane du canal ENaC et le transport de Na^+ s'effectue sous une régulation hormonale. L'impact des chocs osmotiques sur le courant amiloride-sensible a été démontré en premier lieu par Wills et coll. en 1991 (130). L'étude démontre qu'une diminution bilatérale de l'osmolarité de 200 à 170 mOsm/kg (soit un choc hypotonique de 15%) cause une augmentation du courant de court-circuit (I_{sc}) total de plus du double. Le courant de court-circuit (I_{sc}) est obtenu lorsque la différence de potentiel est ajustée à zéro en présence de solutions identiques de part et d'autre de la monocouche cellulaire ce qui permet d'éliminer le transport paracellulaire et de mesurer seulement le transport transcellulaire. Ces expériences ont été effectuées dans une chambre de Ussing. Par ailleurs, l'étude démontre que l'augmentation du I_{sc} est plutôt lente les 5 à 10 premières minutes, puis plus rapide jusqu'à l'obtention d'un plateau 20 à 30 minutes suite au choc

hypotonique. Le délai d'activation étant plutôt long, ils suggèrent que le mécanisme impliqué dans cette augmentation soit lié à une cascade d'événement ou à un processus lent, plutôt qu'à un effet mécanique. Ces effets pourraient être reliés à l'activation de messagers intracellulaires et/ou liés au cytosquelette. Par ailleurs, cette augmentation de I_{sc} est due à une augmentation du courant amiloride-sensible, car l'utilisation apicale d'amiloride 50 μ M l'abolit complètement. De façon plus précise, Wills et coll. démontrent que cette augmentation est liée à une augmentation du nombre de canaux Na^+ au niveau de la membrane apicale. Le mécanisme demeure inconnu. Toutefois ils émettent plusieurs hypothèses quant au mécanisme qui pourrait être impliqué, soit l'activation, la modulation ou l'insertion de nouveaux canaux à la membrane (130). D'autre part, une seconde étude effectuée en 1997 par Niisato et coll. démontre qu'une diminution de l'osmolarité extracellulaire entraîne une augmentation du I_{sc} amiloride-sensible. Les auteurs rapportent que cette augmentation s'effectue via la stimulation de la translocation à la membrane apicale de canaux sodiques amiloride-sensible (81).

Pour ce qui est des seconds messagers activés lors d'un choc hypotonique, des travaux effectués au niveau des hépatocytes chez le rat démontrent que le choc hypotonique active le NF- κ B et entraîne la phosphorylation des MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) : p38, ERK 1 et 2 (*extracellular signal-regulated protein kinases*), et SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase*) (58). Toutefois, l'activation du NF- κ B par le choc hypotonique ne serait pas reliée à la phosphorylation des MAPKs (58). Par ailleurs, une autre étude effectuée sur

les cellules HTC (hépatome de rat) démontre que le choc hypotonique augmente la phosphorylation de la p38, mais a peu d'effet sur l'activité de ERK et JNK. D'autre part, l'inhibition de l'activité constitutive de la p38 en condition isotonique augmente la perméabilité de la membrane au Na^+ . Ceci résulte en une augmentation du volume cellulaire. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la MAPK p38 aurait un rôle important au niveau de la régulation du volume cellulaire et de la perméabilité membranaire au Na^+ et ce par un effet inhibiteur sur le canal NSCC (33).

En plus du transport de sodium, le transport des ions potassiques et chlorures est modifié lors de changements de volume cellulaire. En effet, afin de rétablir le volume initial de la cellule, cette dernière possède des mécanismes de régulation du volume appelés « *regulatory volume decrease* » (RVD) ou « *regulatory volume increase* » (RVI) qui interviennent respectivement lors de chocs hypotoniques et hypertoniques. Le RVD entraîne un efflux de KCl qui implique l'activation de canaux Cl^- sensibles au volume cellulaire, VSOAC (*volume-sensitive organic anion channels*) (79) et des canaux K^+ sensibles au Ca^{2+} , IK (86; 123). Par ailleurs, l'ATP favoriserait la régulation de la diminution du volume cellulaire suite au choc hypotonique (86). D'une part, des études ont démontré que les changements de volume cellulaire induisent la libération d'ATP, et ce au niveau de plusieurs types cellulaires (45; 79; 100; 124) dont récemment les cellules épithéliales humaines Calu-3 (41). Soulignons que les cellules Calu-3 sont une lignée cellulaire dérivée des glandes sous-muqueuses situées dans la zone conductrice de l'appareil

respiratoire. D'autre part, au niveau des cellules épithéliales intestinales humaines « *Intestine 407* », l'ATP libérée active des récepteurs purinergiques qui entraînent une mobilisation du Ca^{2+}_i , suivie de l'activation des canaux IK (86).

Par ailleurs, la régulation de la sécrétion de Cl^- par l'ATP, suite aux changements de volume cellulaire, a été observée dans plusieurs types cellulaires tels que : les cellules épithéliales biliaires humaines et de rat (100), les cellules HTC de rat (124) et les cellules épithéliales trachéales humaines (79). Toutefois, il a été démontré au niveau des cellules « *Intestine 407* » que la libération d'ATP induite par des chocs osmotiques ne causait pas l'activation de canaux Cl^- sensibles au volume cellulaire mais entraînait l'activation de Erk-1/2 (117). Par conséquent, l'ATP pourrait potentiellement jouer un rôle durant les changements de volume cellulaire au niveau des cellules épithéliales alvéolaires.

1.4 Adénosine Triphosphate

1.4.1 Introduction

L'ATP a été découverte en 1929 dans des extraits musculaires par Fiske et Subbarow aux Etats-Unis et par Lohman en Allemagne. Ce dernier établit la structure de la molécule en 1930. Suite à cela, Gillespie démontra en 1934 que l'ATP était plus puissant que l'AMP et l'adénosine pour causer les contractions de l'iléon et de l'utérus. Ces résultats fût la première indication que l'ATP et l'adénosine avaient des effets différents et par conséquent qu'il existait différent

récepteurs purinergiques. Puis en 1941, Fritz Lipmann émit l'hypothèse que l'hydrolyse de l'ATP en ADP, AMP et adénosine génèrent de l'énergie par la perte de phosphate. L'ATP était donc connue principalement pour sa valeur énergétique, mais aujourd'hui cette molécule a de nouvelles vertus. Cela a débuté dans les années 70 lorsque Burnstock et coll. démontrent l'existence pour la première fois des récepteurs purinergiques. Par la suite, Enomoto et coll. (1994) et Ferguson et coll. (1997) ont démontré que les cellules épithéliales étaient une source importante de purines qui pouvaient être libérées sous des conditions physiologiques et pathophysiologiques et agir via des récepteurs purinergiques. Depuis, plusieurs études ont été effectuées et démontrent que les purines ont divers effets dans plusieurs processus biologiques. Ceux-ci incluent la contraction du muscle lisse, la neurotransmission, la sécrétion endocrine et exocrine, la réponse immunitaire, l'inflammation, l'agrégation plaquettaire, la douleur et la modulation de la fonction cardiaque (1; 91). Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes de libération et d'action de l'ATP.

1.4.2 Libération de l'ATP

L'ATP est libérée de la cellule durant l'hypoxie, les stress mécaniques, les changements de volume cellulaire, lors de la perte de viabilité ou même simplement suite à un changement de milieu de culture (20; 106). Pour ce qui est des mécanismes par lesquels l'ATP serait libérée dans le milieu extracellulaire, il existe diverses possibilités soit : la lyse cellulaire, l'exocytose ou l'efflux par des protéines de transport membranaire (29). Toutefois ces mécanismes demeurent

jusqu'à ce jour controversés. Une fois libérée, l'ATP est rapidement métabolisée par une famille extracellulaire d'ectoATPases (66; 106). Elle agit de façon autocrine et paracrine via l'activation de récepteurs purinergiques. Par la suite, la dégradation de l'ATP en ADP et en adénosine entraîne la stimulation d'autres types de récepteurs.

1.4.3 Récepteurs Purinergiques

1.4.3.1 *Classification*

Dans les années 70, Burnstock et coll. définissaient les récepteurs purinergiques sous deux classes : P1 et P2. Premièrement, les récepteurs de classe P1, aussi nommés récepteurs à l'adénosine, se divisent en 3 sous-classes soit : A₁, A₂ (A_{2A} et A_{2B}) et A₃. Ces récepteurs à l'adénosine sont couplés avec différentes protéines G hétérotrimériques et effecteurs (91). Ils sont activés par l'adénosine et inhibés par les xanthines. Au niveau des cellules alvéolaires de type II, les récepteurs à l'adénosine de type A₁ et A₂ sont présents (38).

La seconde classe correspond aux récepteurs P2, récepteurs à l'ATP ou à l'ADP. Ceux-ci sont divisés en deux sous-classes selon qu'ils agissent via des « *ion gating proteins* », P2X, ou via une protéine G couplée à un second messenger, P2Y. Ce dernier groupe comprend plusieurs sous-classes soit les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ et P2Y₁₃. Les récepteurs P2 ont des affinités différentes pour les nucléotides. Par exemple, le récepteur P2Y₂ est sensible de façon équipotente à l'ATP et l'UTP. Pour ce qui est des antagonistes, il n'existe pas

d'inhibiteurs spécifiques pour le moment. Par conséquent, des antagonistes comme la suramine et le « *reactive blue 2* » sont utilisés pour inhiber à la fois les récepteurs P2X et P2Y. Au niveau des cellules ATII, deux types de récepteurs purinergiques P2 sont présents : P2Y₁ (97) et P2Y₂ (96).

1.4.3.2 Voie de signalisation intracellulaire

Les récepteurs P2Y interagissent avec différents types de protéines G qui activent habituellement la phospholipase C (PLC). Ceci résulte en l'augmentation de la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et la mobilisation du Ca²⁺_i. Ces derniers effets peuvent mener à l'activation subséquente d'une protéine kinase C (PKC), de la phospholipase A₂ (PLA₂), de l'ouverture de canaux K⁺ Ca²⁺-dépendant ou de la production de NO. En plus, la formation de diacylglycérol (DAG), suite à l'activation de la PLC, peut stimuler la PKC. Cette dernière peut activer la PLC spécifique au phosphatidylcholine, la phospholipase D (PLD), la voie des MAP kinases, et/ou l'influx de Ca²⁺ via un canal Ca²⁺ voltage-dépendant. Soulignons que les événements spécifiques de la cascade d'activation varient selon le type de récepteurs P2Y (42). Entre autre, au niveau des récepteurs P2Y₂, la mobilisation de Ca²⁺_i est suivie d'une augmentation de la probabilité d'ouverture d'un canal Cl⁻ sensible au Ca²⁺ (112). De plus, les récepteurs P2Y₂ sont partiellement sensibles à la toxine pertussique, soit d'environ 25-35%. Finalement, l'activation des récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ mènent à l'inhibition subséquente de l'adénylate cyclase via une protéine G_i (106).

1.4.4 Effet de l'application d'ATP extracellulaire

Même si l'ATP entraîne ses divers effets via l'activation des récepteurs purinergiques, cette réponse variera d'un type cellulaire à l'autre selon le type de récepteurs exprimés. Dans la section 1.3.3.2, nous avons décrit le rôle de l'ATP intracellulaire dans la régulation du volume cellulaire et les conséquences sur le transport des ions K^+ et Cl^- . L'application d'ATP extracellulaire a aussi des conséquences sur le transport ionique qui sont toutefois différentes. En effet, elle est reconnue pour causer une augmentation de la sécrétion de Cl^- (5; 108) et une diminution de l'absorption de Na^+ dans plusieurs types cellulaires (22; 132).

Au niveau de l'épithélium respiratoire, on a remarqué, à la fois *in vitro* et *in vivo*, les effets bénéfiques de cette molécule sur la clairance pulmonaire. En effet, l'ATP mais aussi l'UTP entraînent, *in vitro*, une augmentation de la sécrétion de Cl^- (113) et une inhibition de l'absorption de Na^+ à travers la membrane apicale des cellules épithéliales bronchiques (27) et nasales humaines (73), des cellules FDLE de rat (92), des cellules trachéales de porc (50) et de lapin (52). L'effet net observé est une augmentation du liquide alvéolaire de surface. De plus, les nucléotides augmentent d'autres activités des cellules épithéliales comme la sécrétion de mucines par les cellules goblets, la sécrétion des glandes sous-muqueuses (20), l'activité ciliaire (29) et la sécrétion de surfactant par les cellules ATII (97).

In vivo, les effets de l'ATP et de l'UTP ont été évalués par des mesures nasales de la différence transépithéliale de potentiel après utilisation locale chez des

volontaires sains et des patients atteints de la fibrose kystique. Après pré-traitement avec l'amiloride, l'ATP et l'UTP, à des concentrations maximales de l'ordre de 1 mM, entraînent une augmentation de la sécrétion de Cl^- (61). Cependant, l'utilisation thérapeutique de l'ATP est limitée par son métabolisme en ADP, AMP et adénosine. De plus, l'adénosine induit une bronchoconstriction qui n'est pas souhaitable dans le cas présent (23). Toutefois, en 1996, Knowles et coll. ont rapporté des résultats de l'administration d'UTP en aérosol qui démontrent que celui-ci entraîne une normalisation de la clairance mucociliaire des petites voies aériennes et est tout à fait sécuritaire à la fois seul ou combiné avec l'amiloride (8; 62; 128).

1.5 Hypothèse et objectifs

Suite à la transplantation pulmonaire, les lésions d'ischémie-reperfusion menant à l'œdème pulmonaire pourraient être liées à une dysfonction du transport des ions Na^+ . Par ailleurs, des changements de volume cellulaire sont responsables de lésions durant la préservation. Nous savons que le choc hypotonique induit une augmentation du volume cellulaire et une augmentation de l'absorption de Na^+ au niveau des cellules A6. Une telle augmentation au niveau des cellules alvéolaires épithéliales serait bénéfique lors de la transplantation. D'autre part, les changements de volume cellulaire causent une libération d'ATP. L'ATP est impliquée dans le mécanisme de régulation de la diminution du volume cellulaire appelé RVD. Toutefois, l'ATP extracellulaire cause une inhibition du courant sodique. Une diminution de la réabsorption de Na^+ lors de la transplantation serait

néfaste. Cependant, peu de choses sont connues sur l'effet de l'ATP induit lors des changements de volume cellulaire au niveau pulmonaire.

Par conséquent, le but de notre étude était de déterminer, au niveau des cellules ATII chez le rat adulte, l'impact des changements de volume cellulaire induits par le choc hypotonique sur le transport ionique, en particulier sur le transport de Na^+ , des cellules ATII et de déterminer l'implication de l'ATP dans ce processus. Pour ce faire, nous avons : 1) déterminé l'impact du choc hypotonique sur le courant de court-circuit (I_{sc}) total des cellules ATII en chambre de Ussing, 2) caractérisé la cinétique de libération d'ATP induite par le choc hypotonique par bioluminescence de la luciférine/luciférase, 3) déterminé l'impact de pré-traitements avec des inhibiteurs purinergiques sur le I_{sc} total lors du choc hypotonique, et 4) déterminé l'impact de l'ATP sur le I_{sc} total en chambre de Ussing.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Hypotonic shock increases Na^+ current in alveolar epithelial cells

Marie-Claude Tessier, Ryszard Grygorczyk et Yves Berthiaume

Soumis à *American Journal of Physiology*, 2003



Hypotonic shock increases Na^+ current in alveolar epithelial cells

Marie-Claude Tessier, Ryszard Grygorczyk and Yves Berthiaume

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal-Hôtel-Dieu,
Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Address for correspondence:

Dr. Yves Berthiaume

Centre de recherche, CHUM-Hôtel-Dieu

3850 St-Urbain

Montreal (Quebec)

Canada H2W 1T7

Tel: (514) 890-8000 ext 12928

Fax: (514) 412-7152

E-mail: [REDACTED]

Abstract

Lung injury caused by post-transplantation ischemia-reperfusion results in decreased alveolar liquid clearance. This effect could be related to stress-induced dysfunction of Na⁺ transport. Cell swelling is one of the mechanisms involved in the injury process during transplantation. Its impact on Na⁺ transport in alveolar epithelial cells is not well known. However, changes in cell volume, mechanical stress and hypoxia induced ATP release. Moreover, ATP have been shown to inhibit Na⁺ reabsorption in airway epithelial cells. The objectives of our study were to characterize the effect of hypotonic shock as an *in vitro* mechanical stress on ion transport and to determine the role of ATP release. Rat alveolar epithelial cell monolayers were mounted in an Ussing chamber to measure changes in short-circuit current (I_{sc}) in response to hypotonic shock (20%). Total I_{sc} was augmented by 2.5 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, with $\approx 70\%$ of this increase being amiloride-sensitive, suggesting heightened Na⁺ transport. Hypotonicity-induced ATP release was detected by luciferin/luciferase assay, and could have an autocrine/paracrine effect on sodium current. Under isotonic conditions, bilateral application of ATP (100 μM) actually decreased amiloride-sensitive I_{sc} by 1.57 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Moreover, pretreatment with suramin, a P2 receptor inhibitor, and apyrase, an ATP scavenger, had no effect on the I_{sc} increase induced by hypotonic shock. These observations suggest that the hypotonicity-evoked Na⁺ transport augmentation and is not directly related or modulated by ATP release.

Keywords: Hypotonic shock, Na⁺ channel, ATP, transepithelial current

Abbreviations: ATP:adenosine triphosphate; I_{sc} :short-circuit current; R_{te} :transepithelial resistance; RVD:regulatory volume decrease; V_{te} :transepithelial voltage

Introduction:

Lung transplantation is the final option for patients with respiratory failure due to pathophysiologies such as cystic fibrosis, pulmonary fibrosis, acute respiratory distress syndrome and pulmonary hypertension (6). Ischemia-reperfusion injury, an important aspect of organ transplantation, is a major determinant of early graft dysfunction (1). It has been shown recently that post-transplantation ischemia-reperfusion injury is associated with decreased edema clearance (28). Others have reported that the resulting pulmonary dysfunction is characterized by reduced alveolar liquid clearance that causes pulmonary edema and limits the recovery of these patients (32). Although ischemia-reperfusion-induced lung injury is accompanied by neutrophil activation, its severity is also determined by damage produced during the cold ischemia period (1). To minimize cell swelling, one of the consequences of cold ischemia exposure, the preservation solutions used are hypertonic or contain lactobionate (3).

Although the impact of cell swelling on Na⁺ transport in alveolar epithelial cells is not known, some studies have demonstrated that increased A6 renal cell volume induced by hypotonic shock augments Na⁺ absorption (18; 33). A6 cells have Na⁺ transport properties that are similar to those of renal distal tubule cells and are a popular model for the investigation of Na⁺ transport regulation (33). Cell swelling also induces adenosine triphosphate (ATP) release, and extracellular ATP inhibits Na⁺ reabsorption in different tissues (2; 7; 15; 27; 34) while stimulating Cl⁻ secretion in human bronchial epithelia (16).

Liquid clearance is driven by vectorial sodium transport from alveoli to the interstitium (17), Na⁺ entry occurs in part via amiloride-sensitive Na⁺ channels located at the apical surface of cells and is extruded by the sodium pump (Na⁺-K⁺-ATPase) (4; 17). Since cell swelling can either stimulate or inhibit Na⁺ transport, it would be interesting to know how cell swelling influence Na⁺ transport in cells involved in this transepithelial sodium transport.

The present study evaluated the outcome of cell volume changes induced by hypotonic shock on Na⁺ transport in alveolar epithelial cells. The role of ATP in modulating this response was also investigated. Our results show that hypotonic shock induces an increase in Na⁺ transport, but ATP release does not play a significant role in this response.

Materials and Methods:

1. Cell isolation

Alveolar epithelial cells were isolated from male Sprague-Dawley rats as described previously (8). Briefly, perfused lungs were digested with elastase for cells purification by a differential adherence technique on bacteriological plastic plates coated with rat IgG (8). The cells were maintained in MEM (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) containing 10% FBS (GIBCO BRL, Life Technologies), 0.08 mg/l gentamycin, 0.2 % NaHCO₃, 0.01 M HEPES, and 2 mM L-glutamine. They were then plated at 1X10⁶ cells/cm² on polycarbonate membrane inserts (Transwell, Costar, Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) and cultured at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator. The medium was replaced on day 3, and the cells were used on day 4.

2. Luciferin/luciferase assay

Extracellular ATP concentration was measured by luciferase bioluminescence in a TD 20 luminometer (Turner designs, Sunnyvale, Ca). During the assay, 50 µl of luciferin/luciferase reagent 1 mg/ml (catalogue#F-3641, Sigma, St-Louis, MO) were mixed with a 50 µl aliquot of extracellular medium containing ATP. The luminescence signal was integrated for 10 seconds and then expressed in relative light units. ATP, expressed in moles/1X10⁶ cells, was determined from a standard curve obtained before the experiment with a known ATP concentration.

3. Electrophysiology

Short-circuit current (I_{sc}) was measured at 37°C in cell monolayers grown on polycarbonate membrane inserts (24 mm diameter, catalogue#3412, Costar) placed horizontally in a modified Ussing chamber. During the experiment, the cells were perfused with a physiological solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM TES, pH 7.4 at 315 mOsm/kg). The volumes of the apical and basolateral compartments were 2 and 6 ml respectively. The voltage and current electrode pairs, calomel and Ag/AgCl electrodes respectively, were in contact with the apical and basolateral bathing solutions. The Ag/AgCl electrodes were connected via 2 M KCl–5% agarose bridges. The voltage-clamp amplifier (EC-825, Warner Instrument Corporation, Hamden, CT, USA) was used to clamp transepithelial voltage (V_{te}) to zero, and the resulting I_{sc} was recorded continuously on a hard disk by Biopack software. Transepithelial resistance (R_{te}) was determined by Ohm's law by applying a 1-mV square pulse for 1 second every 10 seconds.

4. Protocol

Effect of hypotonicity, ATP and adenosine on Na⁺ transport

Alveolar epithelial cell monolayers were mounted in the Ussing chamber, and when baseline I_{sc} was stable for at least 10 minutes, amiloride-sensitive I_{sc} was ascertained by adding 1 μM amiloride on the apical monolayer side for 5 minutes. I_{sc} was then returned to baseline by washout. After 15 minutes, the cell monolayers were exposed to 100 μM ATP, 100 μM adenosine or 20% hypotonic shock by adding an

appropriate volume of water to the apical and basolateral compartments. At the peak response (5 minutes) 1 μ M amiloride was added to determine the amiloride-sensitive I_{sc} .

ATP efflux assay

On the day of the experiment, the cell culture medium was replaced by a physiological solution because FBS contained in the culture medium modifies the luciferin/luciferase reaction. However, the change of medium induces mechanical stress and then ATP release. Therefore, after the medium change, the cells were incubated for 4 hours at 37°C to allow ATP degradation by ecto-ATPases. Once the ATP level returned to baseline, the 12-well plate with cells grown on filter inserts (12 mm diameter, catalogue#3401, Costar) was placed on an agitating platform at 37°C. This gentle agitation mixed the medium covering the cells and minimized the effect of the unstirred layer. Basal ATP was determined by taking two samples at time 0, followed by the addition of water or physiological solution corresponding respectively to 20% hypotonic shock or control condition. Samples were collected at 1, 5, 15 and 60 minutes after application of isotonic or hypotonic media, and ATP accumulation in the supernatant was measured by luciferin/luciferase assay.

5. Statistics

The data are presented as means \pm SEM. Groups comparisons were analyzed by paired t-test using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and Statsview software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). A probability (p) of < 0.05 was considered to be significant.

Results

Effect of hypotonicity on Na⁺ transport

To investigate the effect of hypotonic shock on Na⁺ absorption, alveolar epithelial cells were studied in an Ussing chamber. Cells grown on a 4-cm² filter had a baseline I_{sc} of $5.95 \pm 0.26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ which was inhibited reversibly by 1 μM amiloride (Fig. 1A, Table 1). After amiloride washout, the cell monolayers exposed to 20% hypotonic shock showed an I_{sc} increase of $2.45 \pm 0.26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Figs. 1A and 1B), which was suppressed by both 1 μM and 100 μM amiloride.

To further establish the contribution of Na⁺ transport to the change in I_{sc} induced by 20% hypotonic shock, we determined if pretreatment with amiloride would prevent the increase in Na⁺ transport. Hypotonic shock augmented I_{sc} in untreated cells by $2.6 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ whereas in cells treated with 1 μM or 100 μM amiloride, I_{sc} rose only by 0.99 ± 0.16 and $0.72 \pm 0.13 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectively (Fig. 2). These results demonstrate that the change in I_{sc} evoked by hypotonic shock is mainly secondary to Na⁺ transport.

Hypotonic shock-induced ATP release

We wanted to determine if the augmentation in Na⁺ transport induced by hypotonicity was related to an autocrine or paracrine effect of ATP. Hypotonic shock elicited rapid but significant ATP accumulation on the apical surface of the monolayers (1.77×10^{-13} moles/ 10^6 cells) followed by a rapid decrease within 5 minutes and a stable period thereafter (Fig. 3). However, ATP accumulation was not detected on the basolateral side (data not shown).

Since ATP is released by hypotonic shock, we investigated if it could modulate Na⁺ transport. Application of 100 μM ATP on both the apical and basolateral sides reduced total I_{sc} by $1.57 \pm 0.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Moreover, ATP application on the apical side of the monolayers actually decreased total I_{sc} by $1.56 \pm 0.38 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ similarly to bilateral application. However, ATP application on the basolateral side had no effect. These results demonstrate that ATP modulated total I_{sc} via the apical membrane. Moreover, application of 1 μM amiloride in the presence of bilateral and apical ATP reduced total I_{sc} by 3.36 ± 0.31 and $3.79 \pm 0.19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, respectively. Amiloride-sensitive I_{sc} in the presence of basolateral ATP was similar to that in untreated cells: $4.32 \pm 0.36 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Figs. 4A and 4B). These results show that the reduction in total I_{sc} by ATP is due, in part, to a decline in 1 μM amiloride-sensitive current. Moreover, pretreatment of the monolayers with 1 μM amiloride decreased the reduction in I_{sc} induced by 100 μM ATP by $0.77 \pm 0.33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, and it was completely inhibited by pretreatment with 100 μM amiloride (Fig. 5).

Effect of purinergic inhibitors on change in I_{sc} induced by hypotonic shock

Hypotonicity and exogenous ATP have opposite effects on I_{sc} . To ensure that the autocrine/paracrine actions of ATP do not contribute to changes in I_{sc} induced by hypotonic shock, the influence of purinergic inhibitors was examined. Cell monolayers were pretreated for 2 minutes with 200 μM of suramin, a nonspecific P2 purinergic receptor inhibitor, or 10 U/ml apyrase, an ATP scavenger, and I_{sc} was measured 5 minutes after the application of 20% hypotonic shock in the absence or presence of these

inhibitors. In absence of inhibitor, hypotonic shock increased total I_{sc} by $2.45 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, while in the presence of 10 U/ml bilateral apyrase, total I_{sc} rose by $1.75 \pm 0.41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. In contrast, the hypotonic-induced rise in I_{sc} after bilateral pretreatment with 200 μM suramin was limited to $0.78 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. These results show that suramin partially blocked the impact of hypotonicity on changes in I_{sc} . However, pretreatment with 200 μM suramin only on the apical side of the monolayers did not affect the change in I_{sc} induced by hypotonic shock because an increase in total I_{sc} of $2.31 \pm 0.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ was observed (Fig. 6). Our data demonstrate that apical application of purinergic inhibitors did not block the elevation of amiloride-sensitive I_{sc} induced by hypotonicity, suggesting that the rise in total I_{sc} evoked by hypotonic shock is not directly related to apical ATP release.

Effect of adenosine on Na⁺ transport

Because not only ATP but degradation product of ATP could be responsible for the effect of hypotonic shock on Na⁺ transport and alveolar epithelial cells have adenosine receptor (33), we determine the impact of 100 μM adenosine on I_{sc} . Preliminary data demonstrated that bilateral application of 100 μM adenosine reduced non significantly total I_{sc} by $0.77 \pm 0.17 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, and this decrease seemed to be due to inhibition of 1 μM amiloride-sensitive current similarly to the result obtained with ATP (Fig. 7).

Discussion

In this study, we observed that hypotonic shock increases Na⁺ transport and induces ATP release in alveolar epithelial cells. However, the application of exogenous ATP inhibited Na⁺ transport. Moreover, suramin and apyrase applied on apical side where ATP modulates I_{sc} did not affect the increase of Na⁺ current evoked by hypotonic shock. These results suggest that the hypotonicity-induced rise in Na⁺ transport is not directly influenced by ATP release.

Although it has been known for a few years that hypoosmotic stress can augment Na⁺ transport in kidney epithelial cells (33), we have demonstrated for the first time that hypotonic challenge of alveolar epithelial cells can lead to an increment of Na⁺ transport. To establish this impact, we exposed the cells to a challenge that had minor impact on monolayer characteristics (see Table 1). We chose to use 20% hypotonicity because when the cells are subjected to a greater level of hypotonic stress we see a significant decrease in R_{te} (data not shown). After 20% hypotonic shock, however, R_{te} declined non-significantly with a 49% increase in I_{sc} (Fig. 1). To demonstrate that this elevation of I_{sc} was due to heightened Na⁺ transport, we applied amiloride to the monolayers after hypotonic shock. Amiloride 1 μ M inhibited more than 65% of I_{sc} after hypotonic shock, indicating that Na⁺ transport was predominant in these conditions. To further demonstrate that Na⁺ transport was enhanced by hypotonic treatment, we pretreated the cells with amiloride and found that the increase in I_{sc} was mainly due to augmented Na⁺ transport, since more than 70% of I_{sc} increment could be prevented by amiloride (Fig. 2). However, this suggests that at least 30% of the elevation in active ion transport was

related to another transport mechanism. Hypotonic shock should also lead, quite rapidly after the initial increase in cell volume, to a decline in cell volume secondary to the regulatory volume decrease (RVD) reaction. We can thus hypothesize that the residual active ion transport mechanism is probably related to K⁺ or Cl⁻ transport. Further experiments with inhibitors of K⁺ or Cl⁻ transport will be necessary to prove this.

The rise in Na⁺ transport observed in alveolar epithelial cells was similar to the increase (50%) seen in A6 cells exposed to 15% hypotonic shock (33). However, the increments in Na⁺ transport in the two systems occur at very different rates. While a maximal I_{sc} increase was achieved within 5 minutes after the beginning of hypotonic shock in the present study, the maximum response in A6 cells was not reached before 20 to 30 minutes. Although it is possible that the difference in the time to the maximal response is due to the fact that we are studying two different type of cell and cell systems, one being a kidney cell line and the other a primary culture of lung alveolar cell, this might not be the only explanation. It is possible that this difference in kinetic is also due to the difference in the methods used to induce the hypotonic shock. Whereas we induce the change rapidly by diluting the apical and basolateral solution in other experiments the changes is induced more progressively since they are using perfusion system. Another possible explanation for this difference could be that the mechanisms responsible for this induction in Na⁺ transport is different or modulated differently between the two type of cells. The elevation in Na⁺ transport is possibly related to translocation of the epithelial sodium channel to the plasma membrane, increasing the number of channels in the apical membrane (18). Recently, it was shown that activation of Ca²⁺/calmodulin-dependant

protein kinase II (CAMKII) and myosin light chain kinase (MLCK) by a tyrosine kinase might be important for this response (19; 30). One of the key events potentially associated with the response could be related to the changes in intracellular calcium induced in cells by hypotonic shock (12; 20; 26; 31). Hence, potential differences in intracellular Ca²⁺ homeostasis in the cells could underlie the different kinetics of activation. Further studies are required to explore this question.

ATP release induced by mechanical stress such as hypotonic shock has been reported in many cell types, including airway epithelia (10; 29). Moreover, ATP is known to facilitate the RVD mechanism (21) and to suppress Na⁺ absorption (7; 14-16; 23; 34). Consequently, we decided to determine if the increase in Na⁺ transport induced by hypotonic shock was modulated by an autocrine/paracrine effect of ATP. We first demonstrated that 20% hypotonic shock induced significant ATP release on the apical side of the monolayers 1 minute after stimulation (Fig. 3). We observed no ATP release on the basolateral side of the monolayers of alveolar epithelial cells. The kinetics and amount of ATP release that we recorded were similar to what has been reported in other experimental protocols (5; 10; 13; 29). When exogenous ATP was applied on alveolar epithelial cells, we noted a 24% decrease in total I_{sc} (Fig. 4). When ATP was applied to the cells in the presence of 100 μ M amiloride, we observed no reduction of I_{sc} , indicating that ATP mainly inhibits Na⁺ transport (Fig. 5). This result was similar to that of other experiments demonstrating that ATP decreases Na⁺ absorption in the upper respiratory tract (14-16; 23).

To be sure that ATP release is not implicated in Na⁺ transport increased by hypotonic shock, the impact of purinergic inhibitors such as apyrase and suramin on changes in I_{sc} induced by hypotonic shock was tested. Extracellular ATP could have an autocrine/paracrine effect by activating purinergic receptors. To date, four purinergic receptors have been identified in rat alveolar epithelial cells: A1, A2 (9), P2Y1 (25) and P2Y2 (24). Binding of ATP to P2Y receptors activates various signalling pathways, such as inhibition of adenylate cyclase and activation of phospholipase C, that respectively cause decreases in cAMP and increase the production of diacyl glycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) with ensuring Ca²⁺ mobilization (11; 22). The results show that the increment in I_{sc} following hypotonic shock in the presence of apical purinergic inhibitors is similar to that in untreated cells (Fig. 6). These data indicate that the increase in Na⁺ transport induced by hypotonic shock is not related to an autocrine/paracrine effect of ATP via purinergic receptor activation. However, basolateral suramin blocked the increase in total I_{sc} induced by hypotonic shock. Since suramin has been reported to have many other actions, such as inhibition of ecto-ATPase, binding of growth factors and guanosine triphosphatase activity of certain G proteins (22), and since it has been shown that purinergic receptors are located on the apical surface of the cells, these results suggest that its effect might not be related to its inhibition of purinergic receptors. Therefore, other experiments permitting us to study the mechanism of suramin action will be necessary.

We further explored the potential role of ATP with apyrase, in order to rapidly degrade ATP, and also with adenosine, one of the degradation products which could

modulate the cell response by interacting with adenosine receptors (9). Apyrase did not prevent the increase in I_{sc} observed after hypotonic shock, further demonstrating the lack of a role for ATP in this response. Also, adenosine did not significantly modulate I_{sc} in alveolar epithelial cells (Fig. 7). Hence, it is unlikely that the degradation product of ATP is involved in this response.

In summary, cell swelling induced by hypotonic shock increased Na⁺ transport and ATP release in alveolar epithelial cells. However, this increase in Na⁺ transport was not related to purinergic receptor activation by released ATP. The potential role of this regulatory mechanism of Na⁺ transport in the alveolar epithelium in the normal and diseased lung will need to be explored in future studies.

Acknowledgements

Dr. Yves Berthiaume is a “chercheur national” from Fonds de la recherche en santé du Québec. This work was supported by the Canadian Cystic Fibrosis Foundation (Yves Berthiaume and Ryszard Grygorczyk) and the Canadian Institute of Health Research. The authors acknowledge the editorial assistance of Ovid Da Silva, Editor, Research Support office, CHUM Research Centre.

Figure legends

Table 1. Electrophysiological characteristics of alveolar epithelial cell monolayers. Short-circuit current (I_{sc}), transepithelial voltage (V_{te}) and transepithelial resistance (R_{te}) are shown under isotonic (n=27) and hypotonic conditions (n=17). Application of 1 μ M amiloride significantly reduced total I_{sc} by 61% as expected with Na⁺ transport blockade (n=27). Hypotonic shock (20%) significantly increased I_{sc} compared to control conditions and reduced R_{te} slightly but not significantly (n=17). *p<0.05

Figure 1. A) I_{sc} tracing showing the effect of amiloride and hypotonic shock. B) Effect of hypotonic shock on I_{sc} . 20% hypotonic shock applied on both sides of the monolayers increased total I_{sc} by $2.45 \pm 0.26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=13). This increase was mainly related to enhanced 1 μ M amiloride-sensitive current ($2.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). *p<0.05

Figure 2. Effect of amiloride pretreatment on hypotonic shock-induced ΔI_{sc} . Hypotonic shock induced $\Delta I_{sc} = 2.6 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=8). Pretreatment with 1 μ M or 100 μ M amiloride for 15 minutes respectively blocked $1.61 \pm 0.46 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=6) and $1.88 \pm 0.43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=9) of this increase. *p<0.05

Figure 3. ATP accumulation on the apical side of alveolar epithelial cell monolayers after 20% hypotonic shock (π , n=23) and isotonic solution (\square , n=14). At time 0, water or isotonic solution was added on both sides of the filters. Samples of the apical medium were taken at different time points and ATP content was measured by luciferin/luciferase assay. No ATP was detected on the basolateral side (results not shown).

Figure 4. A) I_{sc} tracing showing the effect of amiloride and ATP. B) Effect of ATP on I_{sc} . Application of ATP on both sides of the monolayers (n=6) or only on the apical side (n=5) decreased total I_{sc} by $1.57 \pm 0.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Application of ATP on the basolateral side (n=6) had no effect on total I_{sc} . C) Effect of ATP on amiloride-sensitive current. The decrease of I_{sc} by bilateral ATP was mainly related to a $0.96 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ reduction in $1 \mu\text{M}$ amiloride-sensitive current. *p<0.05

Figure 5. Effect of amiloride pretreatment on ATP-induced changes in I_{sc} . Application of $100 \mu\text{M}$ ATP decreased total I_{sc} by $1.26 \pm 0.26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=6). Pretreatment with $1 \mu\text{M}$ amiloride (n=6) or $100 \mu\text{M}$ amiloride (n=6) for 15 minutes respectively blocked this reduction by $0.77 \pm 0.33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ and completely abolished it. *p<0.05

Figure 6. Effect of purinergic inhibitors on changes in I_{sc} induced by hypotonic shock. 20% hypotonic shock increased total I_{sc} by $2.75 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=13). Pretreatment with the ATP scavenger apyrase 10 U/ml did not modify the increase in total I_{sc} induced by hypotonic shock (n=6). However, pretreatment with the P2 receptor antagonist suramin $200 \mu\text{M}$ on both sides of the monolayers inhibited the increase of total I_{sc} induced by hypotonic shock (n=7). Suramin applied only on the apical side had no effect (n=5). *p<0.05

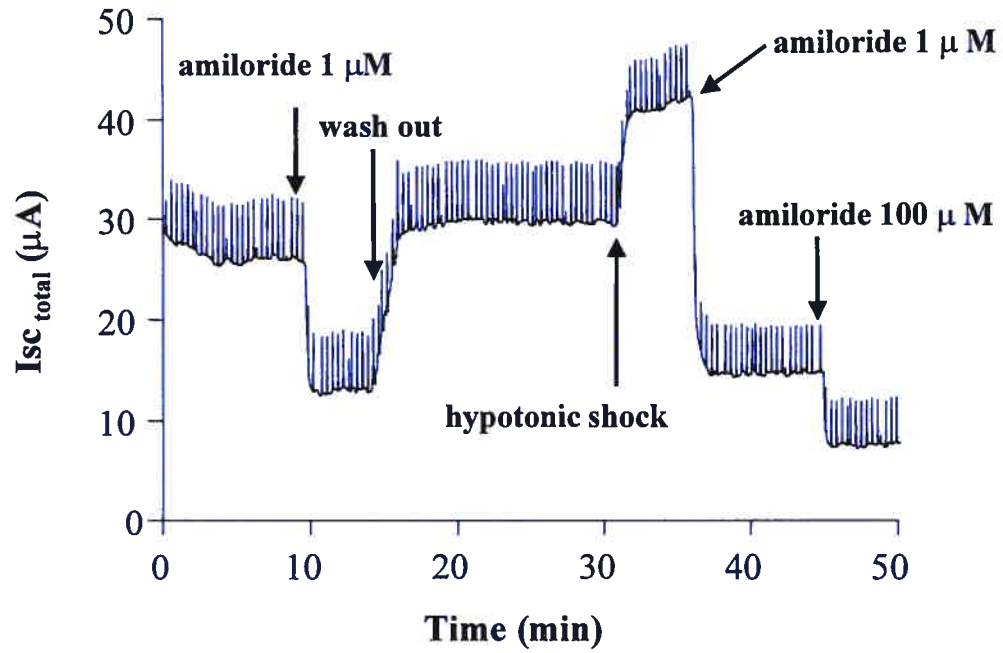
Figure 7. Effect of adenosine on I_{sc} . Application of 100 μ M adenosine on both sides of the monolayers decreased total I_{sc} by 0.77 μ A/cm² (n=4) due to inhibition of amiloride-sensitive current.

TABLE 1

	Isotonic solution		Hypotonic shock	
	Control	Amiloride 1μM	20%	Amiloride 1μM
I_{sc} (μA/cm ²)	5.95±0.26	2.32±0.11*	8.17±0.53*	2.87±0.33*
V_{te} (mV)	7.13±0.63	2.71±0.27 *	7.81±0.71	3.30±0.43 *
R_{te} (ohms)	1 296.68±138.72	1 251.07±131.88	1 009.58±105.59	1 201.70±136.76

FIGURE 1

A)



B)

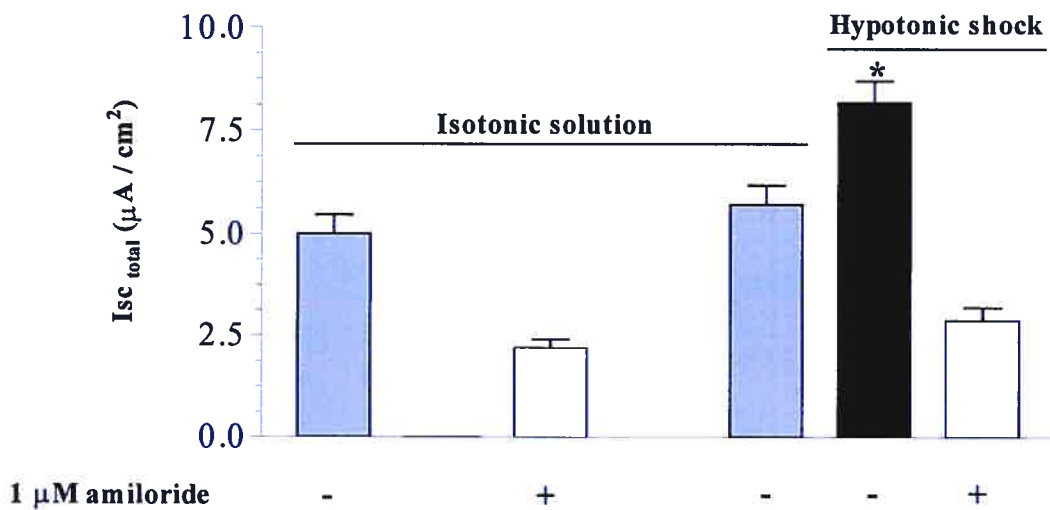


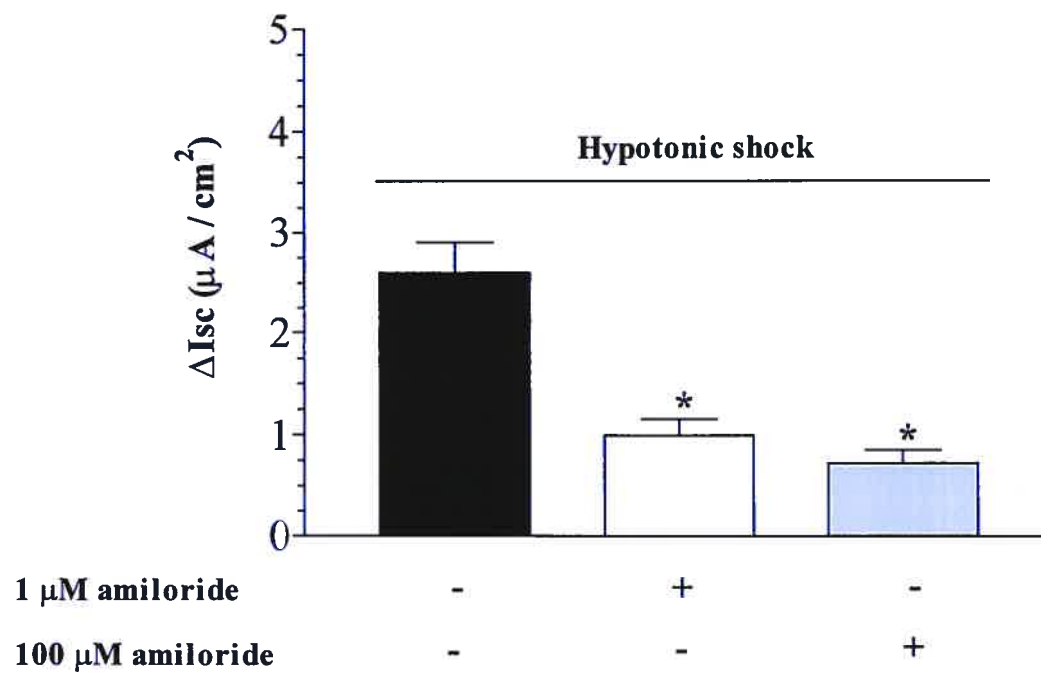
FIGURE 2

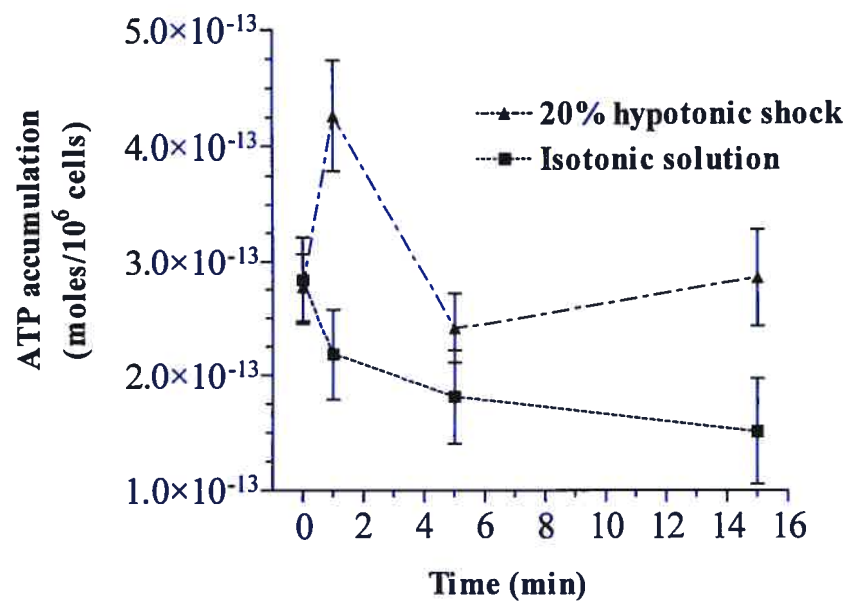
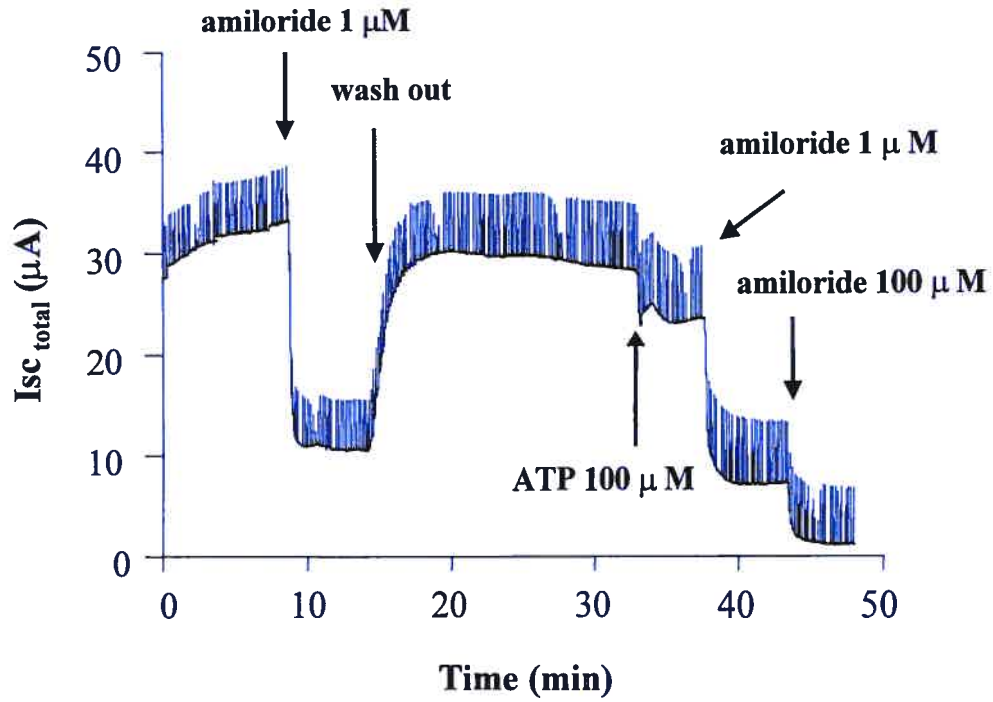
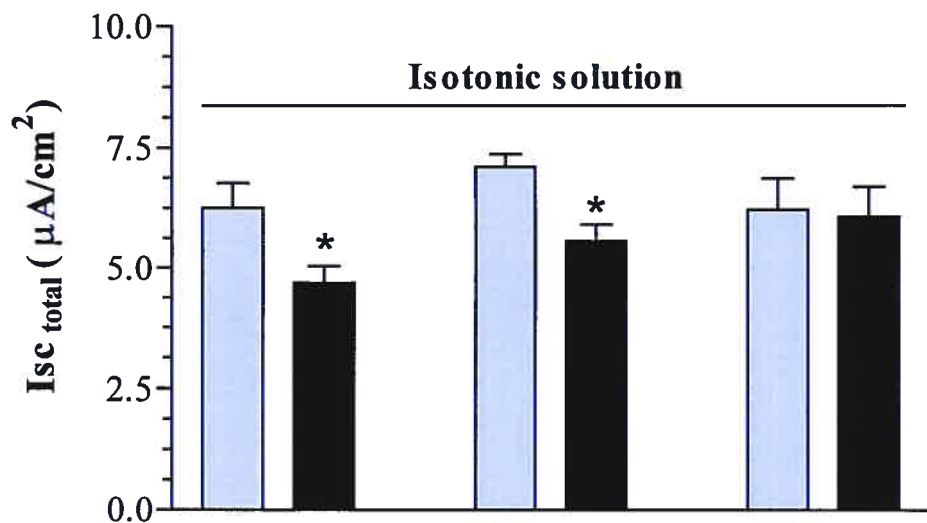
FIGURE 3

FIGURE 4

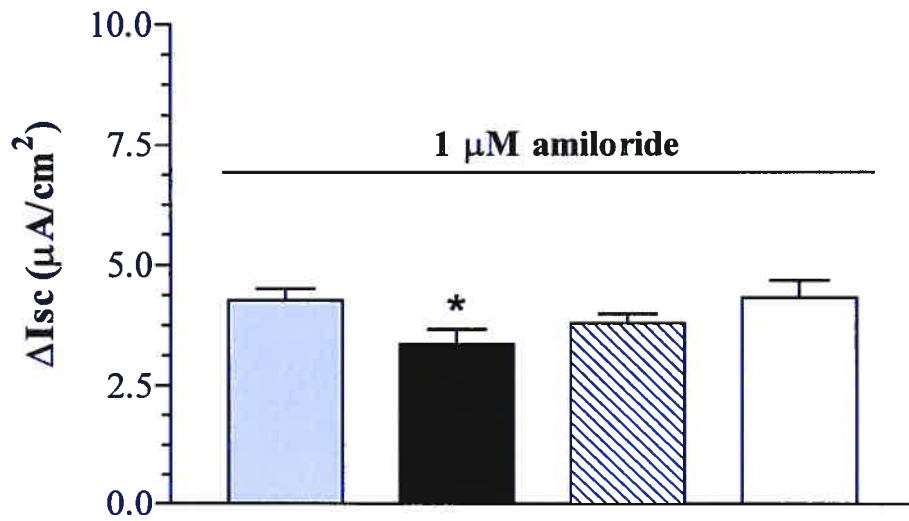
A)



B)



Control	+	-	+	-	+	-
100 μ M ATP (ap.)	-	+	-	+	-	-
100 μ M ATP (bas.)	-	+	-	-	-	+

FIGURE 4**C)****Control**

+

-

-

-

100 μM ATP (ap.)

-

+

+

-

100 μM ATP (bas.)

-

+

-

+

FIGURE 5

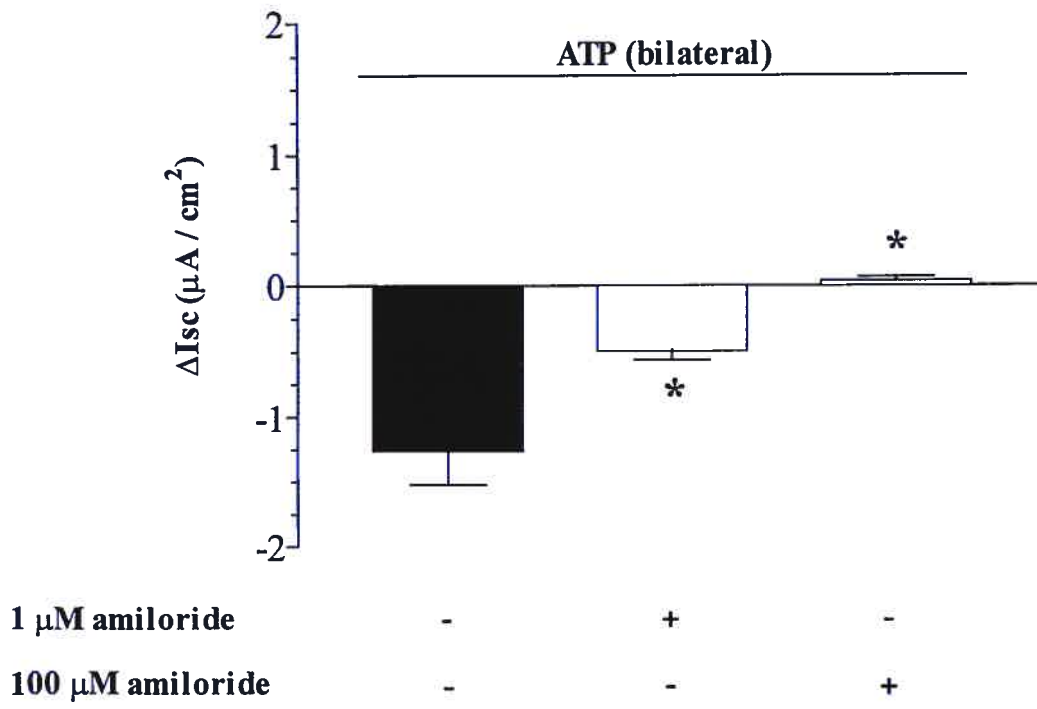
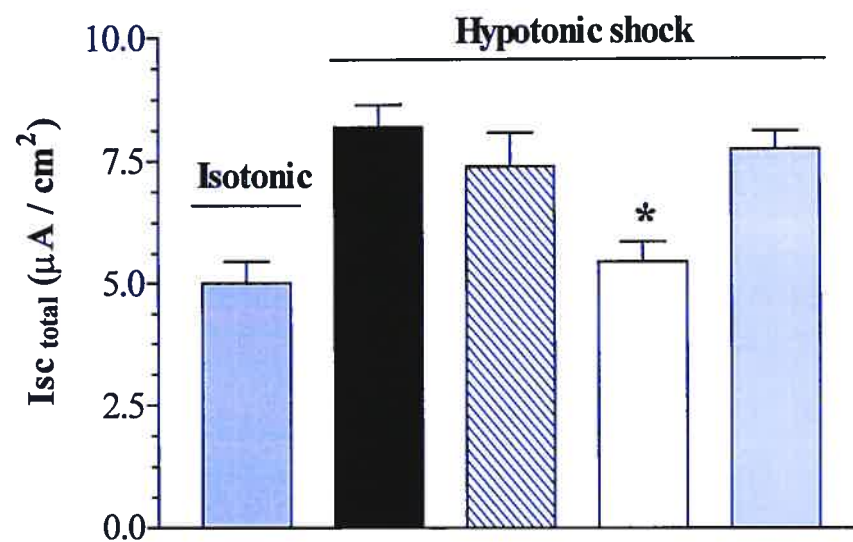
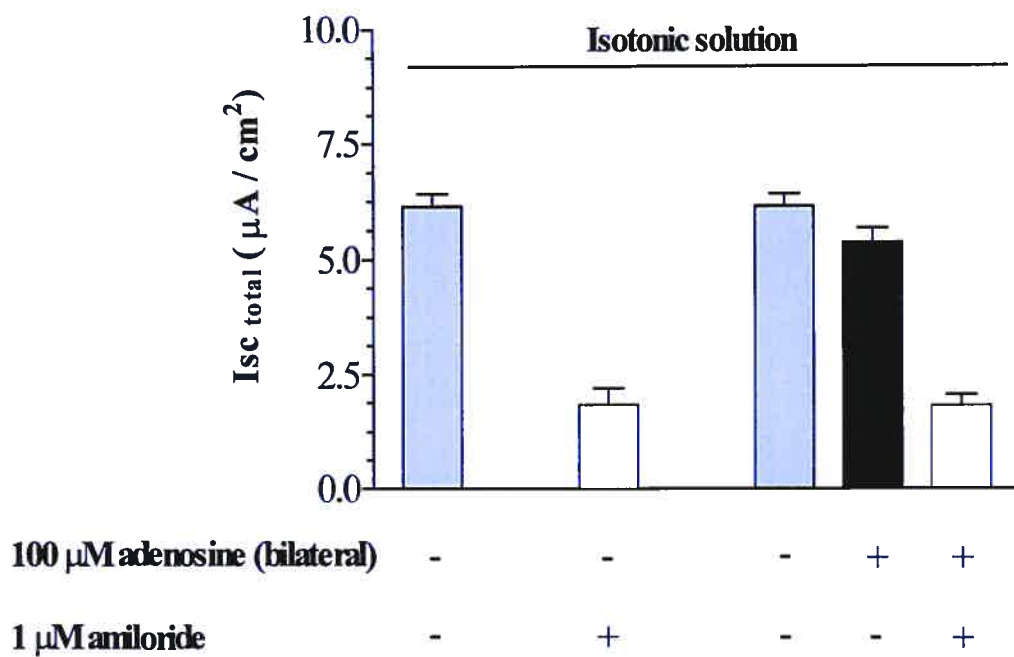


FIGURE 6

10 U/ml apyrase (bilateral)	-	-	+	-	-
200 μM suramin (ap.)	-	-	-	+	+
200 μM suramin (bas.)	-	-	-	+	-

FIGURE 7

References

1. **Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB and Ward PA.** Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 105: 248-258, 2002.
2. **Banderali U, Brochiero E, Lindenthal S, Raschi C, Bogliolo S and Ehrenfeld J.** Control of apical membrane chloride permeability in the renal A6 cell line by nucleotides. *J Physiol* 519 Pt 3: 737-751, 1999.
3. **Belzer FO and Southard JH.** Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-676, 1988.
4. **Berthiaume Y, Lesur O and Dagenais A.** Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* 54: 150-160, 1999.
5. **Boudreault F and Grygorczyk R.** Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C219-C226, 2002.
6. **Chabot F, Vial B, Siat J, Robert V, Borrelly J and Polu JM.** [Lung transplantation: indications, techniques and results]. *Rev Pneumol Clin* 56: 301-312, 2000.

7. **Cuffe JE, Bielfeld-Ackermann A, Thomas J, Leipziger J and Korbmacher C.** ATP stimulates Cl⁻ secretion and reduces amiloride-sensitive Na⁺ absorption in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J Physiol* 524 Pt 1: 77-90, 2000.
8. **Feng ZP, Clark RB and Berthiaume Y.** Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 248-254, 1993.
9. **Griese M, Gobran LI and Rooney SA.** A2 and P2 purine receptor interactions and surfactant secretion in primary cultures of type II cells. *Am J Physiol* 261: L140-L147, 1991.
10. **Guyot A and Hanrahan JW.** ATP release from human airway epithelial cells studied using a capillary cell culture system. *J Physiol* 545: 199-206, 2002.
11. **Harden TK, Boyer JL and Nicholas RA.** P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 541-579, 1995.
12. **Hazama A and Okada Y.** Involvement of Ca²⁺(+)-induced Ca²⁺ release in the volume regulation of human epithelial cells exposed to a hypotonic medium. *Biochem Biophys Res Commun* 167: 287-293, 1990.

13. **Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E and Okada Y.** Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* 114: 525-533, 1999.
14. **Inglis SK, Olver RE and Wilson SM.** Differential effects of UTP and ATP on ion transport in porcine tracheal epithelium. *Br J Pharmacol* 130: 367-374, 2000.
15. **Iwase N, Sasaki T, Shimura S, Yamamoto M, Suzuki S and Shirato K.** ATP-induced Cl⁻ secretion with suppressed Na⁺ absorption in rabbit tracheal epithelium. *Respir Physiol* 107: 173-180, 1997.
16. **Mall M, Wissner A, Gonska T, Calenborn D, Kuehr J, Brandis M and Kunzelmann K.** Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na⁽⁺⁾ absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways [In Process Citation]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 755-761, 2000.
17. **Matthay MA, Folkesson HG and Verkman AS.** Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am J Physiol* 270: L487-L503, 1996.
18. **Niisato N and Marunaka Y.** Hyposmolality-induced enhancement of ADH action on amiloride-sensitive I_{sc} in renal epithelial A6 cells. *Jpn J Physiol* 47: 131-137, 1997.

19. **Niisato N, Van Driessche W, Liu M and Marunaka Y.** Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na⁽⁺⁾ transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J Membr Biol* 175: 63-77, 2000.
20. **Oike M, Kimura C, Koyama T, Yoshikawa M and Ito Y.** Hypotonic stress-induced dual Ca⁽²⁺⁾ responses in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H630-H638, 2000.
21. **Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J and Morishima S.** Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532: 3-16, 2001.
22. **Ralevic V and Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492, 1998.
23. **Ramminger SJ, Collett A, Baines DL, Murphie H, McAlroy HL, Olver RE, Inglis SK and Wilson SM.** P2Y2 receptor-mediated inhibition of ion transport in distal lung epithelial cells. *Br J Pharmacol* 128: 293-300, 1999.
24. **Rice WR, Burton FM and Fiedeldey DT.** Cloning and expression of the alveolar type II cell P2u-purinergic receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 27-32, 1995.

25. **Rice WR and Singleton FM.** P2Y-purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium. *Br J Pharmacol* 91: 833-838, 1987.
26. **Schliess F, Sinning R, Fischer R, Schmalenbach C and Haussinger D.** Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem J* 320 (Pt 1): 167-171, 1996.
27. **Simmons NL.** Stimulation of Cl⁻ secretion by exogenous ATP in cultured MDCK epithelial monolayers. *Biochim Biophys Acta* 646: 231-242, 1981.
28. **Sugita M, Ferraro P, Poirier D, Hong A and Berthiaume Y.** Effects of pulmonary flushing and preservation on alveolar fluid clearance in a canine model. *Am J Respir Crit Care Med* 163: A334, 2001.
29. **Taylor A, Kudlow B, Marrs K, Gruenert D, Guggino W and Schwiebert E.** Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol* 275: C1391-C1406, 1998.
30. **Tokuda S, Niisato N, Morisaki S and Marunaka Y.** Calmodulin-dependent regulation of hypotonicity-induced translocation of ENaC in renal epithelial A6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 619-623, 2002.

31. **Urbach V, Leguen I, O'Kelly I and Harvey BJ.** Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells. *J Membr Biol* 168: 29-37, 1999.
32. **Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE and Matthay MA.** Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 980-988, 1999.
33. **Wills NK, Millinoff LP and Crowe WE.** Na⁺ channel activity in cultured renal (A6) epithelium: regulation by solution osmolarity. *J Membr Biol* 121: 79-90, 1991.
34. **Yamamoto T and Suzuki Y.** Role of luminal ATP in regulating electrogenic Na(+) absorption in guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G300-G308, 2002.

CHAPITRE 3

DISCUSSION



Nos résultats démontrent que les changements de volume induits par le choc hypotonique de 20 % entraînent une augmentation du I_{sc} total. Cette augmentation serait principalement liée à une augmentation du transport de sodium puisque le I_{sc} amiloride-sensible est augmenté suite au choc hypotonique. De plus, l'utilisation préalable d'amiloride 1 et 100 μM inhibe environ 70 % de l'augmentation du I_{sc} total induite par le choc hypotonique. Par ailleurs, le choc hypotonique (20 %) entraîne une libération significative d'ATP ($1,77 \times 10^{-13}$ moles d'ATP/ 10^6 cellules) au niveau de la membrane apicale des cellules ATII. Afin de déterminer si la libération d'ATP pouvait être impliquée dans cette augmentation du I_{sc} , nous avons étudié l'impact d'inhibiteurs des récepteurs purinergiques et l'effet de l'ATP extracellulaire. Deux inhibiteurs ont été utilisés: la suramine (200 μM) qui est un inhibiteur non spécifique des récepteurs purinergiques de classe P2 et l'apyrase (10 U/ml) qui entraîne l'hydrolyse de l'ATP. L'utilisation de ces inhibiteurs n'a pas empêché l'augmentation du I_{sc} amiloride-sensible induite par le choc hypotonique de 20 %. Par ailleurs, l'application d'ATP (100 μM) extracellulaire entraîne une diminution du I_{sc} amiloride-sensible lorsque appliqué bilatéralement ou seulement au niveau apical de la monocouche. Par la suite, afin de s'assurer que l'augmentation du I_{sc} amiloride-sensible induite par le choc hypotonique n'était pas liée aux produits de dégradation de l'ATP, nous avons déterminé l'impact de l'adénosine (100 μM) sur le I_{sc} total. Les résultats préliminaires démontrent que l'adénosine entraîne une diminution non-significative du I_{sc} total. Nous pouvons donc conclure que le choc hypotonique entraîne une augmentation du transport sodique qui n'est toutefois pas directement liée à la libération d'ATP.

3.1 Impact du choc hypotonique sur le I_{sc} total

3.1.1 Impact du choc hypotonique sur la R_{te}

Avant de s'intéresser à l'impact du choc hypotonique sur le courant de court-circuit (I_{sc}), il est important d'évaluer l'impact sur la résistance, car elle nous permet de s'assurer que les mesures de courant transépithélial proviennent d'un épithélium fonctionnel (c'est-à-dire formant une monocouche intacte). La résistance membranaire transépithéliale (R_{te}) est établie par la loi d'Ohms :

Loi d'Ohms : $V = RI$

$$R_{te} = \frac{V_{max} - V_{min}}{I_{max} - I_{sc}}$$

Où V correspond à la différence de potentiel en mV et I au courant en μA . Afin de mesurer la résistance, une différence de potentiel de 1 mV (V_{max}) est appliquée à la membrane et nous mesurons l'impact sur le courant I_{sc} (I_{max}).

L'ensemble des travaux publiés utilise un choc hypotonique de 15 à 35 % afin de préserver le mieux possible l'intégrité de la monocouche cellulaire (10; 21; 79; 94; 130). Afin de déterminer le niveau de choc hypotonique que les cellules ATII pouvaient supporter, nous avons exposé les cellules à différents chocs hypotoniques. Les chocs hypotoniques de 30, 40 et 50% causent des baisses de

résistance respectivement de 22, 38 et 50 % (résultats non présentés). Par ailleurs, l'application d'un choc hypotonique de 20 % affecte peu les conditions de base de la monocouche (voir *Table I*, p.49). Nous avons donc poursuivi notre investigation en utilisant un choc hypotonique de 20%.

3.1.2 Impact du choc hypotonique sur le transport de Na^+

Les résultats obtenus à l'aide de la chambre de Ussing à la **figure 1** (page 50), démontrent clairement qu'un choc hypotonique de 20 % augmente le I_{sc} total des cellules ATII. En effet, le I_{sc} total augmente de $2,45 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ soit une augmentation de 49 %. Par ailleurs, l'utilisation d'amiloride $1 \mu\text{M}$ avant et après le choc hypotonique a démontré que le I_{sc} amiloride-sensible était augmenté de $2,51 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Par conséquent, l'augmentation du I_{sc} total induite par le choc hypotonique de 20 % est liée principalement à une augmentation du transport de Na^+ .

Nos résultats semblent concorder avec ceux de l'équipe Wills et coll. (130), effectué en 1991. Ceux-ci démontraient qu'une diminution de l'osmolarité de 200 à 170 mOsm/kg, soit un choc hypotonique d'environ 15 %, entraînait une augmentation du I_{sc} total de 50 % au niveau des cellules A6. En comparaison, notre solution isotonique possède une osmolarité de 314 mOsm/kg et celle hypotonique est de 258 mOsm/kg.

Toutefois, il existe des différences importantes, entre les résultats obtenus par cette équipe et les nôtres, entre autre au niveau de la cinétique d'augmentation du I_{sc} total. Les résultats obtenus par Wills et coll. démontrent que l'augmentation du I_{sc} total induite par le choc hypotonique s'effectue progressivement lors des 5 à 10 premières minutes puis atteint un maximum après 20 à 30 minutes. Pour notre part, l'augmentation du I_{sc} total s'effectue très rapidement et le maximum est atteint en moins de 3 minutes suite au choc hypotonique. Cette différence peut être liée au type cellulaire, à la méthodologie ou au mécanisme impliqué.

3.1.2.1 type cellulaire

Les cellules A6 et les cellules ATII possèdent une fonction de réabsorption de Na^+ (78; 130). Toutefois, les cellules A6 proviennent de cellules rénales dont les propriétés de transport sodique sont apparentées aux cellules rénales du tubule distal (130) tandis que les cellules ATII sont des cellules épithéliales alvéolaires (78). Puisque les cellules A6 et les cellules ATII sont deux types cellulaires différents provenant d'organes différents, il est probable que la réponse au choc hypotonique soit modifier.

3.1.2.2 méthodologie

Bien qu'aucune précision à ce sujet ne soit décrite dans l'article de Wills et coll., cette différence pourrait être due à l'utilisation d'un système de perfusion. En effet, l'utilisation d'un tel système entraîne un changement progressif de l'osmolarité de la solution ce qui pourrait engendrer une augmentation du I_{sc} plus lente. Étant

donné que nous avons effectué directement les chocs hypotoniques par l'ajout d'eau de part et d'autre de la monocouche à l'aide d'une pipette, et non à l'aide d'un système de perfusion, la diminution d'osmolarité est rapide. Ceci pourrait expliquer la vitesse à laquelle le I_{sc} total est augmenté suite au choc hypotonique. De plus, il pourrait s'agir d'une différence au niveau des volumes de la chambre de Ussing. En effet, contrairement à la chambre de Ussing traditionnelle qui demande un volume minimal d'environ 11 ml de part et d'autre de la monocouche, nous utilisons une chambre de Ussing qui a été modifiée afin que seulement 6 ml de milieu du côté basolatéral et 2 ml du côté apical soient nécessaires. Ces modifications apportés au protocole et à la chambre de Ussing permettent de faciliter le changement de solution et d'augmenter la vitesse à laquelle le choc hypotonique est effectué.

Il serait justifié de remettre en cause la méthode utilisée pour effectuer les chocs hypotoniques, puisque l'ajout d'eau n'est pas la méthode utilisée habituellement. En effet, la plupart des études utilisent une solution hypotonique qui est seulement faible en NaCl. Cette méthode permet de ne pas modifier la concentration des autres ions (39; 130), contrairement à la nôtre qui cause une diminution de tous les ions. Est-ce que cette différence méthodologique pourrait avoir des conséquences sur le changement de I_{sc} induit par le choc hypotonique? Puisque la majorité du courant transépithélial correspond au transport sodique, nous pensons que la diminution des autres ions aurait un impact négligeable et non détectable sur nos résultats. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons effectué des expériences

avec les deux types de solutions hypotoniques et nous avons regardé l'impact sur le I_{sc} total et amiloride-sensible. Les résultats obtenus concordent avec notre hypothèse puisque aucune différence n'a été observée. En effet, le choc hypotonique effectué avec de l'eau ou une solution hypotonique faible en sel entraîne respectivement une augmentation du I_{sc} total de $2,45 \pm 0,26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ et $2,68 \pm 0,36 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Par ailleurs, l'équipe de Rehn et coll. a utilisé la même méthode que nous lors de leurs travaux publiés en 1998 (94). Toutefois, il est impossible de comparer les résultats obtenus avec les nôtres puisqu'ils effectuaient des chocs hypotoniques seulement au niveau de la membrane basolatérale des cellules A6.

3.1.2.3 *mécanisme*

Pour ce qui est du mécanisme impliqué, une étude effectuée par l'équipe de Niisato et coll. en 1997 suggère que l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique soit liée à une augmentation de la translocation de ENaC à la membrane au niveau des cellules A6 (81). Tout récemment, les travaux de cette même équipe ont permis de préciser le mécanisme impliqué dans cette augmentation de la translocation. L'activation de la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CaMK II) et d'une kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) sont essentielles pour qu'il y ait une augmentation du nombre de canaux sodiques à la membrane (82). Serait-il possible que le même mécanisme soit présent au niveau des cellules ATII? Les cellules A6, suite au choc hypotonique, entraînent une augmentation du I_{sc} total de façon plutôt lente (20 et 30

minutes). Contrairement à ces cellules, les cellules ATII entraînent en moins de 3 minutes une augmentation maximale du I_{sc} total. Par conséquent, il est possible mais peu probable que le mécanisme impliqué soit identique. Toutefois, il pourrait s'agir d'un mécanisme plus rapide passant par une voie intracellulaire différente mais qui induit tout de même une augmentation de la translocation de ENaC à la membrane au niveau des cellules ATII.

Trois mécanismes possibles pourraient être impliqués dans l'augmentation du transport sodique suite au choc hypotonique, soit la force motrice (gradient électrochimique), la modulation de l'activité et l'insertion à la membrane de canaux ou transporteurs de Na^+ .

Dans un système de Ussing la différence de potentiel est nulle lors de la mesure du I_{sc} et par conséquent il n'y a pas de force motrice pour un courant paracellulaire. Le I_{sc} correspond au flux ionique généré par les cellules et correspond majoritairement au flux net des ions à travers l'épithélium au niveau des tissus spécialisés dans ce transport. Afin de vérifier si l'augmentation du I_{sc} total suite au choc hypotonique est principalement reliée à une augmentation de l'activité de ENaC ou de d'autre système de transport de Na^+ , nous avons évalué l'impact de l'inhibition du courant sodique sur le changement de I_{sc} induit par le choc hypotonique comme décrit à la **figure 2** (page 51). Afin de déterminer l'impact du transport du Na^+ , nous avons utilisé de l'amiloride 1 μM ou 100 μM , car le kd pour inhiber ENaC avec l'amiloride est de 0,1 μM (14) et celui pour inhiber les

canaux NSC se situe entre 1 et 2 μM (78). De plus, l'amiloride 100 μM est également utilisé pour inhiber d'autres transporteurs de Na^+ (78). Le choc hypotonique entraîne une augmentation du I_{sc} total de 2,6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ tandis qu'on observe une augmentation de 0,99 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ et 0,72 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectivement lorsque les cellules ont été pré-traitées avec l'amiloride 1 μM et 100 μM . Toutefois, il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus en présence d'amiloride 1 ou 100 μM . Contrairement à la première expérience (figure 1) où l'augmentation du I_{sc} total semblait être liée seulement à une augmentation du transport de Na^+ ; ces résultats démontrent que cette augmentation du I_{sc} total serait liée au transport sodique à environ 70 %. Cette différence entre la première et la seconde série d'expériences peut s'expliquer d'une part par l'importance du transport sodique au niveau des cellules ATII (78). En effet, des changements dans l'activité de plusieurs types de canaux peuvent avoir des conséquences sur le transport sodique. D'autre part, étant donné que l'inhibition de ENaC (amiloride 1 μM) et même l'inhibition de tout transport sodique (amiloride 100 μM) ne bloquent pas totalement l'augmentation du I_{sc} induite par le choc hypotonique; ce dernier doit modifier l'activité d'autres types de canaux. Les plus importants à considérer sont les canaux K^+ et/ou Cl^- , puisque ceux-ci sont impliqués dans les mécanismes de régulation du volume cellulaire. Il serait donc intéressant d'effectuer des expériences, par exemple en présence d'amiloride, nous permettant d'évaluer l'impact d'inhibiteurs des canaux K^+ et Cl^- sur le I_{sc} total suite au choc hypotonique. Une telle augmentation dans le transport de K^+ et/ou de Cl^- suite au choc hypotonique entraîne des changements de gradient électrochimique. Par

conséquent, une partie du mécanisme d'activation du transport de Na^+ pourrait dépendre d'un changement de gradient secondaire à l'activation d'autres canaux par le choc hypotonique.

Par ailleurs, il est possible que le mécanisme impliqué dans l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique au niveau des cellules ATII résulte d'une modulation de l'activité de ENaC. La modulation peut être reliée, par exemple, à un changement dans la probabilité d'ouverture du canal. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences en « *patch clamp* » pourraient être réalisées. Cette technique a vu le jour dans le milieu des années 70 grâce aux travaux de Erwin Neher et Bert Sackmann (104). Selon la configuration, elle permet entre autre de mesurer les courants cellulaires totaux (configuration « *whole-cell* ») ou unitaire (« *cell-attached* »), d'effectuer des études sur le couplage récepteur-canal et de déterminer les caractéristiques électrophysiologiques du canal. Dans le cas présent, la configuration « *cell-attached* » nous permettrait de regarder l'impact du choc hypotonique sur les courants d'une petite partie de la membrane. Par la suite, l'analyse des signaux permettrait de recueillir des informations tels que la probabilité d'ouverture, la sélectivité du canal et le nombre de canaux à l'état ouvert, déterminant les caractéristiques électrophysiologiques du canal. Par ailleurs, il est possible que les CAPs (*channel-activating protease*) soient impliquées dans l'augmentation du transport de Na^+ au niveau des cellules ATII suite au choc hypotonique. En fait, des travaux effectués par Vuagniaux et coll. démontrent que ces protéases augmentent le transport de Na^+ au niveau des

cellules mpkCCD(c14) (*mouse cortical collecting duct cell line*) chez la souris (121; 122) et agissent directement en activant un canal. Des études ultérieures permettront peut-être d'identifier des CAPs au niveau des cellules ATII.

Finalement, l'insertion de canaux à la membrane est un autre mécanisme qui pourrait potentiellement être impliqué dans l'augmentation du transport sodique suite au choc hypotonique. Ce mécanisme peut résulter rapidement de la fusion de vésicules contenant des canaux sodiques à la membrane ou s'effectuer de manière plus tardive par la synthèse de nouveaux canaux. Des études montrent qu'un choc hypotonique augmente l'exocytose de vésicules intracellulaires (118). Ces vésicules peuvent contenir des canaux et/ou des transporteurs. Par ailleurs, il a été démontré que le cytosquelette est essentiel lors d'un changement d'osmolarité au niveau de la membrane basolatérale pour stimuler le transport sodique apical au niveau des cellules A6 (94). Étant donné, que le cytosquelette est important pour qu'il y ait exocytose, il est possible que l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique soit lié à une augmentation de la fusion de vésicules à la membrane.

D'autre part, depuis quelques années, certaines équipes de recherche s'intéressent à la régulation de ENaC par des protéines accessoires dont Nedd-4 (*neuronal precursor cell expressed developmentally down-regulated 4*) et SGK1 (*serum and glucocorticoid-regulated kinase-1*) (37). Nedd-4 serait l'une des plus importantes protéines impliquées dans le contrôle de l'endocytose et la dégradation de ENaC

(37). La phosphorylation de Nedd-4 par SGK1 inhibe la dégradation de ENaC ce qui permet d'augmenter l'expression de celui-ci à la membrane (25). SGK1 est une sérine/thréonine kinase qui est régulée au niveau transcriptionnel par plusieurs facteurs incluant les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les chocs osmotiques à la fois hypotonique et hypertonique (9; 37). Il a été démontré, en outre au niveau des cellules A6, qu'un changement d'osmolarité induit une augmentation de l'expression de SGK1 ce qui permettrait d'augmenter le transport de Na^+ (102). Toutefois, au niveau des cellules ATII la régulation est plus rapide, jetant un doute sur l'implication d'un processus de transcription.

Afin de déterminer s'il y a insertion de nouvelles membranes suite au choc hypotonique, des mesures de capacitance membranaire en électrophysiologie (60) ou des études évaluant le mouvement des vésicules (endocytose/exocytose) en microscopie confocale à fluorescence pourraient être effectuées (11). Toutefois, ces expériences ne précisent pas la nature des canaux nouvellement insérés à la membrane. Par conséquent, suite à cela, des études plus poussées pourraient nous permettre de déterminer s'il y a une augmentation du nombre de canaux ENaC à la membrane. Pour ce faire, la méthode de localisation immunohistochimique pourrait être utilisée afin d'observer le déplacement des canaux ENaC (34). Cette technique nécessite la fixation des cellules qui peut s'effectuer rapidement, c'est-à-dire en 30 secondes environ, avec une solution acétone/paraformaldéhyde. Puisque que 3 à 5 minutes sont nécessaire afin d'obtenir une augmentation maximale du courant Na^+ induite par le choc hypotonique, cette technique pourrait donc être

utilisée. Une seconde possibilité serait d'utiliser la méthode de biotinylation de surface et par la suite de rechercher ENaC à la membrane par un immunobuvardage de type « *western* » (90). Soulignons que ces deux types d'expériences devraient être effectuées à la fois sur des cellules témoins et stimulées avec des chocs hypotoniques.

Par ailleurs, il est connu que les chocs mécaniques tels que les chocs hypotoniques entraînent une libération d'ATP au niveau de divers types de cellules épithéliales (54). L'ATP agit sur les récepteurs purinergiques puis entraîne une augmentation rapide du Ca^{2+}_i . Ce dernier appuierait le RVD en permettant l'activation de canaux K^+ sensibles au calcium (88), en remodelant le cytosquelette et en favorisant l'exocytose d'osmolytes (54; 75). Puisque le Ca^{2+}_i est un important régulateur de l'exocytose, il pourrait jouer un rôle dans l'insertion de vésicules à la membrane contenant ENaC suite au choc hypotonique. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'ATP libérée suite au choc hypotonique pourrait moduler l'augmentation du transport de Na^+ au niveau des cellules ATII. Afin de corroborer celle-ci, nous avons, en premier lieu, déterminé la cinétique de libération d'ATP induite par le choc hypotonique de 20 %.

3.2 Est-ce que l'ATP est impliquée dans les changements de I_{sc} induits par le choc hypotonique?

3.2.1 Caractérisation de la cinétique de libération d'ATP induite par le choc hypotonique

Un choc hypotonique de 20 % induit une libération significative d'ATP ($1,77 \times 10^{-13}$ moles d'ATP/ 10^6 cellules) du côté apical de la monocouche comme décrit à la **figure 3** (page 52). Cette libération d'ATP est induite par des chocs hypotoniques effectués des deux côtés de la monocouche ou seulement du côté apical de celle-ci (résultats non présentés). La cinétique de libération d'ATP est rapide. En effet, à peine 1 minute après le choc hypotonique, l'accumulation d'ATP est maximale. Par la suite, le niveau d'ATP diminue graduellement jusqu'à l'obtention d'un plateau pour les 15 à 60 minutes qui suivent le choc hypotonique. Durant cette période, la quantité d'ATP accumulée se retrouve près des valeurs d'ATP précédant le choc hypotonique.

Plusieurs études démontrent que le choc hypotonique induit une libération d'ATP (10; 28; 46; 59; 63; 117). De plus, plusieurs de ces études ont été effectuées sur des cellules épithéliales telles que, les cellules épithéliales humaines intestinales 407 (47), les cellules épithéliales alvéolaires A549 (10), et récemment les cellules Calu-3 (41). Toutefois, la cinétique de libération d'ATP ainsi que la quantité d'ATP mesurée diffèrent.

En effet, les résultats publiés par Hazama et coll. (47) sur les cellules intestinales 407 présentent une libération d'ATP maximale 5 minutes suite au choc hypotonique de 56 %. Les 15 minutes suivantes, la libération d'ATP reste stable puis une légère baisse est observée. De plus, la quantité d'ATP libérée est substantielle, de l'ordre des nanomoles (10^{-9}). Par ailleurs, les travaux effectués par Boudreault et coll. (10) sont semblables à ceux de Hazama et coll. puisqu'ils démontrent que les cellules A549 libèrent l'ATP de façon soutenue suite au choc hypotonique de 30 %. Ces résultats sont très différents des nôtres. Toutefois, les résultats obtenus par Guyot et coll. (41) sur les cellules Calu-3 coïncident avec nos résultats. En effet, un choc hypotonique de 25 % effectué du côté apical entraîne une libération d'ATP maximale les 2 premières minutes. Par la suite, la quantité d'ATP accumulée diminue rapidement pour atteindre, 15 à 40 minutes suite au choc hypotonique, un niveau intermédiaire qui se rapproche des valeurs de base. Par ailleurs, les niveaux d'ATP libérée obtenus par cette équipe sont sensiblement les mêmes que les nôtres, c'est-à-dire des valeurs de l'ordre des picomoles (10^{-12}).

Outre le type cellulaire, les différences au niveau de la cinétique et de la quantité d'ATP libéré pourraient être attribuables à la méthodologie. En effet, la température à laquelle est effectuée l'expérience ainsi que la méthode utilisée afin de mélanger adéquatement le milieu peuvent modifier les résultats. Le mélange continu permet une distribution homogène de l'ATP qui est présente dans le milieu. Pour ce qui est de la température, elle modifie l'activité des ecto-ATPases, enzyme dégradant l'ATP. En effet, les ecto-ATPases sont plus actives à 37°C qu'à

la température ambiante (22°C) (134). Par conséquent, la quantité d'ATP sera moins élevée si les expériences sont effectuées à 37°C. Toutefois, la température ne peut pas être la cause des différences obtenus au niveau de la quantité d'ATP libérée par les différents types cellulaires (résultats présentés ci-haut) puisque toutes les expériences ont été effectuées à 37°C.

Il serait aussi raisonnable de remettre en cause la technique de bioluminescence de la luciférine/luciférase utilisée pour mesurer la quantité d'ATP accumulée dans le milieu extracellulaire. Cette technique est utilisée par la majorité des équipes travaillant sur l'ATP. Toutefois il existe quelques variantes au niveau de la méthode. En effet, certains utilisent, par exemple, des cellules en suspension ou injectées à l'aide d'une seringue dans la cuvette du luminomètre, tandis que d'autres y déposent une plaque contenant la monocouche cellulaire. Cette dernière technique permet de déterminer la quantité totale d'ATP libérée précisément du côté apical ou basolatéral selon l'endroit où le couple luciférine/luciférase a été déposé, tout en évitant les stress mécaniques causés par la manipulation des cellules (63; 115; 117). Pour notre part, nous ne mesurons que l'accumulation d'ATP présent dans le milieu apical ou basolatéral suite à une stimulation en prélevant un échantillon du surnageant que nous déposons dans le luminomètre et auquel nous ajoutons de la luciférine/luciférase (10; 41). Cette technique permet aussi de minimiser la libération d'ATP causée par les stress mécaniques. En effet, les cellules sont déposées sur une plaque agitatrice dont la vitesse est constante et minimale afin d'obtenir un mélange homogène du milieu sans induire une

libération d'ATP additionnelle. De plus, nous effectuons un contrôle à l'aide de la solution isotonique ce qui nous permet d'évaluer l'impact de l'ajout d'une solution sur la libération d'ATP. Toutes ces mesures sont prises afin de s'assurer que l'accumulation d'ATP mesurée est seulement due au choc hypotonique.

Une autre technique plus récente mais peu utilisée est le HPLC, « *high-performance liquid chromatography* », qui permet de quantifier les différents nucléotides (ATP, ADP, AMP) (66). Puisque les nucléotides sont des molécules chargées, ils sont bien séparés avec un HPLC à échangeur ionique. Bien que cette technique soit très sensible, le processus de séparation demeure très long et les colonnes à échangeur ionique ne sont pas très stables. Par ailleurs, il y a le « *reversed-phased* » HPLC qui sépare les composés par interaction hydrophobique ce qui est moins souhaitable pour des nucléotides chargés en phosphates. Finalement, puisque ces techniques sont relativement longues et que l'ATP se dégrade rapidement, il est nécessaire d'inactiver rapidement les enzymes ATPases lors de l'expérimentation (74).

Par conséquent, lorsque l'on désire mesurer seulement l'ATP, la technique de bioluminescence m'apparaît beaucoup plus intéressante parce qu'elle est simple, rapide et qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des inhibiteurs des ATPases. La technique par HPLC constitue une technique spécialisée intéressante lorsque l'on veut quantifier plusieurs nucléotides et déterminer le ratio entre ATP/ADP, par exemple.

Nos résultats démontrent bien qu'il y a libération d'ATP suite à un choc hypotonique. Par ailleurs, il est intéressant de voir qu'un choc hypotonique effectué seulement du côté apical de la monocouche est suffisant pour causer une libération d'ATP qui est elle-même orientée du côté apical. Suite à ces résultats, il serait légitime de se demander de quelle manière s'effectue cette libération d'ATP? Est-ce par un phénomène d'exocytose ou via un canal ionique? Jusqu'à ce jour aucune réponse précise n'a été apportée. Certaines équipes ont déjà suggéré que l'ATP soit libérée via le CFTR (105), cependant cette hypothèse a été rejetée par d'autres travaux (40; 93). Il y a aussi le phénomène d'exocytose qui semble intéressant d'autant plus qu'il est connu qu'un choc hypotonique entraîne, au niveau de cellules épithéliales en monocouche, une augmentation du volume cellulaire et ce en augmentant la hauteur des cellules (21). Ceci pourrait expliquer pourquoi nous observons une libération d'ATP seulement au niveau de la membrane apicale des cellules ATII suite au choc hypotonique. Toutefois, peu de travaux ont été effectués à ce sujet et aucun au niveau du système respiratoire (29; 76). Par conséquent, il aurait été intéressant de regarder l'impact d'inhibiteurs de la voie de l'exocytose sur la libération d'ATP induite par le choc hypotonique au niveau des cellules ATII. Pour ce faire, des inhibiteurs permettant d'empêcher ou de diminuer le transport des vésicules jusqu'à la membrane par exemple, des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules (nocodazole) et des filaments d'actine (cytochalasine D) pourraient être utilisés. Une expérience très simple

consisterait à pré-traiter les cellules avec ces inhibiteurs, d'effectuer par la suite des chocs hypotoniques puis de regarder l'impact sur la libération d'ATP.

D'autre part, puisque l'ATP est libérée seulement du côté apical de la monocouche au niveau des cellules ATII, il serait intéressant de déterminer à quel endroit se retrouvent les récepteurs purinergiques. Se retrouvent-ils seulement au niveau de la membrane apicale? Les études sur l'identification des récepteurs purinergiques démontrent la présence des récepteurs A₁, A₂ (38), P₂Y₁ (97) et P₂Y₂ (96) au niveau des cellules ATII. Étant donné que l'identification de ces récepteurs a été effectuée à l'aide de techniques utilisant l'ARN total, leurs localisations exactes n'ont jamais été déterminées. Cependant, un article de Griese et coll. publié en 1991 démontre la présence de ces récepteurs au niveau de la membrane apicale des cellules ATII suite à des expériences effectuées en culture (38). Pour ce qui est de leur présence au niveau de la membrane basolatérale des cellules ATII, aucune publication ne le confirme. Il serait donc intéressant de déterminer la localisation précise des récepteurs purinergiques au niveau de ces cellules.

3.2.2 Impact de l'application d'ATP sur le I_{sc} total

Puisque nous voulions déterminer si l'augmentation du transport de sodium induite par le choc hypotonique était liée à la libération d'ATP, il était nécessaire de déterminer l'impact de l'application d'ATP extracellulaire sur le I_{sc} total. Les résultats obtenus à la **figure 4** (page 53), démontrent clairement que l'ATP

(100 μM) diminue le I_{sc} total et le I_{sc} amiloride-sensible des cellules ATII. En effet, le I_{sc} total diminue de 1,57 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ suite à l'application d'ATP bilatérale ou seulement apicale, soit une diminution de 24 %. De plus, l'application d'ATP du côté seulement basolatéral de la monocouche n'a aucun effet sur le I_{sc} total. Par ailleurs, l'utilisation d'amiloride 1 μM avant et après l'application d'ATP a permis de démontrer que l'ATP entraîne une diminution du I_{sc} amiloride-sensible de 0,75 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ soit 50 % de la diminution du I_{sc} total observée. Ces résultats démontrent que l'ATP diminue de façon importante le transport sodique sensible à l'amiloride.

Une autre façon d'évaluer l'implication du transport sodique dans la diminution du I_{sc} total suite à l'application d'ATP est de déterminer l'effet de l'inhibition du courant sodique sur le changement du I_{sc} induit par l'ATP 100 μM comme décrit à la **figure 5** (page 55). Au niveau des cellules non traitées, l'ATP entraîne une diminution du I_{sc} total de 1,26 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ tandis qu'on observe une diminution de 0,49 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ et aucun changement respectivement lorsque les cellules ont été pré-traitées avec l'amiloride 1 μM et 100 μM . L'amiloride 100 μM est utilisé afin d'inhiber tous les canaux sodiques sensibles à des concentrations supérieures à 1 μM d'amiloride dont principalement le NSCC qui est sensible à l'amiloride 10 μM (32). Par conséquent, ces résultats démontrent que la diminution du I_{sc} total observée suite à l'application d'ATP 100 μM est liée à une diminution du transport sodique soit par des canaux ENaC et NSCC ou des transporteurs sensibles à l'amiloride.

Nos résultats concordent avec tous les travaux déjà effectués sur l'impact de l'ATP sur le transport sodique. En effet, l'ATP diminue l'absorption de Na^+ au niveau de divers organes (22; 132) ainsi qu'au niveau de plusieurs types cellulaires de l'appareil respiratoire (50; 52; 73; 92). De ce fait, nous savons à présent que l'ATP diminue le transport sodique non seulement au niveau des voies respiratoires supérieures (50; 52; 73), mais aussi au niveau des voies respiratoires inférieures. Ceci fait suite aux expériences sur les cellules FDLE de rat (92) et maintenant par nos travaux sur les cellules épithéliales ATII chez le rat. Par ailleurs, les travaux effectués sur les cellules FDLE de rat démontrent que l'ATP 100 μM a un effet seulement lorsqu'elle est appliquée du côté apical de la monocouche, soit un résultat identique au nôtre.

Toutefois ces résultats suggèrent, contrairement à l'hypothèse que nous avons émise, que l'ATP n'est pas impliqué dans l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique. Pourtant, il a été démontré que le choc hypotonique entraîne une augmentation du volume cellulaire (21; 92) et nous avons démontré qu'il cause une libération d'ATP au niveau des cellules ATII. Par ailleurs, il a été démontré que l'ATP est impliquée dans la diminution compensatrice du volume cellulaire (RVD) et entraîne une diminution du transport de Na^+ . Par conséquent, l'ATP libérée suite au choc hypotonique pourrait-elle avoir un rôle protecteur en limitant le gonflement cellulaire relié à une entrée d'eau, secondaire à une augmentation du transport de sodium? Pour ce faire, l'ATP

libérée suite au choc hypotonique pourrait moduler l'inhibition du transport de Na^+ . Si tel est le cas, l'absence de libération d'ATP lors du choc hypotonique entraînerait peut-être une augmentation plus importante du volume cellulaire et par le fait même du transport de Na^+ .

D'autre part, l'ATP est connu pour augmenter la conductance en K^+ et Cl^- des cellules afin de favoriser le RVD (51; 67; 96; 101). Nos résultats démontrent que le choc hypotonique entraîne une augmentation de 30% du I_{sc} qui n'est liée au transport sodique. Même si nos résultats semblent démontrer que l'ATP modifie principalement le courant Na^+ , pourrait-il amplifier les composantes ioniques autres que cette dernière? Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer l'impact de l'application d'ATP suivit d'un choc hypotonique sur le I_{sc} et les courants K^+ et Cl^- .

3.2.3 Impact des inhibiteurs purinergiques sur les changements de I_{sc} induits par le choc hypotonique

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons évalué l'impact d'un pré-traitement avec des inhibiteurs purinergiques sur les changements de I_{sc} suite au choc hypotonique. Comme décrit à la **figure 6** (page 56), les cellules pré-traitées avec l'apyrase 10 U/ml ou la suramine 200 μM du côté apical de la monocouche suivi d'un choc hypotonique entraînent une augmentation du I_{sc} total similaire aux cellules non traitées. Ces résultats semblent démontrer que l'augmentation du

transport sodique causée par le choc hypotonique n'est pas liée à l'action de l'ATP sur ces récepteurs.

3.2.3.1 Suramine

La suramine est un inhibiteur non spécifique des récepteurs purinergiques de classe P2 au même titre que le « *reactive blue 2* » et le PPADS, c'est-à-dire qu'il inhibe à la fois les récepteurs de classe P2X et P2Y. Toutefois, ces antagonistes ne sont pas efficaces pour toutes les sous-classes de récepteurs de type P2. En effet, seule la suramine peut être utilisée pour inhiber à la fois les récepteurs P2Y1 et P2Y2 que l'on retrouve au niveau des cellules ATII chez le rat tandis que le PPADS fonctionne seulement pour le récepteur P2Y1 (91).

Outre cet effet, la suramine inhibe les ecto-nucléotidases et possède des propriétés antiparasitaires et anti-tumorales (65; 91). Cette dernière propriété de la suramine réside en sa capacité d'inhiber, de façon non spécifique, des facteurs de croissance tels que : le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (120), le TGF-beta (*transforming growth factor*) (69; 107) et le EGF (*epidermal growth factor*) (80). En terminant, la suramine inhibe aussi l'activité des GTPases de certaines protéines G et inhibe les ADN et ARN polymérase (91).

Nos résultats démontrent que le pré-traitement des cellules avec la suramine 200 μM au niveau de la membrane apicale de la monocouche suivi d'un choc hypotonique de 20% entraîne une augmentation du I_{sc} total et du I_{sc} amiloride-

sensible similaire aux cellules non traitées. Ce résultat suggère que l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique n'est pas liée à l'activation des récepteurs purinergiques. D'autre part, puisque l'augmentation du I_{sc} total n'est pas plus importante en présence de suramine, cela suggère que l'ATP ne limite pas l'augmentation du transport de sodium, contrairement à l'hypothèse émise plus tôt. Toutefois, la suramine appliquée de part et d'autre de la monocouche bloque totalement l'augmentation du I_{sc} total induite par le choc hypotonique. Pourtant les résultats présentés à la figure 3 et 4 démontrent à la fois que le choc hypotonique entraîne une libération d'ATP apicale et que l'application d'ATP extracellulaire seulement à la membrane apicale a des effets sur le I_{sc} total. Ces résultats suggèrent que les récepteurs purinergiques soient présents seulement au niveau apical de la monocouche. Puisque la suramine n'agit pas seulement sur les récepteurs purinergiques, il est possible que la réponse obtenue suite à l'application basolatérale de la suramine ne soit pas liée à l'inhibition de ces récepteurs. Toutefois, aucune publication jusqu'à présent ne documente un effet similaire au nôtre. Par conséquent, des expériences permettant de déterminer par quel mécanisme la suramine appliquée du côté basolatéral empêche l'augmentation du I_{sc} induite par le choc hypotonique au niveau des cellules ATII seraient très intéressantes.

Suite à ces résultats avec la suramine, il serait légitime de remettre en cause l'utilisation de cet inhibiteur puisqu'il n'est pas un inhibiteur spécifique des récepteurs purinergiques et qu'il est reconnu pour avoir d'autres effets. Toutefois, il

n'existe pas d'inhibiteur spécifique des récepteurs P2Y2. Pour ce qui est des récepteurs P2Y1, de nouveaux antagonistes ont été développés comme le A3P5PS et le A3P5P, mais leur efficacité reste à prouver (91). Par conséquent, la suramine demeure l'un des inhibiteurs les plus utilisés et apparaît donc dans de nombreuses études sur l'ATP. D'autre part, nos résultats démontrent que l'ATP est libérée et agit du côté apical de la monocouche. Par conséquent, l'effet de la suramine basolatérale ne peut pas être lié à l'action de l'ATP libérée suite au choc hypotonique sur les récepteurs purinergiques. Par ailleurs, nous avons utilisé un autre agent, l'apyrase, afin de nous assurer que l'ATP n'était pas impliquée dans la modulation du transport sodique induite par le choc hypotonique.

3.2.3.2 *Apyrase*

L'apyrase est une enzyme qui possède une action ATPase, c'est-à-dire qu'elle permet de dégrader l'ATP en ADP, AMP et finalement en adénosine, ce qui empêche l'ATP d'agir sur les récepteurs purinergiques.

Les cellules pré-traitées avec l'apyrase 10 U/ml entraînent, suite à un choc hypotonique de 20%, une augmentation du I_{sc} total similaire aux cellules qui ont seulement subi un choc hypotonique. Ces résultats ainsi que ceux obtenus avec la suramine appliquée du côté apical de la monocouche démontrent que l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique n'est pas liée à l'activation des récepteurs purinergiques par l'ATP.

Une autre façon de montrer que l'ATP libérée lors de choc hypotonique n'est impliquée dans la modulation du transport de sodium serait de comparer leur impact respectif sur la modulation du Ca^{2+}_i à l'aide du fura-AM (54). En effet, nous savons que l'ATP agit sur les récepteurs purinergiques ce qui entraîne une augmentation du Ca^{2+}_i au niveau de plusieurs types cellulaires, dont les cellules épithéliales nasales (54; 77). Par ailleurs, il est connu que le choc hypotonique entraîne aussi une augmentation du Ca^{2+}_i . Il aurait donc été intéressant de regarder, au niveau des cellules ATII, l'impact du choc hypotonique, de l'ATP et d'un prétraitement avec la suramine et l'apyrase suivi d'un choc hypotonique sur le niveau de Ca^{2+}_i .

3.3 Est-ce que l'adénosine est impliquée dans les changements de I_{sc} induits par le choc hypotonique?

Les récepteurs purinergiques ont des affinités différentes pour l'ATP et l'ADP. De plus, il existe au niveau des cellules ATII les récepteurs à l'adénosine A1 et A2 (38). Par conséquent, il est plausible que la dégradation de l'ATP entraîne l'activation d'autres récepteurs tels que les récepteurs à l'adénosine. Suite aux résultats obtenus avec l'apyrase nous voulions nous assurer qu'aucun produit de dégradation de l'ATP n'était impliqué dans l'effet du choc hypotonique sur I_{sc} total. Par conséquent, l'impact de l'adénosine 100 μ M sur le I_{sc} total et I_{sc} amiloride-sensible a été déterminé.

3.3.1 Impact de l'adénosine sur le I_{sc} total

Comme décrit à la **figure 7** (page 57), les résultats préliminaires obtenus démontrent que l'adénosine 100 μM entraîne une diminution non significative du I_{sc} total de 0,77 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Cette diminution semble être liée à une réduction du I_{sc} amiloride-sensible, mais d'autres expériences devront être effectuées pour le confirmer. Ces résultats suggèrent que l'adénosine, un produit de dégradation de l'ATP, n'est pas impliquée dans l'augmentation du transport de Na^+ induite par le choc hypotonique. Toutefois, même si l'adénosine seule n'a pas d'effet, il serait intéressant d'effectuer des expériences sur l'effet d'un pré-traitement à l'adénosine suivit d'une choc hypotonique sur le I_{sc} .

CHAPITRE 4

CONCLUSION



Cette étude, effectuée dans le cadre de ma maîtrise, nous a permis de déterminer d'une part, les conséquences des changements de volume induits par le choc hypotonique sur le transport sodique. En effet, les résultats ont démontré que le choc hypotonique augmente principalement le transport Na^+ probablement via l'activation du canal ENaC mais aussi potentiellement par le canal NSCC. Des études ultérieures nous permettront de déterminer non seulement le mécanisme mais aussi d'identifier la cible cellulaire impliqués dans cette augmentation. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des agents connus pour diminuer l'expression de ENaC et regarder l'impact sur l'augmentation du I_{sc} total suite au choc hypotonique. Par ailleurs, les expériences effectuées en présence d'amiloride 100 μM ont permis de constater que le choc hypotonique augmente aussi le transport ionique autre que sodique. Nous pensons qu'il pourrait s'agir des ions K^+ et Cl^- puisqu'ils sont impliqués dans le mécanisme de RVD, mais d'autres travaux devront être réalisés afin de le déterminer.

D'autre part, cette étude nous a permis de démontrer que les cellules ATII libèrent de l'ATP de façon significative au niveau de la membrane apicale suite au choc hypotonique. Toutefois, cette libération d'ATP n'est pas impliquée dans l'augmentation du transport sodique induite par le choc hypotonique. En effet, nous avons démontré que l'ATP appliquée du côté apical de la monocouche entraîne une diminution de l'absorption de Na^+ . Par ailleurs, l'utilisation des inhibiteurs des récepteurs purinergiques n'ont pas modifié l'augmentation du I_{sc} induite par le choc hypotonique.

Ces observations, ainsi que les observations futures, nous permettront de mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'augmentation du volume cellulaire causée par le choc hypotonique augmente l'absorption de Na^+ . Cette augmentation de l'absorption aurait pour rôle d'augmenter la clairance alvéolaire. Les lésions d'ischémie-reperfusion sont causées non seulement par la préservation à froid mais aussi par un processus inflammatoire. Ce dernier entraîne l'expression de cytokines tel que le $\text{TNF-}\alpha$ qui est connu pour diminuer l'expression de ENaC. Une telle diminution entraînerait en principe une diminution de l'augmentation du transport Na^+ suite à une agression par un choc hypotonique. Cette diminution de la réabsorption de Na^+ aurait pour conséquence de diminuer la clairance alvéolaire et par le fait même de limiter le rétablissement des patients suite à une transplantation pulmonaire. Par conséquent une meilleure connaissance de ce phénomène est essentielle.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abbracchio MP and Burnstock G.** Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113-145, 1998.
2. **al Awqati Q.** Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP [comment]. *Science* 269: 805-806, 1995.
3. **Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB and Ward PA.** Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 105: 248-258, 2002.
4. **Bals R, Weiner DJ and Wilson JM.** The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103: 303-307, 1999.
5. **Banderali U, Brochiero E, Lindenthal S, Raschi C, Bogliolo S and Ehrenfeld J.** Control of apical membrane chloride permeability in the renal A6 cell line by nucleotides. *J Physiol* 519 Pt 3: 737-751, 1999.
6. **Barbry P and Hofman P.** Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am J Physiol* 273: G571-G585, 1997.
7. **Belzer FO and Southard JH.** Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-676, 1988.

8. **Bennett WD, Olivier KN, Zeman KL, Hohneker KW, Boucher RC and Knowles MR.** Effect of uridine 5'-triphosphate plus amiloride on mucociliary clearance in adult cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1796-1801, 1996.
9. **Bohmer C, Wagner CA, Beck S, Moschen I, Melzig J, Werner A, Lin JT, Lang F and Wehner F.** The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell Physiol Biochem* 10: 187-194, 2000.
10. **Boudreault F and Grygorczyk R.** Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C219-C226, 2002.
11. **Butterworth MB, Helman SI and Els WJ.** cAMP-sensitive endocytic trafficking in A6 epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C752-C762, 2001.
12. **Bye MR, Ewig JM and Quittell LM.** Cystic fibrosis. *Lung* 172: 251-270, 1994.
13. **Cahill P, Nason MW, Jr., Ambrose C, Yao TY, Thomas P and Egan ME.** Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem* 275: 16697-16701, 2000.

14. **Canessa CM, Horisberger JD and Rossier BC.** Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361: 467-470, 1993.
15. **Canessa CM, Merillat AM and Rossier BC.** Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Am J Physiol* 267: C1682-C1690, 1994.
16. **Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD and Rossier BC.** Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467, 1994.
17. **Chabot F, Vial B, Siat J, Robert V, Borrelly J and Polu JM.** [Lung transplantation: indications, techniques and results]. *Rev Pneumol Clin* 56: 301-312, 2000. (Français)
18. **Chinet T.** [CFTR protein and molecular mechanisms of pulmonary involvement in cystic fibrosis]. *Rev Pneumol Clin* 51: 122-129, 1995. (Français)

19. **Chinet T.** [Physiopathology of cystic fibrosis lung disease]. *Rev Mal Respir* 16: 339-345, 1999. (Français)
20. **Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B and Boeynaems J.** Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors [In Process Citation]. *Cell Signal* 12: 351-360, 2000.
21. **Crowe WE, Ehrenfeld J, Brochiero E and Wills NK.** Apical membrane sodium and chloride entry during osmotic swelling of renal (A6) epithelial cells. *J Membr Biol* 144: 81-91, 1995.
22. **Cuffe JE, Bielfeld-Ackermann A, Thomas J, Leipziger J and Korbmacher C.** ATP stimulates Cl⁻ secretion and reduces amiloride-sensitive Na⁺ absorption in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J Physiol* 524 Pt 1: 77-90, 2000.
23. **Danner I, Baro-Puigdemasa I and Escande D.** [Pharmacology of ion channels in mucoviscidosis. Physiological bases and therapeutic applications]. *Rev Pneumol Clin* 51: 186-192, 1995. (Français)
24. **Davis PB, Drumm M and Konstan MW.** Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1229-1256, 1996.

25. **Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J and Staub O.** Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20: 7052-7059, 2001.
26. **DeCoursey TE, Jacobs ER and Silver MR.** Potassium currents in rat type II alveolar epithelial cells. *J Physiol* 395: 487-505, 1988.
27. **Devor DC and Pilewski JM.** UTP inhibits Na⁺ absorption in wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol* 276: C827-C837, 1999.
28. **Dezaki K, Tsumura T, Maeno E and Okada Y.** Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling- induced ATP release in human epithelial cells [In Process Citation]. *Jpn J Physiol* 50: 235-241, 2000.
29. **Dubyak GR and el Moatassim C.** Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-C606, 1993.
30. **Egan TM, Detterbeck FC, Mill MR, Bleiweis MS, Aris R, Paradowski L, Retsch-Bogart G and Mueller BS.** Long term results of lung

transplantation for cystic fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 22: 602-609, 2002.

31. **Ernst P.** [Lung transplantation: the current state of knowledge]. *Union Med Can* 120: 64-6, 101, 107, 1991. (Français)
32. **Feng ZP, Clark RB and Berthiaume Y.** Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 248-254, 1993.
33. **Feranchak AP, Berl T, Capasso J, Wojtaszek PA, Han J and Fitz JG.** p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na⁺ permeability. *J Clin Invest* 108: 1495-1504, 2001.
34. **Gaillard D, Hinnrasky J, Coscoy S, Hofman P, Matthay MA, Puchelle E and Barbry P.** Early expression of beta- and gamma-subunits of epithelial sodium channel during human airway development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L177-L184, 2000.
35. **Garty H and Palmer LG.** Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77: 359-396, 1997.

36. **Gerkin TM, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB and Ryan US.** Intestinal ischemia-reperfusion injury causes pulmonary endothelial cell ATP depletion. *Ann Surg* 217: 48-56, 1993.
37. **Gormley K, Dong Y and Sagnella GA.** Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem J* 371: 1-14, 2003.
38. **Griese M, Gobran LI and Rooney SA.** A2 and P2 purine receptor interactions and surfactant secretion in primary cultures of type II cells. *Am J Physiol* 261: L140-L147, 1991.
39. **Grosse T, Heid I, Simaels J, Beck F, Nagel W, Van Driessche W and Dorge A.** Changes in element composition of A6 cells following hypotonic stress. *Pflugers Arch* 442: 297-303, 2001.
40. **Grygorczyk R and Hanrahan JW.** CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* 272: C1058-C1066, 1997.
41. **Guyot A and Hanrahan JW.** ATP release from human airway epithelial cells studied using a capillary cell culture system. *J Physiol* 545: 199-206, 2002.

42. **Harden TK, Boyer JL and Nicholas RA.** P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 541-579, 1995.
43. **Harf A.** Respiration. In: *Physiologie humaine*, edited by Guénard H. Paris: 1996, p. 326-374.
44. **Hausen B, Beuke M, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi AJ and Schafers HJ.** In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K⁺-EC following short and extended ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* 12: 771-779, 1997.
45. **Hazama A, Miwa A, Miyoshi T, Shimizu T and Okada Y.** ATP release from swollen or CFTR-expressing epithelial cells. *elsevier science* 93-98, 2000.
46. **Hazama A, Fan HT, Abdullaev I, Maeno E, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y and Okada Y.** Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator- augmented ATP release and Cl⁻ conductances in murine C127 cells. *J Physiol (Lond)* 523 Pt 1: 1-11, 2000.
47. **Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E and Okada Y.** Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a

- human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive Cl^- channels. *J Gen Physiol* 114: 525-533, 1999.
48. **Heffner JE.** Mechanisms Underlying Ischemia/Reperfusion Injury of the Lung. In: Pulmonary edema, edited by Matthay MA and Ingbar DH. New York: Marcel Dekker, INC., 1998, p. 379-400.
 49. **Hurwitz CG, Hu VY and Segal AS.** A mechanogated nonselective cation channel in proximal tubule that is ATP sensitive. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F93-F104, 2002.
 50. **Inglis SK, Olver RE and Wilson SM.** Differential effects of UTP and ATP on ion transport in porcine tracheal epithelium. *Br J Pharmacol* 130: 367-374, 2000.
 51. **Isakson BE, Evans WH and Boitano S.** Intercellular Ca^{2+} signaling in alveolar epithelial cells through gap junctions and by extracellular ATP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L221-L228, 2001.
 52. **Iwase N, Sasaki T, Shimura S, Yamamoto M, Suzuki S and Shirato K.** ATP-induced Cl^- secretion with suppressed Na^+ absorption in rabbit tracheal epithelium. *Respir Physiol* 107: 173-180, 1997.

53. **Jahania MS, Mullett TW, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD and Mentzer RM, Jr.** Acute allograft failure in thoracic organ transplantation. *J Card Surg* 15: 122-128, 2000.
54. **Jakab M, Fuerst J, Gschwentner M, Botta G, Garavaglia ML, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmueller S, Woell E, Chwatal S, Ritter M and Paulmichl M.** Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem* 12: 235-258, 2002.
55. **Jiang X, Ingbar DH and O'Grady SM.** Selectivity properties of a Na-dependent amino acid cotransport system in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L911-L915, 2000.
56. **Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P and Dobbs LG.** Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1966-1971, 2002.
57. **Jurkowitz-Alexander MS, Altschuld RA, Hohl CM, Johnson JD, McDonald JS, Simmons TD and Horrocks LA.** Cell swelling, blebbing, and death are dependent on ATP depletion and independent of calcium during chemical hypoxia in a glial cell line (ROC-1). *J Neurochem* 59: 344-352, 1992.

58. **Kim RD, Darling CE, Cerwenka H and Chari RS.** Hypoosmotic stress activates p38, ERK 1 and 2, and SAPK/JNK in rat hepatocytes. *J Surg Res* 90: 58-66, 2000.
59. **Kimura C, Koyama T, Oike M and Ito Y.** Hypotonic stress-induced NO production in endothelium depends on endogenous ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 736-740, 2000.
60. **Klimek T, Glanz H, Ruckes-Nilges C, Van Driessche W and Weber WM.** Nicotine-induced endocytosis of amiloride-sensitive sodium channels in human nasal epithelium. *Acta Otolaryngol* 120: 286-290, 2000.
61. **Knowles MR, Clarke LL and Boucher RC.** Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 325: 533-538, 1991.
62. **Knowles MR, Olivier K, Noone P and Boucher RC.** Pharmacologic modulation of salt and water in the airway epithelium in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: S65-S69, 1995.
63. **Koyama T, Oike M and Ito Y.** Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol* 532: 759-769, 2001.

64. **Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R and Mall M.** Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch* 440: 193-201, 2000.
65. **La Rocca RV, Stein CA, Danesi R and Myers CE.** Suramin, a novel antitumor compound. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37: 893-898, 1990.
66. **Lazarowski ER, Boucher RC and Harden TK.** Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto- nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 275: 31061-31068, 2000.
67. **Lidofsky SD.** Convergent and parallel activation of low-conductance potassium channels by calcium and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7115-7119, 1995.
68. **Liedtke CM.** Electrolyte transport in the epithelium of pulmonary segments of normal and cystic fibrosis lung. *FASEB J* 6: 3076-3084, 1992.
69. **Lossos IS, Izbicki G, Or R, Goldstein RH and Breuer R.** The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. *Life Sci* 67: 2873-2881, 2000.
70. **Lubman RL, Chao DC and Crandall ED.** Basolateral localization of Na(+)-. *Respir Physiol* 100: 15-24, 1995.

71. **Lubman RL and Crandall ED.** Polarized distribution of Na(+)-H+ antiport activity in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 266: L138-L147, 1994.
72. **Mager WH, de Boer AH, Siderius MH and Voss HP.** Cellular responses to oxidative and osmotic stress. *Cell Stress Chaperones* 5: 73-75, 2000.
73. **Mall M, Wissner A, Gonska T, Calenborn D, Kuehr J, Brandis M and Kunzelmann K.** Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na(+) absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways [In Process Citation]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 755-761, 2000.
74. **Manfredi G, Yang L, Gajewski CD and Mattiazzi M.** Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* 26: 317-326, 2002.
75. **Marino A, Rodrig Y, Metioui M, Lagneaux L, Alzola E, Fernandez M, Fogarty DJ, Matute C, Moran A and Dehaye JP.** Regulation by P2 agonists of the intracellular calcium concentration in epithelial cells freshly isolated from rat trachea. *Biochim Biophys Acta* 1439: 395-405, 1999.
76. **Maroto R and Hamill OP.** Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem* 276: 23867-23872, 2001.

77. **Mason SJ, Paradiso AM and Boucher RC.** Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br J Pharmacol* 103: 1649-1656, 1991.
78. **Matalon S and O'Brodoovich H.** Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol* 61: 627-661, 1999.
79. **Musante L, Zegarra-Moran O, Montaldo PG, Ponzoni M and Galletta LJ.** Autocrine regulation of volume-sensitive anion channels in airway epithelial cells by adenosine. *J Biol Chem* 274: 11701-11707, 1999.
80. **Nici L, Medina M and Frackelton AR.** The epidermal growth factor receptor network in type 2 pneumocytes exposed to hyperoxia in vitro. *Am J Physiol* 270: L242-L250, 1996.
81. **Niisato N and Marunaka Y.** Hyposmolality-induced enhancement of ADH action on amiloride-sensitive Isc in renal epithelial A6 cells. *Jpn J Physiol* 47: 131-137, 1997.
82. **Niisato N, Van Driessche W, Liu M and Marunaka Y.** Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na(+) transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J Membr Biol* 175: 63-77, 2000.

83. **Novick RJ, Gehman KE, Ali IS and Lee J.** Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg* 62: 302-314, 1996.
84. **O'Grady SM and Lee SY.** Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689-L700, 2003.
85. **Oelberg DG, Xu F and Shabarek F.** Sodium-coupled transport of glucose by plasma membranes of type II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta* 1194: 92-98, 1994.
86. **Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J and Morishima S.** Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532: 3-16, 2001.
87. **Paillard M.** Rein. In: *Physiologie humaine*, edited by Guénard H. Paris: 1996, p. 241-323.
88. **Pasantes-Morales H and Morales MS.** Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86: 414-427, 2000.
89. **Pilewski JM and Frizzell RA.** Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79: S215-S255, 1999.

90. **Planes C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T and Clerici C.** Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 47318-47324, 2002.
91. **Ralevic V and Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492, 1998.
92. **Ramminger SJ, Collett A, Baines DL, Murphie H, McAlroy HL, Olver RE, Inglis SK and Wilson SM.** P2Y2 receptor-mediated inhibition of ion transport in distal lung epithelial cells. *Br J Pharmacol* 128: 293-300, 1999.
93. **Reddy MM, Quinton PM, Haws C, Wine JJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Hanrahan JW, Gunderson KL and Kopito RR.** Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* 271: 1876-1879, 1996.
94. **Rehn M, Weber WM and Clauss W.** Role of the cytoskeleton in stimulation of Na⁺ channels in A6 cells by changes in osmolality. *Pflugers Arch* 436: 270-279, 1998.
95. **Reimer KA, Hill ML and Jennings RB.** Prolonged depletion of ATP because of delayed repletion of the adenine nucleotide pool following

- reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Adv Myocardiol* 4: 395-407, 1983.
96. **Rice WR, Burton FM and Fiedeldey DT.** Cloning and expression of the alveolar type II cell P_{2u}-purinergic receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 27-32, 1995.
97. **Rice WR and Singleton FM.** P_{2Y}-purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium. *Br J Pharmacol* 91: 833-838, 1987.
98. **Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N and Chou JL.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.
99. **Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA and Barr ML.** A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation* 67: 152-155, 1999.
100. **Roman RM, Feranchak AP, Salter KD, Wang Y and Fitz JG.** Endogenous ATP release regulates Cl⁻ secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells. *Am J Physiol* 276: G1391-G1400, 1999.

101. **Roman RM, Smith RL, Feranchak AP, Clayton GH, Doctor RB and Fitz JG.** ClC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G344-G353, 2001.
102. **Rozansky DJ, Wang J, Doan N, Purdy T, Faulk T, Bhargava A, Dawson K and Pearce D.** Hypotonic induction of SGK1 and Na⁺ transport in A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F105-F113, 2002.
103. **Russell JM.** Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80: 211-276, 2000.
104. **Sakmann B and Neher E.** Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46: 455-472, 1984.
105. **Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR and Guggino WB.** CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063-1073, 1995.
106. **Schwiebert EM and Kishore BK.** Extracellular nucleotide signaling along the renal epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F945-F963, 2001.

107. **Shiono T, Kodama M, Hanawa H, Fuse K, Yamamoto T and Aizawa Y.** Suppression of myocardial inflammation using suramin, a growth factor blocker. *Circ J* 66: 385-389, 2002.
108. **Simmons NL.** Stimulation of Cl⁻ secretion by exogenous ATP in cultured MDCK epithelial monolayers. *Biochim Biophys Acta* 646: 231-242, 1981.
109. **Southard JH and Belzer FO.** Organ preservation. *Annu Rev Med* 46: 235-247, 1995.
110. **Stevens A and Lowe J.** *Histologie*. Paris: 1993.
111. **Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC and Boucher RC.** CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847-850, 1995.
112. **Stutts MJ, Chinet TC, Mason SJ, Fullton JM, Clarke LL and Boucher RC.** Regulation of Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1621-1625, 1992.
113. **Stutts MJ, Fitz JG, Paradiso AM and Boucher RC.** Multiple modes of regulation of airway epithelial chloride secretion by extracellular ATP. *Am J Physiol* 267: C1442-C1451, 1994.

114. **Suzuki S, Inoue K, Sugita M, Tsubochi H, Kondo T and Fujimura S.** Effects of EP4 solution and LPD solution vs Euro-Collins solution on Na(+)/K(+)-ATPase activity in rat alveolar type II cells and human alveolar epithelial cell line A549 cells. *J Heart Lung Transplant* 19: 887-893, 2000.
115. **Taylor A, Kudlow B, Marrs K, Gruenert D, Guggino W and Schwiebert E.** Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol* 275: C1391-C1406, 1998.
116. **Tortora GJ and Grabowski SR.** *Principes d'anatomie et de physiologie.* Anjou: 1994.
117. **Van der WT, De Jonge HR and Tilly BC.** Osmotic cell swelling-induced ATP release mediates the activation of extracellular signal-regulated protein kinase (Erk)-1/2 but not the activation of osmo-sensitive anion channels. *Biochem J* 343 Pt 3: 579-586, 1999.
118. **Van der WT, Tomassen SF, Houtsmuller AB, De Jonge HR and Tilly BC.** Increased vesicle recycling in response to osmotic cell-swelling; cause and consequence of hypotonicity-provoked ATP release. *J Biol Chem* 2003.
119. **Verkman AS, Matthay MA and Song Y.** Aquaporin water channels and lung physiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L867-L879, 2000.

120. **Voelkel NF, Hoepfer M, Maloney J and Tudor RM.** Vascular endothelial growth factor in pulmonary hypertension. *Ann N Y Acad Sci* 796: 186-193, 1996.
121. **Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Hummler E and Rossier BC.** Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol* 120: 191-201, 2002.
122. **Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Pfister C, Bens M, Farman N, Courtois-Coutry N, Vandewalle A, Rossier BC and Hummler E.** Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol* 11: 828-834, 2000.
123. **Wang J, Morishima S and Okada Y.** IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C77-C84, 2003.
124. **Wang Y, Roman R, Lidofsky SD and Fitz JG.** Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12020-12025, 1996.

125. **Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE and Matthay MA.** Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 980-988, 1999.
126. **Weller NK and Karnovsky MJ.** Improved isolation of rat lung alveolar type II cells. More representative recovery and retention of cell polarity. *Am J Pathol* 122: 92-100, 1986.
127. **Widdicombe JH, Kondo M and Mochizuki H.** Regulation of airway mucosal ion transport. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 94: 56-61, 1991.
128. **Williams M and Jarvis MF.** Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* 59: 1173-1185, 2000.
129. **Wills NK and Fong P.** ClC chloride channels in epithelia: recent progress and remaining puzzles. *News Physiol Sci* 16: 161-166, 2001.
130. **Wills NK, Millinoff LP and Crowe WE.** Na⁺ channel activity in cultured renal (A6) epithelium: regulation by solution osmolarity. *J Membr Biol* 121: 79-90, 1991.
131. **Wright JR and Dobbs LG.** Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol* 53: 395-414, 1991.

132. **Yamamoto T and Suzuki Y.** Role of luminal ATP in regulating electrogenic Na(+) absorption in guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G300-G308, 2002.
133. **Zielenski J.** Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 117-133, 2000.
134. **Ziganshin AU, Ziganshina LE, King BE and Burnstock G.** Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflugers Arch* 429: 412-418, 1995.

