

Université de Montréal

**Le rôle des canaux potassiques dans la résolution des paramètres du
syndrome de détresse respiratoire aiguë**

par Jasmine Chebli

Département de physiologie moléculaire et intégrative, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès science
en Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative, option physiologie et biophysique
moléculaires

Août 2016

© Jasmine Chebli, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle des canaux potassiques dans la résolution des paramètres du syndrome de
détresse respiratoire aiguë**

présenté par :

Jasmine Chebli

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Réjean Couture, président-rapporteur

Dre. Emmanuelle Brochiero, directrice de recherche

Dr. Emmanuel Charbonney, membre de jury

RÉSUMÉ

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est caractérisé par des dommages au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, résultant en la formation d'un œdème pulmonaire et une réponse inflammatoire exacerbée. Sans résolution rapide de ces paramètres, le syndrome progresse vers le développement de fibrose menant à l'insuffisance respiratoire. Or, il a été établi que la réparation de l'épithélium alvéolaire est une étape cruciale pour la résolution du SDRA. Une meilleure compréhension des mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire est donc nécessaire afin de proposer de nouvelles thérapies pour le SDRA, pour lequel aucun traitement efficace n'existe. Il a été montré que les mécanismes de réparation sont régulés par des protéines membranaires, non seulement par les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines, mais également par les canaux ioniques, en particulier les canaux potassiques.

L'objectif principal de cette étude était donc de caractériser l'impact de la modulation des canaux potassiques KCa3.1 et KvLQT1 dans la résolution du SDRA.

Dans un premier temps, nos résultats ont montré le rôle coopératif du canal potassique KCa3.1, de la matrice extracellulaire et de l'intégrine- β 1 dans les processus de réparation de l'épithélium alvéolaire *in vitro*. Nous avons montré que la matrice de fibronectine et le KCa3.1 étaient impliqués dans la migration et dans la réparation de monocouches de cellules alvéolaires de cultures primaires de rat.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact de la modulation du canal potassique KvLQT1 dans certains aspects physiopathologiques du SDRA à l'aide de modèles *in vivo*. Nous avons montré que KvLQT1 n'était pas seulement impliqué dans les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire, mais également dans la résorption de l'œdème pulmonaire et la résolution de la réponse inflammatoire.

Nos résultats démontrent que les canaux potassiques, tels que KCa3.1 et KvLQT1, pourraient être identifiés en tant que cibles thérapeutiques potentielles pour le SDRA.

Mots-clés : Syndrome de détresse respiratoire aiguë, épithélium alvéolaire, canaux potassiques, KCa3.1, KvLQT1, réparation épithéliale, œdème pulmonaire, inflammation.

ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by alveolar-capillary barrier damage, resulting in the formation of pulmonary oedema and an exacerbated inflammatory response. Without rapid recovery of these parameters, there is a gradual development of fibrosis, leading to respiratory failure. It has been established that alveolar regeneration is a critical step for the resolution of ARDS. A better understanding of alveolar epithelial repair mechanisms is hence necessary to identify new therapies for ARDS, for which no effective treatment exist. It has been shown that repair mechanisms are regulated by membrane proteins, not only by growth factor receptors and integrins, but also by ion channels, in particular potassium channels.

Therefore, the main objective of this study was to characterize the impact of KCa3.1 and KvLQT1 potassium channels modulation in the resolution of ARDS.

First, our results have shown the cooperative role of the potassium channel KCa3.1, the extracellular matrix and the β 1-integrin in alveolar epithelial repair processes *in vitro*.

We have shown that the fibronectin matrix and KCa3.1 are involved in the migration and repair of primary cultures of rat alveolar cell monolayers. Our data also revealed a putative relationship between Kca3.1 and the β 1-integrin.

Second, we studied the impact of KvLQT1 potassium channel modulation on ARDS pathophysiological aspects with *in vivo* models. We showed that KvLQT1 was not only involved in alveolar epithelial repair, but also in the resolution of pulmonary oedema and inflammatory response.

Taken together, our data demonstrate that potassium channels, such as KCa3.1 and KvLQT1, may be identified as potential therapeutic targets for the resolution of ARDS.

Keywords Acute respiratory distress syndrome, alveolar epithelium, potassium channels, KCa3.1, KvLQT1, epithelial repair, pulmonary edema, inflammation

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xix
Chapitre 1 – Introduction.....	0
1.1 Anatomie du système respiratoire.....	1
1.1.1 Zone de conduction.....	3
1.1.2 Zone respiratoire.....	4
1.1.2.a Les cellules alvéolaires de type I (ATI).....	5
1.1.2.b Les cellules alvéolaires de type II (ATII).....	5
1.2 Transports ioniques et des fluides alvéolaires.....	8
1.2.1 Voie paracellulaire.....	9
1.2.2 Voie transcellulaire.....	9
1.2.3 Canaux et transporteurs au niveau de l'épithélium alvéolaire.....	10
1.2.3.1 Canal sodique ENaC (<i>epithelial sodium channel</i>).....	11
1.2.3.2 Les canaux potassiques de l'épithélium alvéolaire.....	14
1.2.3.2.a Canal potassique KvLQT1.....	15
1.2.3.2.b Canal potassique KCa3.1.....	18
1.3 Physiologie de l'épithélium alvéolaire.....	19
1.3.1 Réponse immunitaire.....	19
1.3.2 Réponse inflammatoire.....	20
1.3.3 Les mécanismes physiologiques de réparation de l'épithélium alvéolaire..	21
1.3.3.1 Causes et conséquences des lésions épithéliales.....	21
1.3.3.2 Processus de réparation épithéliale.....	22
1.3.3.3 Conditions pathologiques de remodelage épithélial.....	25
1.4 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë.....	25
1.4.1 Causes du SDRA.....	26
1.4.2 Phases du SDRA.....	27
1.4.2.1 Phase exsudative-aiguë.....	28

1.4.2.2 Phase proliférative-fibrotique.....	30
1.4.3 Traitements du SDRA.....	31
1.5 Évidences de l'implication des canaux potassiques dans les mécanismes de réparation de l'épithélium.....	34
1.6 Évidences de l'implication des canaux potassiques dans la réponse inflammatoire.....	35
Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs.....	36
2.1 Le canal potassique KCa3.1 et l'intégrine-β1 dans la réparation épithéliale alvéolaire	37
2.1.a Hypothèse.....	38
2.1.b Objectif	38
2.2 Le canal potassique KvLQT1 dans les mécanismes de résolution des processus physiopathologiques du SDRA	39
2.2.a Hypothèse.....	39
2.2.b Objectifs.....	39
Chapitre 3 – Matériel et méthodes.....	40
3.1 Déclarations éthiques.....	41
3.2 Élevage murin.....	41
3.3 Modèle d'induction d'un œdème pulmonaire <i>in vivo</i> par la thiourée.....	43
3.4 Mesure de l'indice de l'œdème pulmonaire (ratio <i>Wet/Dry</i>).....	43
3.5 Modèle d'induction de SDRA <i>in vivo</i> par la bléomycine.....	44
3.6 Lavages broncho-alvéolaires	45
3.7 Compte total et différentiel de cellules de BAL	45
3.8 Dosage de cytokines-chimiokines	46
3.9 Inclusion de poumons en paraffine.....	46
3.10 Histologie des sections de poumons.....	47
3.11 Immunofluorescence	48
3.12 Isolation et culture primaire des cellules alvéolaires murines de type II.....	49
3.13 Transfections <i>in vitro</i> de <i>small interfering</i> (si)RNA	50
3.14 Réactions en chaîne par polymérase (PCR)	51
3.15 Réactions en chaîne par polymérase quantitative (qPCR).....	52
3.16 Migration cellulaire	53

3.17 Prolifération cellulaire	54
3.18 Réparation de plaies mécaniques	54
3.19 Extraction et dosage protéiques	55
3.20 Co-immunoprécipitation	56
3.21 Immunobuvardage (type <i>Western Blot</i>)	57
3.22 Statistiques	59
Chapitre 4 – Résultats	60
4.1 Rôle du canal KCa3.1 dans les mécanismes de régulation de la réparation de l'épithélium alvéolaire	61
4.1.1 Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KCa3.1 sur la réparation épithéliale	61
4.1.2 Extinction du canal KCa3.1 par transfection de siRNA spécifiques ...	63
4.1.3 Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire	63
4.1.3.a Vitesse de réparation de la monocouche	63
4.1.3.b Prolifération cellulaire	65
4.1.3.c Migration cellulaire	66
4.1.4 Relation entre le canal KCa3.1, la matrice extracellulaire et l'intégrine- β 1	67
4.1.4.a Immunolocalisation	67
4.1.4.b Co-immunoprécipitation	68
4.1.5 Relation entre le canal KCa3.1 et le récepteur EGFR	69
4.2 Rôle du canal KvLQT1 dans les processus physiologiques du SDRA	71
4.2.1 Modèle d'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin	71
4.2.1.1 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin	71
4.2.1.1.1 Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	72
4.2.1.1.2 Inhibition de l'activité du canal KvLQT1	73
4.2.1.1.2.a Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KvLQT1	73
4.2.1.1.2.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	75

4.2.1.2 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'expression génomique de canaux ioniques dans un modèle d'œdème pulmonaire induit par la thiourée <i>in vivo</i>	76
4.2.1.2.a Étude de l'expression des ARNm codant pour l' α -ENaC.....	77
4.2.1.2.b Étude de l'expression des ARNm codant pour la pompe Na ⁺ /K ⁺ /ATPase.....	78
4.2.1.3 Analyse histologique des poumons de souris avec un œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin	79
4.2.2 Modèle de SDRA induit par la bléomycine dans un modèle murin	80
4.2.2.1 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la bléomycine dans le modèle murin de SDRA.....	80
4.2.2.1.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	80
4.2.2.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	82
4.2.2.2 Impact de la modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur la réparation épithéliale dans un modèle <i>in vitro</i>	83
4.2.2.2.1 Inhibition du canal KvLQT1	83
4.2.2.2.1.a Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KvLQT1	84
4.2.2.2.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	85
4.2.2.2.2 Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	86
4.2.2.3 Analyse histologique des poumons de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine	87
4.2.2.3.1 Modulation du canal KvLQT1 sur la structure histologique des poumons de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine	88
4.2.2.3.1.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	88
4.2.2.3.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	89
4.2.2.3.2 Immunofluorescence de la pro-SP-C sur coupes de poumons de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	90
4.2.2.4 Analyse de la réponse inflammatoire induite par la bléomycine dans le modèle murin de SDRA.....	91
4.2.2.4.1 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'infiltration cellulaire dans les BAL de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	91
4.2.2.4.1.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	92

4.2.2.4.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	93
4.2.2.4.2 Impact de la modulation du canal KvLQT1 sur le comptage différentiel des cellules immunitaires infiltrées dans les BAL de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	94
4.2.2.4.2.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	95
4.2.2.4.2.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	96
4.2.2.4.3 Modulation du canal KvLQT1 sur la sécrétion de cytokines-chimiokines dans les BAL de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	97
4.2.2.4.3.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1	97
4.2.2.4.3.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO	99
<i>Chapitre 5 – Discussion et perspectives.....</i>	100
BIBLIOGRAPHIE	118
ANNEXE.....	131

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du système respiratoire.....	1
Figure 2. Structure de l'épithélium du système respiratoire en fonction des zones des voies aériennes et alvéoles.....	2
Figure 3. Épithélium de la zone de conduction.....	3
Figure 4. Structure d'une alvéole saine.....	4
Figure 5. Production du surfactant alvéolaire par les cellules ATII.....	7
Figure 6. Transports ioniques et liquidiens au niveau des cellules épithéliales de l'épithélium alvéolaire.....	10
Figure 7. Représentation schématique de la topologie transmembranaire du canal sodique ENaC.....	12
Figure 8. Arbre phylogénique des canaux K ⁺ de l'épithélium respiratoire.....	14
Figure 9. Représentation schématique de la topologie transmembranaire du canal voltage-dépendant KvLQT1.....	16
Figure 10. Représentation schématique du transport des ions potassiques et sodiques au niveau des cellules ATII de l'épithélium alvéolaire.....	17
Figure 11. Représentation schématique de la topologie transmembranaire du canal K ⁺ activé par le calcium KvLQT1.....	18
Figure 12. Processus de réparation de l'épithélium alvéolaire.....	22
Figure 13. Processus de migration cellulaire.....	23
Figure 14. Boucle autocrine d'activation d'EGFR favorisant les mécanismes de réparation épithéliale.....	24
Figure 15. Causes directes et indirectes du syndrome de détresse respiratoire aiguë.....	26
Figure 16. Évolution du syndrome de détresse respiratoire aiguë en fonction du temps.....	28
Figure 18. Structure d'une alvéole en condition pathologique lors de la phase proliférative-fibrotique du SDRA.....	31
Figure 19. Génotypage des souris.....	42
Figure 20. Mesure du courant potassique KvLQT1 basolatéral sensible au chromanol.....	42
Figure 21. Ligne du temps des expériences de mesure de l'indice de l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin <i>in vivo</i>	44
Figure 22. Ligne du temps du modèle de SDRA induit par la bléomycine dans un modèle murin <i>in vivo</i>	44
Figure 23. Comptage différentiel des cellules immunitaires.....	45
Figure 24. Ligne du temps des expériences sur cellules épithéliales alvéolaires de rat.....	54

Figure 25. Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KCa3.1 sur la réparation des plaies des monocouches des cellules ATII de rats stimulée par la fibronectine.....	62
Figure 26. Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur la réparation des monocouches de cellules ATII de rats.....	64
Figure 27. Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur la prolifération cellulaire des ATII de rats.....	65
Figure 28. Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur la migration cellulaire en 3-dimensions des ATII de rats.....	66
Figure 29. Co-localisation du canal KCa3.1 et de l'intégrine- β 1 exprimés dans les cellules ATII de rats.....	67
Figure 30. Co-immunoprécipitations du canal KCa3.1 et de l'intégrine- β 1 exprimés dans les cellules ATII de rats.....	68
Figure 31. Co-immunoprécipitation de l'EGFR et du canal KCa3.1 exprimés dans les ATII de rats.....	69
Figure 32. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans le modèle <i>in vivo</i>	72
Figure 33. Effet de l'inhibition pharmacologique du KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans le modèle <i>in vivo</i>	74
Figure 34. Effet de l'extinction du KvLQT1 par KO sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans le modèle <i>in vivo</i>	75
Figure 35. Effet de la thiourée et de la modulation du canal KvLQT1 sur l'expression des ARNm codant pour α -ENaC <i>in vivo</i>	77
Figure 36. Effet de la thiourée et de la modulation du canal KvLQT1 sur l'expression des ARNm codant pour la pompe Na ⁺ /K ⁺ /ATPase <i>in vivo</i>	78
Figure 37. Effet de la thiourée sur la structure histologique des poumons de souris.....	79
Figure 38. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la bléomycine dans le modèle <i>in vivo</i>	81
Figure 39. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur l'œdème pulmonaire induit par la bléomycine dans le modèle <i>in vivo</i>	82
Figure 40. Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KvLQT1 sur la réparation des monocouches lésées des cellules ATII de souris.....	84
Figure 41. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur la réparation des monocouches lésées des cellules ATII de souris.....	85

Figure 42. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur la réparation des monocouches lésées des cellules ATII de rats en présence de bléomycine	86
Figure 43. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur la structure histologique des poumons de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine	88
Figure 44. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur la structure histologique des poumons de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	89
Figure 45. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur le marquage de la pro-SP-C sur des sections de poumons de souris dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	90
Figure 46. Effet de l'activation du canal KvLQT1 sur le nombre total de cellules infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	92
Figure 47. Effet de la bléomycine chez les souris déficientes pour le canal KvLQT1 par KO sur le nombre total de cellules infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine	93
Figure 48. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur le comptage différentiel des cellules immunitaires infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	95
Figure 49. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur le comptage différentiel des cellules immunitaires infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	96
Figure 50. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur les cytokines et les chimiokines sécrétées au niveau alvéolaire dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine.....	98
Figure 51. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur les cytokines et les chimiokines sécrétées au niveau alvéolaire dans le modèle <i>in vivo</i> de SDRA induit par la bléomycine ...	99

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I. Série de bains pour tissus frais avant inclusion en paraffine.....</u>	46
<u>Tableau II. Amorces des gènes utilisées pour la PCR.....</u>	51
<u>Tableau III. Amorces des gènes utilisées pour la qPCR.....</u>	53
<u>Tableau IV. Anticorps utilisés pour les immunoprécipitations.....</u>	56
<u>Tableau V. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunobuvardages.....</u>	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1-EBIO : 1-éthyl-2-benzimidazolinone

ACK : *Ammonium-chloride-potassium*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMP : Adénosine monophosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AQP : Aquaporine

ARN: Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATI : Cellule alvéolaire de type I (*alveolar epithelial type I cell*)

ATII : Cellule alvéolaire de type II (*alveolar epithelial type II cell*)

ATP : Adénosine triphosphates

BAL : Lavage broncho-alvéolaire (*bronchoalveolar lavage*)

BSA : Albumine de sérum bovin (*bovin serum albumin*)

Ca²⁺ : Ion calcique

CCPA : Conseil Canadien de Protection des Animaux

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CIPA : Comité Institutionnel de la Protection des Animaux

Cl⁻ : Ion chlorure

CNG : *Cyclic nucleotide-gated sodium channel*

CO₂ : Dioxyde de carbone

COOH⁻ : Acide carboxylique

d : Jour (*diem*)

D : Sec (*dry*)

Da : Dalton

DAD : *Diffuse alveolar damage*

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGF : Facteur de croissance épidermique (*epithelial growth factor*)

EGFR : Récepteur au facteur de croissance épidermique (*epithelial growth factor receptor*)

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ENaC : *Epithelial sodium channel*

FBS : Sérum de veau fœtal (*fetal bovine serum*)

Fn : Fibronectine

H₂O : Eau

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

HRP : Peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*)

HSC : *Highly selective cation sodium channel*

i.n : Intranasal

i.p : Intrapéritonéal

IgG : Immunoglobuline G

IL- : Interleukine

INF : Interféron

IP : Immunoprécipitation

IRIC : Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie de l'Université de Montréal

IRM : Imagerie par résonance magnétique

Isc : Courant en court-circuit (*short-circuit current*)

JLNS : Syndrome de Jervell et Lange–Nielsen (*Jervell et Lange–Nielsen syndrome*)

K⁺ : Ion potassique

KC : Chimioattractant de kératinocyte (*keratinocyte chemoattractant*)

KCa : Canal potassique activé par le calcium

KHCO₃ : Bicarbonate de potassium

KO : Déficiante (*knock-out*)

Kv : Canal potassique voltage-dépendant

LQTS : Syndrome du QT long (*long QT syndrome*)

MCP-1 : Protéine-1 chimioattractante de monocyte (*Monocyte chemoattractant protein-1*)

MEC : Matrice extracellulaire
MEM : Milieu essentiel minimum
Na⁺ : Ion sodique
Na⁺/K⁺ATPase : Pompe sodium potassium
NaCl : Chlorure de sodium
NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium
NH₂⁺ : Amine
NH₄Cl : Chlorure d'ammonium
NIH : *National Institutes of Health*
NSC : *Nonselective cation sodium channel*
O₂ : Oxygène
pb : Paire de bases
PBS : Tampon phosphate salin (*phosphate-buffered saline*)
PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*)
pH : Potentiel hydrogène
PKA : Protéine kinase A
qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative (quantitative *polymerase chain reaction*)
R-L3 : *(3-R)-1,3-dihydro-5-(2-fluorophenyl)-3-(1H-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one*
rpm : Tour par minute (*rotation per minute*)
RT-PCR : Transcription inverse par réaction en chaîne par polymérase (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)
SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SDS : Dodécylsulfate de sodium (*sodium dodecyl sulfate*)
SEM : Erreur standard (*standard error of the mean*)
Septra : Sulfaméthoxazole et triméthoprim
siRNA : *Small interfering RNA*
SP- : Protéine associée au surfactant (*surfactant associated proteins*)
STM : Segment transmembranaire

T : Temps

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

Tris : Tris hydrochloride

Tris-HCl : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

U : Unité

W : Humide (*wet*)

W/D : Humide/sec (*Wet/Dry*)

WT : Sauvage (*Wild type*)

À Robert «Paddy» McNeil

&

Nancy McNeil.

La force et la résilience.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Emmanuel Charbonney ainsi que le Dr Réjean Couture d'avoir accepté de faire partie de mon jury pour l'examen de mon mémoire.

Je remercie également le Dre Emmanuelle Brochiero pour l'opportunité d'avoir réalisé ma maîtrise au sein de son laboratoire. Merci à Anik, Alban et Mélissa, les complices de ce projet, ainsi qu'à Émilie, Manon et Damien. Ces pages représentent un accomplissement auquel tous ont contribué, chacun en ajoutant sa propre saveur. À toute l'équipe, je vous souhaite de belles et hautes montagnes; vous m'avez certes aidée à gravir celle-ci. Merci de m'avoir accueillie au R08-200A, je vous laisse un mot du B 612 :

« -Les géographies, dit le géographe sont des livres les plus précieux de tous les livres. Elles ne se démodent jamais. Il est très rare qu'une montagne change de place. Il est très rare qu'un océan se vide de son eau. Nous écrivons des choses éternelles.

-Mais les volcans éteints peuvent se réveiller, interrompit le petit prince. [...]

-Que les volcans soient éteints ou soient éveillés, ça revient au même pour nous autres, dit le géographe. Ce qui compte pour nous, c'est la montagne. Elle ne change pas. »

Antoine de Saint-Exupéry (1943). *Le Petit Prince*.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Anatomie du système respiratoire

Le système respiratoire est le lieu des échanges gazeux essentiels au fonctionnement du corps humain, soit l'absorption d'oxygène (O_2) et l'élimination de dioxyde de carbone (CO_2). L'air inspiré par le nez ou la bouche traverse le pharynx et le larynx avant de se retrouver dans la trachée qui se divise ensuite en bronches. L'air poursuit son chemin par l'arbre bronchique jusqu'à la partie la plus distale composée des bronchioles et des alvéoles. Le système respiratoire peut se diviser en deux parties, soit l'appareil supérieur et inférieur (**Fig.1**)¹.

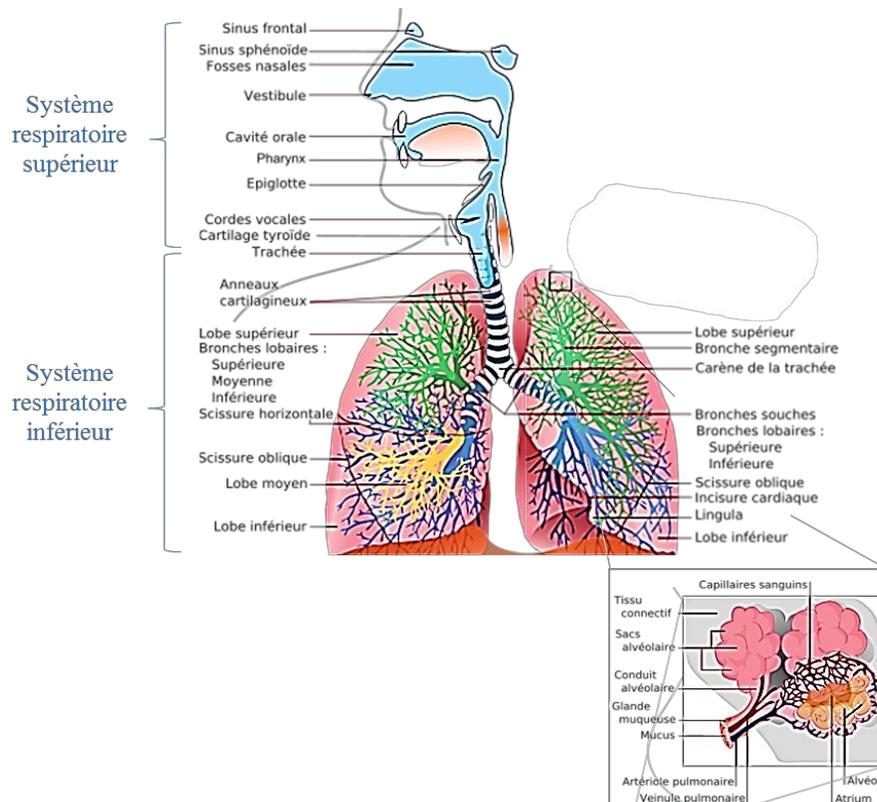


Figure 1. Anatomie du système respiratoire

Schématisation des différentes parties du système respiratoire supérieur et inférieur humain.

(Modifié de LadyofHats et tiré de Sobotta *et al.*, 1997 et de Drake *et al.*, 2010)^{2,3}.

Systèmes respiratoires supérieur et inférieur

Le système respiratoire supérieur est composé des voies aériennes extra-pulmonaires regroupant les fosses nasales, le pharynx, le larynx, la trachée et les bronches souches ¹. Le système respiratoire inférieur est quant à lui composé de voies intra-pulmonaires comprenant les bronches principales, lobaires (secondaires) et segmentaires (tertiaires) ainsi que les bronchioles et alvéoles.

Histologie de l'épithélium du système respiratoire inférieur

Les types cellulaires constituant l'épithélium varient le long de l'appareil respiratoire afin de remplir les fonctions spécifiques à chaque portion (**Fig.2**). L'appareil respiratoire inférieur peut être subdivisé selon sa fonctionnalité, soit en zone de conduction ou en zone respiratoire ¹.

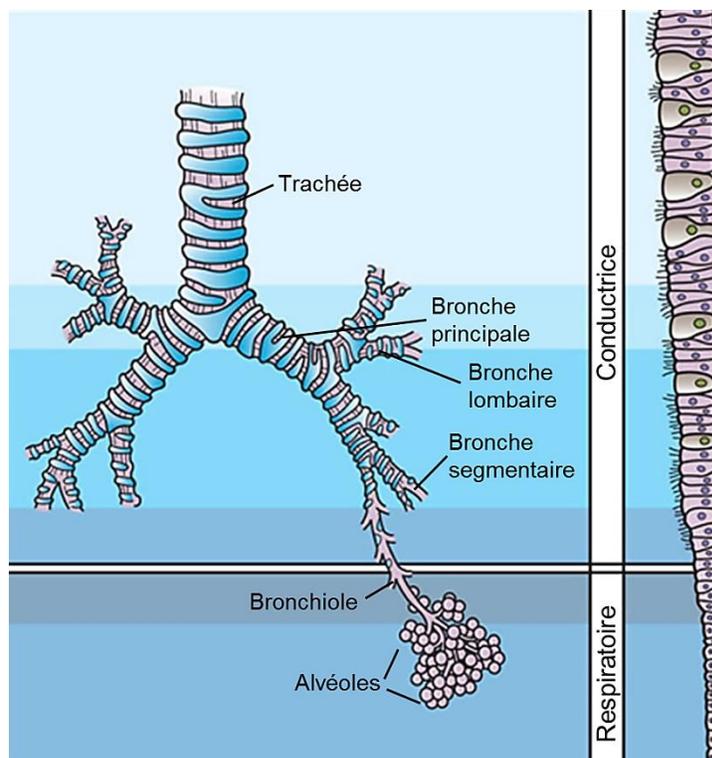


Figure 2. Structure de l'épithélium du système respiratoire en fonction des zones des voies aériennes et alvéoles

Schématisation de l'évolution de la structure de l'épithélium de la zone conductrice du système respiratoire, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales, et de la zone respiratoire, des bronchioles respiratoires aux alvéoles. (Repéré et modifié de <http://open.umich.edu/education/med/resources/second-look-series/materials>).

1.1.1 Zone de conduction

Se propageant des cavités nasales jusqu'aux bronches principales, la zone de conduction achemine et humidifie l'air vers la portion distale du système respiratoire inférieur. Au niveau proximal, l'épithélium pseudostratifié (trachéobronchique) est composé de cellules basales qui maintiennent l'architecture du tissu épithélial ¹ et de cellules sécrétrices de mucus qui permettent d'emprisonner les bactéries, poussières ou autres agents irritants inhalés ¹. Des cellules ciliées sont également trouvées qui, de par le battement synchronisé et régulier de leurs cils, permettent de déplacer le mucus produit par les cellules sécrétrices et glandulaires vers le système digestif ainsi que des cellules club qui sont des cellules sécrétrices non-ciliées ¹ (**Fig.3**). Le rôle principal de la zone de conduction est de purifier l'air s'acheminant vers la partie distale des poumons ; les échanges gazeux n'ont pas lieu à ce niveau anatomique.

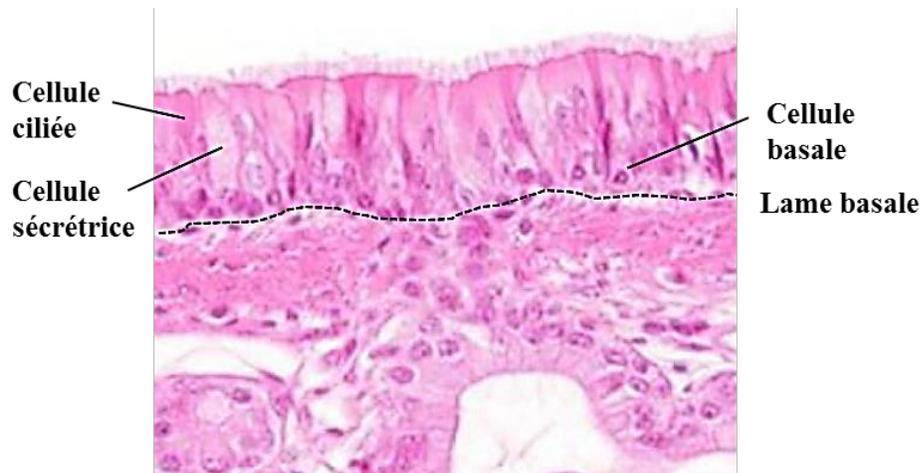


Figure 3. Épithélium de la zone de conduction

Photographie par microscopie optique d'une coupe histologique d'un épithélium bronchique coloré à l'hématoxyline-éosine représentant les différents types cellulaires, soit les cellules ciliées, sécrétrices et basales ainsi que la lame basale (pointillés). (Modifié de Losa et Chanson, 2015) ⁴.

1.1.2 Zone respiratoire

La zone respiratoire, composée des bronchioles respiratoires et alvéoles, est le site des échanges gazeux entre le système respiratoire et la circulation sanguine par le biais des capillaires alvéolaires. Les poumons sont constitués d'environ 300 millions d'alvéoles et chacune d'elles peut être associée à plus de 1000 capillaires ¹. Les alvéoles occupent la plus grosse portion de l'appareil respiratoire, soit environ 90% ⁵ et c'est la partie du corps humain qui est la plus en contact avec l'environnement extérieur, soit environ 120 m² ⁶.

L'épithélium respiratoire, par rapport à celui des voies aériennes, est plus mince et prismatique, favorisant ainsi les échanges gazeux. Les alvéoles sont majoritairement composées de deux types de cellules épithéliales alvéolaires, les ATI et ATII (*alveolar epithelial type I, II cells*), formant une couche cellulaire avec des jonctions serrées (**Fig.4**) et des macrophages résidents y sont aussi retrouvés ⁷.

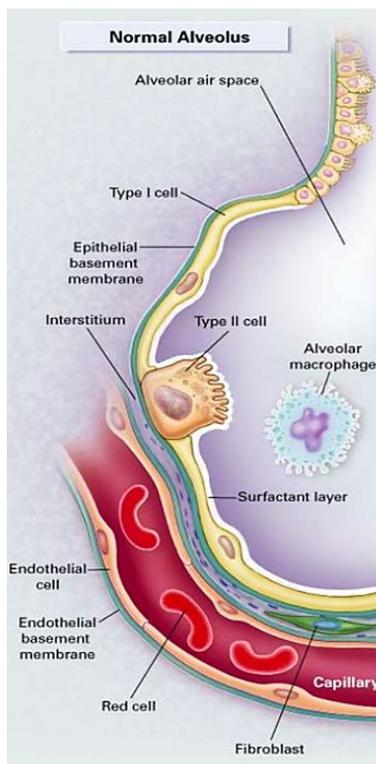


Figure 4. Structure d'une alvéole saine

Schématisation des différentes cellules et composantes retrouvées au niveau alvéolaire (*alveolar air space*) et endothélial : la membrane basale épithéliale (*epithelial basement membrane*), les cellules alvéolaires ATI et ATII (*type I* et *type II cell*), les macrophages alvéolaires (*alveolar macrophages*), la couche de surfactant alvéolaire (*surfactant layer*), les fibroblastes (*fibroblast*), les capillaires (*capillary*), la membrane basale endothéliale (*endothelial basement membrane*), les cellules endothéliales (*endothelial cell*) et les globules rouges (*red cell*). (Modifié de Ware et Matthay, 2000) ⁸.

1.1.2.a Les cellules alvéolaires de type I (ATI)

Les cellules alvéolaires de type I (ATI) recouvrent la plus grande portion des alvéoles. En effet, même si ce ne sont pas les cellules les plus nombreuses, ces cellules squameuses de forme allongée et aplatie (50 à 100 μm de diamètre) recouvrent approximativement 96% de l'espace alvéolaire ^{9,10}.

Fonctions des cellules alvéolaires de type I (ATI)

Les ATI constituent, avec les ATII, la barrière épithéliale étanche séparant l'air contenu dans les alvéoles des vaisseaux sanguins grâce aux jonctions serrées qu'elles forment ¹¹. Cette barrière empêche l'intrusion dans l'organisme de toxines, particules ou microorganismes inhalés. En plus de participer aux différents échanges gazeux, les ATI participent aussi à l'homéostasie des transports liquidiens et ioniques grâce aux canaux et transporteurs ioniques qu'elles expriment (section 1.2) ^{12,13}.

1.1.2.b Les cellules alvéolaires de type II (ATII)

L'épithélium alvéolaire est recouvert à 4% par des cellules alvéolaires de type II. Celles-ci sont certes plus petites en surface que les ATI, dû à leur forme cuboïde, mais elles sont plus nombreuses et forment plus de 60% des cellules alvéolaires ¹⁴.

Fonctions des cellules alvéolaires de type II (ATII)

Les ATII sont dites progénitrices ; suite à une agression ou lésion de l'épithélium alvéolaire, elles sont impliquées dans les différents mécanismes de réparation ¹⁵. En effet,

contrairement aux ATI, elles sont capables de plasticité cellulaire, soit de perdre leur phénotype, de proliférer, puis de se redifférencier en cellules ATI ou ATII. L'intégrité structurelle et fonctionnelle de la zone respiratoire repose majoritairement sur l'intégrité même des ATII. Une anomalie ou dysfonctionnement de leur fonction ou de leur structure peut avoir de graves conséquences, comme une mauvaise régénération de l'épithélium alvéolaire ou l'apparition de fibrose ^{16,17}.

Tout comme les cellules ATI, la polarité et la présence de plusieurs canaux et transporteurs ioniques permettent aux ATII de participer activement aux transports ioniques et liquidiens ¹⁸.

Une autre fonction de ces cellules est la participation aux mécanismes de défenses de l'environnement alvéolaire. En effet, les ATII sont impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire *via* la signalisation et la sécrétion de cytokines et de chimiokines (section 1.3). Finalement, elles sécrètent le surfactant alvéolaire, responsable de la stabilité alvéolaire ^{18,19,20,21,22}.

Surfactant alvéolaire

Le surfactant est une substance composée de lipoprotéines sécrétée par les corps lamellaires des cellules ATII ¹⁸. Il forme une fine couche de liquide (4nm) qui recouvre la totalité de la surface de l'épithélium alvéolaire (**Fig.5**) ^{23,24}. Le surfactant est essentiel pour le développement des poumons et pour le maintien de leur fonction. En effet, il prévient l'affaissement des alvéoles (atélectasie) lors de l'expiration et facilite leur expansion au cours de l'inspiration en réduisant la tension de surface existant à l'interface air-liquide au niveau de l'épithélium alvéolaire ¹. Le surfactant a aussi un rôle dans la régulation de la

réponse inflammatoire, dans la défense contre les agents oxydants ou infectieux ⁶ et dans la réparation tissulaire ^{23,15}.

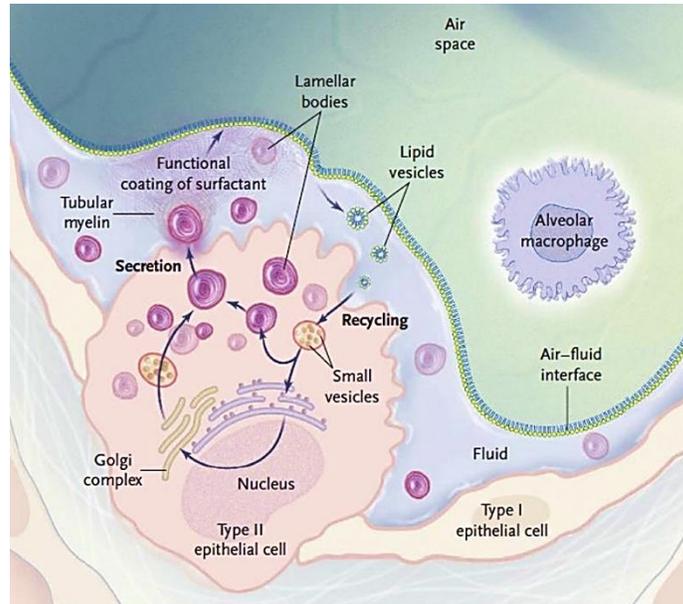


Figure 5. Production du surfactant alvéolaire par les cellules ATII

Les ATII (*type II epithelial cell*) sont responsables de la production du surfactant qui tapisse la paroi externe de l'épithélium alvéolaire (*functional coating of surfactant*) via leur appareil de Golgi (*Golgi complex*) et les corps lamellaires (*lamellar bodies*). Espace alvéolaire : *air space*, vésicules lipidiques : *lipid vesicles*, macrophage alvéolaire : *alveolar macrophage*, interface air-liquide : *air-liquid interface*, fluide : *fluid*, cellule alvéolaire de type I (ATI) : *type I epithelial cell*, noyau : *nucleus*, petites vésicules : *small vesicles*, recyclage : *recycling*, sécrétion : *secretion*, tubules de myéline : *tubular myelin* (Modifié de Raghavendran *et al.*, 2011) ²⁵.

Le surfactant est formé de glycérophospholipides, de cholestérol et de protéines ¹⁸. La concentration en protéines du surfactant est cruciale pour sa stabilité. Quatre protéines associées au surfactant (*surfactant associated proteins*, SP) ont été identifiées: SP-A, SP-

B, SP-C et SP-D, toutes produites par les granules de sécrétion des corps lamellaires des ATII et ayant des fonctions spécifiques ²⁶.

La SP-A aide à maintenir les réserves de surfactant au niveau intra et extracellulaire et occupe aussi un rôle dans les mécanismes de défenses ^{27,28}. Les SP-B et SP-C participent majoritairement à la prévention de l'atélectasie des alvéoles. La SP-B joue également un rôle dans la régulation de la SP-C et a aussi des propriétés anti-inflammatoires ²⁸. La SP-D interagit directement avec les pathogènes, comme le virus A de l'influenza et la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, lui conférant un rôle dans les mécanismes de défense ²⁷.

Une déficience au niveau de la sécrétion des protéines de surfactant peut occasionner des conditions pathologiques sévères. Par exemple, une absence complète de production de la SP-B peut causer le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né, pouvant mener à l'insuffisance respiratoire ²⁸. Certaines conditions pathologiques, telles que l'inflammation, le remodelage chronique des structures alvéolaires ainsi que les pneumonies idiopathiques interstitielles peuvent résulter d'une déficience en production de SP-C ^{6,29}. Les niveaux faibles de SP-C ont aussi pu être notés dans des lavages broncho-alvéolaires (*bronchoalveolar lavages*, BAL) de patients souffrant de maladies pulmonaires dont le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ²⁵. Une défaillance de l'activité du surfactant et une altération dans sa composition peuvent affecter les fonctions pulmonaires des patients, notamment par une baisse de la compliance pulmonaire ²⁵.

1.2 Transports ioniques et des fluides alvéolaires

En plus de participer aux échanges gazeux, l'épithélium alvéolaire participe activement à la régulation de l'homéostasie ionique et liquidienne en contrôlant les transports des ions

et des fluides. Au niveau alvéolaire, ces transports se font par diffusion de la voie paracellulaire et par voie transcellulaire impliquant des protéines de transport. Ceci permet de créer un gradient ionique entre l'espace alvéolaire et interstitiel et ainsi de contrôler la réabsorption de liquide. Hormis la mince couche liquidienne que forme le surfactant, l'espace alvéolaire se doit d'être pratiquement exempt de liquide ou en mesure de l'éliminer. En effet, chez les patients atteints de SDRA, un bon indice de clairance des fluides alvéolaires est souvent signe d'un pronostic favorable ³⁰.

1.2.1 Voie paracellulaire

Les jonctions serrées que forment les cellules alvéolaires ATI et ATII préservent une étanchéité entre l'espace alvéolaire et l'espace interstitiel. Ces jonctions restent toutefois perméables aux ions Na^+ , Cl^- , K^+ ainsi qu'aux molécules d'eau ³¹. Ce transport ionique et liquidien par voie paracellulaire se fait par voie de diffusion passive, suivant le gradient ionique retrouvé entre l'espace alvéolaire et interstitiel ³².

1.2.2 Voie transcellulaire

L'homéostasie ionique et liquidienne est aussi orchestrée par du transport actif et passif au travers de la barrière alvéolo-capillaire. La voie transcellulaire implique plusieurs types de protéines spécialisées dans le transport des ions et qui sont exprimées à la membrane apicale et basolatérale des ATI et ATII. Ces protéines de transports comprennent la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement les ions contre leur gradient, ainsi que les co-transporteurs qui permettent le transport dit secondairement actif des ions, suivant le gradient électrochimique créé par la pompe

$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ³². Les canaux et les transporteurs exprimés aux membranes des cellules épithéliales sont sélectifs pour certains ions et/ou molécules, permettant ainsi les échanges d'ions Cl^- , Na^+ , K^+ et de molécule d'eau ³¹ (**Fig6**).

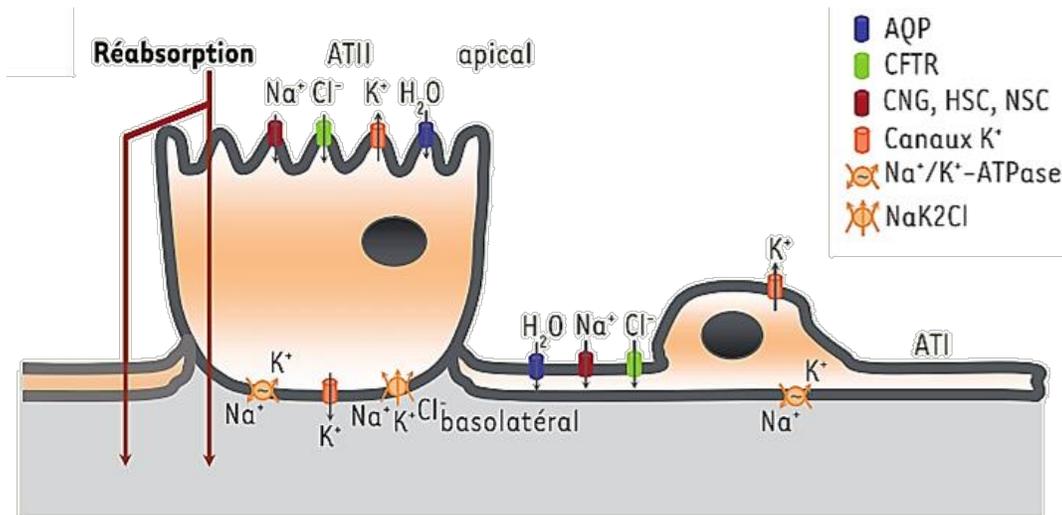


Figure 6. Transports ioniques et liquidiens au niveau des cellules épithéliales de l'épithélium alvéolaire

Schématisation des transports ionique et liquidien, des canaux et co-transporteurs des cellules ATI et ATII. Au niveau de la membrane apicale, sont exprimés les canaux sodiques (CNG : *cyclic nucleotide-gated*, HSC : *highly selective cation*, NSC : *nonselective cation*), le canal chlorure CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), des canaux potassiques (canaux K^+) et les aquaporines (AQP). La pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$), le co-transporteur $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ (NaK2CL) ainsi que des canaux potassiques sont exprimés au niveau de la membrane basolatérale. (Modifié de Bardou *et al.*, 2009) ³³.

1.2.3 Canaux et transporteurs au niveau de l'épithélium alvéolaire

L'expression à la membrane basolatérale de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ permet la sortie de trois ions sodiques (Na^+) contre l'entrée de deux ions potassiques (K^+). L'activité de la pompe permet de créer un gradient électrochimique favorable à la réabsorption du Na^+ .

L'efflux d'ions K^+ est quant à lui produit par des canaux potassiques, notamment par le canal voltage-dépendant KvLQT1, le canal potassique activé par le calcium KCa3.1 et le canal à rectification entrante K_{ATP} ³⁴. Les cellules alvéolaires expriment également des canaux et transporteurs ioniques au niveau de leur membrane apicale, notamment des canaux potassiques qui permettent la sortie des ions K^+ , des canaux chlorures et sodiques, dont le canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) et le canal ENaC (*epithelial sodium channel*). Le canal sodique ENaC et les canaux potassiques KvLQT1 et KCa3.1 seront décrits plus en détails dans les prochaines sections.

1.2.3.1 Canal sodique ENaC (*epithelial sodium channel*)

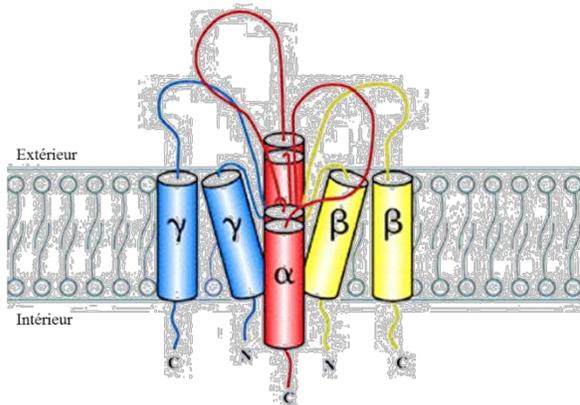
Le canal ENaC est un canal indépendant du voltage, sensible à l'amiloride (diurétique). Il est exprimé dans plusieurs tissus et épithéliums, notamment au niveau des intestins, des reins, des voies aériennes et des alvéoles, où il est exprimé à la membrane apicale des cellules ATI et ATII ³⁴.

Structure du canal sodique ENaC

Les études moléculaires portant sur ENaC ont permis de mettre en évidence que le canal est composé de trois sous-unités homologues; il est formé minimalement de deux sous-unités α , d'une sous-unité β et d'une sous-unité γ ^{7,35} (**Fig.7**). Au niveau alvéolaire, le canal peut aussi être formé d'une combinaison impliquant une sous-unité δ , initialement découverte au niveau du cerveau ³⁶. L' α -ENaC est la sous-unité liée à l'activité du canal; les sous-unités β et γ sont incapables à elles seules de former un canal fonctionnel ³¹. La formation du canal avec les trois différentes sous-unités offre une très haute sélectivité aux

cations Na^+ . Chaque sous-unité possède un domaine extracellulaire qui représente environ 70% de la sous-unité ³¹ et deux domaines transmembranaires. Les deux extrémités N-terminale (NH_2^+) et C-terminale (COOH^-) des sous-unités sont localisées au niveau du cytoplasme et sont impliquées dans la modulation de l'activité du canal ³¹.

Figure 7. Représentation schématique de la topologie transmembranaire du canal sodique ENaC



Composition homologue du canal sodique ENaC fonctionnel formée de 2 sous-unités α , 1 sous-unité β et 1 sous-unité γ . Chaque sous-unité est constituée de deux domaines transmembranaires. Le pore formé par les quatre sous-unités permet le passage des ions Na^+ de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur. (Modifié de Gormley *et al.*, 2003) ³⁵.

Fonctions du canal sodique ENaC

L'absorption des ions sodiques de l'espace alvéolaire est majoritairement faite par le canal ENaC, qui est exprimé à la membrane apicale des cellules ATI et ATII. Le canal ENaC, avec la pompe Na^+/K^+ ATPase, participent donc au contrôle de l'absorption de fluide qui suit le gradient sodique, de l'espace alvéolaire vers l'interstitium. La sortie de Na^+ au niveau basolatéral par la pompe Na^+/K^+ ATPase crée un déséquilibre des charges qui résulte en un potentiel membranaire négatif de -40 mV favorisant l'entrée de sodium au niveau apical par le canal ENaC ³³.

Le canal ENaC permet la réabsorption de fluides pulmonaires à la naissance et il est impliqué dans la résorption de l'œdème pulmonaire en conditions pathologiques ³⁷. Son rôle essentiel a été démontré *via* un modèle de souris déficientes pour la sous-unité alpha du canal (α -ENaC $-/-$); ces souris sont incapables d'éliminer le liquide alvéolaire à la naissance et meurent d'une détresse respiratoire en moins de 40 heures ³⁸. Les propriétés et fonctions du canal ENaC en font une cible thérapeutique potentielle pour traiter l'œdème pulmonaire, notamment chez les patients atteints de SDRA.

Régulation du canal sodique ENaC

Plusieurs études ont caractérisé les mécanismes (transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels) de régulation du canal ENaC. L'intégrité de la membrane plasmique des cellules influence également le canal. L'augmentation d'AMPC, après stimulation par la vasopressine et les agonistes β -adrénergiques, favorise l'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA), augmentant ainsi la translocation de la protéine ENaC à la membrane apicale ³⁹. Il est important de noter que la PKA active également les canaux chlorures et potassiques, créant ainsi un gradient ionique qui favorise le transport extracellulaire des fluides. L'hormone aldostérone et les glucocorticoïdes modulent l'expression d'ENaC ⁴⁰, tandis que les agonistes β -adrénergiques augmentent l'activité du canal et la clairance des liquides alvéolaires ⁴⁰. Il a également été montré au laboratoire que les canaux potassiques voltage-dépendant KvLQT1 et à rectification entrante K_{ATP} modulent l'expression du canal ENaC dans les cellules alvéolaires ³⁷. En effet, l'activation du KvLQT1 et du K_{ATP} augmente l'activité du promoteur de la sous-unité α -ENaC et son expression génique et protéique. À l'inverse, l'inhibition pharmacologique

et moléculaire de ces canaux potassiques a pour effet de diminuer l'expression d' α -ENaC en réduisant l'activité de son promoteur ³⁷.

1.2.3.2 Les canaux potassiques de l'épithélium alvéolaire

Plus de 30 canaux potassiques différents sont exprimés par les cellules de l'épithélium pulmonaire ; ils sont notamment localisés à la membrane apicale et basolatérale des cellules alvéolaires ATI et ATII (**Fig.7**) ³³. Ils assurent ainsi le transport des ions potassiques de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules, participant ainsi à créer un potentiel de membrane favorisant le transport ionique et liquidien grâce à l'établissement des gradients électrochimiques. Ces canaux sont aussi impliqués dans la régulation du pH au niveau épithélial et du volume cellulaire ^{33,41}. Il a également été démontré qu'ils ont un rôle dans la régulation des mécanismes de migration et de prolifération cellulaire, notamment des cellules épithéliales (section 1.5) ⁴¹. Le nombre de segments transmembranaires (STM, 2, 4 ou 6) des canaux potassiques, ainsi que leur mode d'activation permettent leur classement (**Fig.8**).

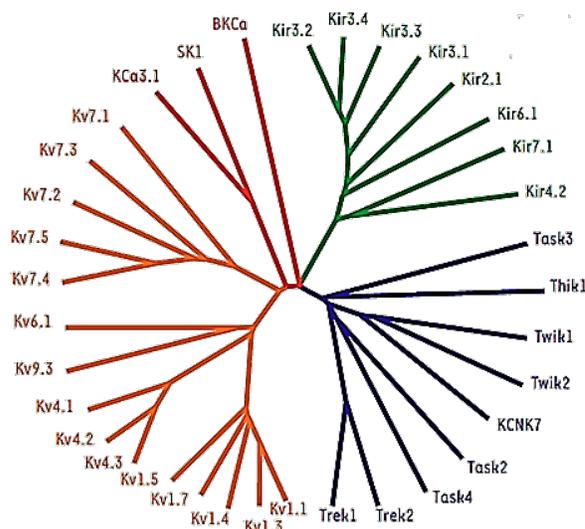


Figure 8. Arbre phylogénétique des canaux K⁺ de l'épithélium respiratoire
Ségrégation par couleur des différentes classes de canaux K⁺ : 2 STM à rectification entrante (vert, schématisation de la topologie transmembranaire), 4 STM à deux pores (bleu), 6 STM dépendants du voltage (orange, schématisation de la topologie transmembranaire) et activés par le calcium (rouge). (Bardou *et al.*, 2009) ³³.

Les canaux potassiques exprimés au niveau de l'épithélium alvéolaire se regroupent principalement en trois classes, les canaux K^+ à 6 STM dépendants du voltage ou activés par le calcium, les canaux K^+ à 4 STM à deux pores et les canaux K^+ à 2 STM à rectification entrante. Le canal voltage-dépendant KvLQT1, le canal potassique activé par le calcium KCa3.1, le canal à 2 STM à rectification entrante K_{ATP} ainsi que le canal à deux pores TREK-1 semblent toutefois jouer un rôle majeur dans la régulation des transports ionique et liquidien ainsi que dans la réparation de l'épithélium pulmonaire^{33,42,43}. Les canaux KvLQT1 et KCa3.1 seront décrits plus en détails dans les prochaines sections.

1.2.3.2.a Canal potassique KvLQT1

Codé par le gène KCNQ1 (≈ 400 kb), le canal KvLQT1 (Kv7.1) fait partie de la famille des canaux potassiques à 6 STM dépendants du voltage. Le syndrome cardiaque du long QT (LQTS1), pouvant causer des arythmies et des fibrillations ventriculaires, est souvent associé à une mutation du gène KCNQ1; d'où le nom KvLQT1⁴⁴. Les souris déficientes pour le KCNQ1 (Kcnq1 -/-) sont atteintes de surdité, en plus de présenter des problèmes arythmiques, gastriques et de l' quilibre^{44,45}. Au niveau de l'épithélium pulmonaire, le canal KvLQT1 est exprimé à la membrane basolatérale des cellules ATII ; des complexes formés de différentes sous-unités du canal sont aussi exprimées au niveau apical^{37,44}.

Structure du canal potassique KvLQT1

Le canal KvLQT1 est composé de 6 STM et de deux sous-unités. La sous-unité α du canal KvLQT1 (KCNQ1) comporte le domaine sensible au voltage (4^e STM riche en acides aminés chargés positivement) et le pore du canal se trouve entre le 5^e et 6^e STM (**Fig9A**).

Les extrémités NH_2^+ et COOH^- sont localisées à l'intérieur du cytoplasme et portent plusieurs sites de phosphorylation. Il a été démontré que des sous-unités dites accessoires s'associent avec des sous-unités des canaux potassiques voltage-dépendant, dont le canal KvLQT1 ⁴⁴. Parmi ces protéines accessoires, les sous-unités codées par le gène KCNE (KCNE2-KCNE3) s'associent à l' $\alpha\text{-KvLQT1}$ assurant la régulation de l'activité du canal (**Fig.9B**) au niveau pulmonaire, tandis qu'au niveau cardiaque, c'est plutôt la sous-unité KCNE1 qui est exprimée ⁴⁴.

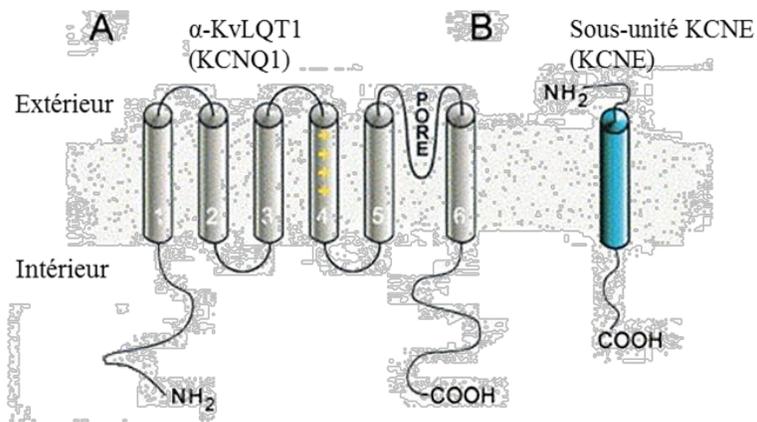


Figure 9. Représentation schématique de la topologie transmembranaire du canal voltage-dépendant KvLQT1

La sous-unité α du canal potassique dépendant du voltage est formée de 6 STM (A). Le 4^e STM contient la partie sensible au voltage. Le pore formé entre le 5^e et 6^e STM permet le passage des ions potassiques. En B, schématisation de la protéine accessoire encodée par le gène KCNE . (Modifié de Melman *et al.*, 2002) ⁴⁶.

Fonctions du canal potassique KvLQT1

Le changement de voltage membranaire lors de la dépolarisation (-20 mV), déclenché notamment par l'activation des autres canaux ioniques, active le canal KvLQT1 . Son ouverture progressive va permettre la sortie des ions potassiques et le changement de

potentiel créé par la sortie de K^+ va permettre la repolarisation de la membrane basolatérale. La pompe Na^+/K^+ ATPase va transporter les ions K^+ à l'intérieur de la cellule et par le fait même permettre la sortie des ions sodiques ; favorisant ainsi le transport du Na^+ de part et d'autre de la cellule avec le canal ENaC ainsi que la réabsorption liquidienne (**Fig.10**).

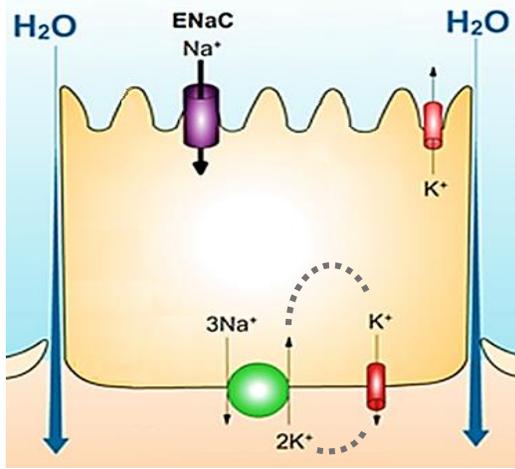


Figure 10. Représentation schématique du transport des ions potassiques et sodiques au niveau des cellules ATII de l'épithélium alvéolaire

Schématisation des transports ionique et liquidien par le canal sodique ENaC (apical), les canaux potassiques (K^+) (apical et basolatéral) et la pompe Na^+/K^+ ATPase (basolatéral) et par voie paracellulaire des cellules ATII. (Modifié de Laube *et al.*, 2015)⁴⁷.

Régulation du canal potassique KvLQT1

Au niveau épithélial, la régulation du canal KvLQT1 peut se faire par plusieurs mécanismes. Parmi ceux-ci, l'activation du récepteur à l'EGF (*epithelial growth factor*) (EGFR) par l'EGF et l'AMPC induit la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de KvLQT1, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activité du canal. À l'inverse, la protéine kinase activée par l'AMPC diminue l'activité du canal⁴¹. Le pH et le volume cellulaire régulent également son activité. Les inhibiteurs pharmacologiques (comme le chromanol 293B et le clofilium) et l'activateur spécifique, dérivé des benzodiazépines, le R-L3 (L-364,373) permettent de moduler le canal^{44,48,49}.

1.2.3.2.b Canal potassique KCa3.1

Un autre acteur dans le transport ionique transépithélial au niveau alvéolaire est le canal potassique KCa3.1 à conductance intermédiaire. Codé par le gène KCNN4, il est activé par l'ion calcique (Ca^{2+}). Le canal KCa3.1 est exprimé dans plusieurs types cellulaires, notamment les érythrocytes, les macrophages et les cellules alvéolaires ATII^{33,50}.

Structure du canal potassique KCa3.1

Tout comme le canal KvLQT1, le canal KCa3.1 est formé de sous-unités à 6 STM (**Fig.11**). Sa composition tétramérique permet de former un pore laissant passer les ions potassiques. Étant activé par les ions Ca^{2+} , le canal KCa3.1 contient un site de liaison à la calmoduline situé à son extrémité C-terminale. Son expression à la membrane basolatérale des cellules ATII a été confirmée et de plus en plus d'évidences démontrent aussi son expression à la membrane apicale⁵¹.

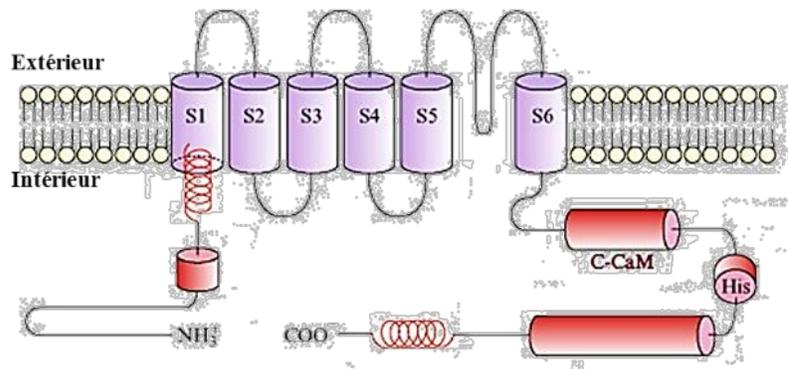


Figure 11. Représentation schématique de la topologie transmembranaire du canal K^+ activé par le calcium KvLQT1

Les 4 sous-unités du canal potassique KCa3.1 sont formées de 6 STM (S1 à S6). L'extrémité C-terminale de la protéine contient la partie sensible à la calmoduline (C-CaM) pour la modulation du canal par le calcium. Le pore formé entre le 5^e et 6^e STM (S5 et S6) permet le passage des ions potassiques. (Modifié de Garneau *et al.*, 2010)⁵².

Fonctions du canal potassique KCa3.1

Lors de son ouverture en réponse à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, le canal KCa3.1 permet la sortie d'ions potassiques. Ainsi, la libération de cations K^+ permet à la membrane de se repolariser⁵³. Tout comme pour le canal KvLQT1, l'activation du canal KCa3.1 modifie le gradient électrochimique favorisant la réabsorption de fluides.

Régulation du canal potassique KCa3.1

Au niveau épithélial, la régulation de l'activité du canal KCa3.1 se fait par plusieurs mécanismes, notamment par les facteurs de croissance, dont l'EGF, et par la PKA. La modulation pharmacologique de KCa3.1 peut se faire par le TRAM-34, un inhibiteur spécifique au KCa3.1, et par le 1-éthyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO) qui permet l'activation pharmacologique du canal⁵⁰.

1.3 Physiologie de l'épithélium alvéolaire

Plusieurs acteurs participent au maintien de l'homéostasie de l'épithélium alvéolaire et à la conservation de l'intégrité des poumons notamment par une défense immunitaire, une réponse inflammatoire et des mécanismes de réparation adéquats.

1.3.1 Réponse immunitaire

Étant exposées directement à l'environnement extérieur, les alvéoles sont confrontées à plusieurs stress incluant une exposition à des pathogènes. Une réponse immunitaire efficace est donc essentielle; elle est assurée en partie par les macrophages. Il s'agit du type cellulaire le plus abondant dans les alvéoles après les cellules épithéliales et représentent

95% des cellules immunitaires retrouvées dans les BAL de patients sains ¹. Les macrophages sont impliqués dans la réponse immunitaire, principalement grâce à leur rôle dans la phagocytose et leur capacité d'opsonisation. Ils ont aussi un rôle de cellules présentatrices d'antigènes ⁵⁴. Les macrophages participent aussi au chimiotactisme *via* la sécrétion de plusieurs cytokines et chimiokines, dont les interleukines IL-1, IL-8, IL-10, l'interféron INF- γ et le facteur de nécrose tumorale alpha TNF- α . D'autres types cellulaires du système immunitaire sont retrouvés au niveau alvéolaire en conditions physiologiques : les lymphocytes et les cellules dendritiques qui représentent respectivement 10-15% et 0,5% des cellules totales récoltées dans les BAL de patients sains, alors que les macrophages représentent plus des 85% ¹.

1.3.2 Réponse inflammatoire

En réponse à une agression au niveau pulmonaire, une réponse inflammatoire est enclenchée, entraînant ainsi la sécrétion de plusieurs facteurs solubles sur le site lésé ⁵⁵. Elle est marquée par l'augmentation des taux de cytokines et de chimiokines sécrétées notamment par les macrophages, neutrophiles ainsi que par les cellules structurelles (fibroblastes, cellules endothéliales et épithéliales) ⁸. Plusieurs facteurs de croissance et prostaglandines sont également sécrétés. La réponse inflammatoire, stimulée en partie par la réponse immunitaire, va à son tour provoquer le recrutement et l'activation des cellules immunitaires et activer la cascade de coagulation : créant ainsi une boucle de rétroaction positive ⁵⁶. La sécrétion du TNF- α et de l'IL-1 β va stimuler l'expression de protéines d'adhésion à la surface des cellules immunitaires, favorisant ainsi l'infiltration des neutrophiles au niveau alvéolaire ⁵⁷. Les analyses de BAL de patients atteints du SDRA

montrent aussi une augmentation significative des niveaux de neutrophiles infiltrés ⁵⁷. La réponse inflammatoire, bien qu'essentielle, doit toutefois être contrôlée et suivie d'une phase de résolution; dans le cas contraire, elle devient pathologique.

1.3.3 Les mécanismes physiologiques de réparation de l'épithélium alvéolaire

En réponse à une agression et à des lésions, les cellules alvéolaires doivent développer des mécanismes de réparation épithéliale adéquats et efficaces afin de reconstituer un épithélium alvéolaire intègre et fonctionnel.

1.3.3.1 Causes et conséquences des lésions épithéliales

L'épithélium alvéolaire peut être endommagé par des particules ou molécules indésirables, étant exposé directement à la lumière pulmonaire, notamment par des particules allergènes ou autres xénobiotiques inspirés. Certaines agressions peuvent aussi être d'origine intrinsèque, notamment une infection virale ou bactérienne, une septicémie ou même un choc ischémique ⁴¹.

Ces différents stress perturbent l'intégrité de l'épithélium ainsi que l'homéostasie de l'environnement alvéolaire. En effet, une rupture au niveau de la barrière épithéliale et la perte de jonctions serrées entre les ATI et ATII brisent l'étanchéité entre la limite de la lumière alvéolaire et endothéliale ⁵⁸. Les cellules ATI, de par leur morphologie, sont plus sensibles aux lésions que les ATII. Des dommages au niveau de la structure cellulaire des alvéoles (ATI et ATII), peuvent créer de l'atélectasie et perturbent aussi la fonctionnalité de l'épithélium. En effet, comme décrit précédemment, la production de surfactant ainsi que les transports liquidiens et ioniques, qui servent entre autres à la résorption de l'œdème

pulmonaire, dépendent de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire⁵⁸. Suite à un dommage, les fonctions alvéolaires, tant cellulaires que physiques, sont alors compromises.

1.3.3.2 Processus de réparation épithéliale

En réponse à ces lésions, différents processus de réparation sont enclenchés par l'épithélium alvéolaire. Les cellules épithéliales sont activées, les cellules immunitaires sont recrutées et il y a sécrétion de facteurs de croissance. Des adhésions inter-cellulaires sont formées et des processus de migration et de prolifération cellulaire sont engagés. La revue littéraire de Girault et Brochiero dresse un portrait de ces mécanismes : étalement et dé-différenciation cellulaire, migration, prolifération, re-différenciation et régénération de l'épithélium alvéolaire (**Fig.12**). Les ATII sont les principales cellules impliquées dans ces différents processus, d'où leur qualificatif de cellules progénitrices¹⁵.

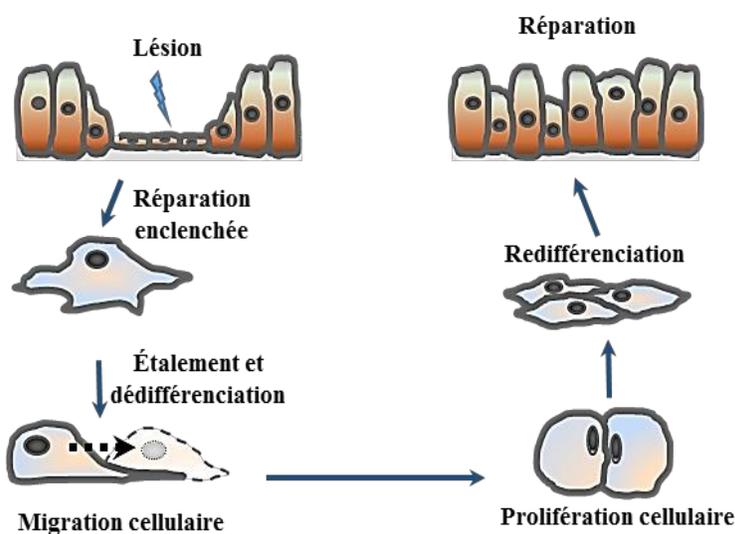


Figure 12. Processus de réparation de l'épithélium alvéolaire

Schématisation des étapes de réparation de l'épithélium alvéolaire par les cellules ATII en réponse à des lésions : étalement et dédifférenciation, migration cellulaire, prolifération cellulaire, et redifférenciation. (Modifié Girault et Brochiero,2014)⁴¹.

Migration et prolifération cellulaires

Afin de se rendre sur le site de la lésion, les ATII ont développé des mécanismes de migration cellulaire essentiels pour la réparation épithéliale, qui impliquent l'adhésion et l'interaction avec la matrice extracellulaire (MEC). Lorsque la membrane basale est lésée ou dénudée, une MEC provisoire est alors formée à laquelle les ATII peuvent adhérer afin de se déplacer.

Les différentes protéines exprimées par les ATII, notamment des cadhérines et des intégrines forment des liens adhésifs avec la MEC (**Fig.13**). Les filaments d'actines des cellules liés aux hétérodimères (α et β) des intégrines permettent l'attachement à l'avant de la cellule à la matrice pour migrer vers le site lésé. Les métalloprotéinases matricielles (MMP) exprimées par les ATII permettent le déplacement directionnel de la cellule en dégradant la MEC et en brisant ainsi les liens entre la matrice et l'arrière de la cellule⁴¹. Après avoir migré jusqu'au site lésé, les ATII dé-différenciées vont proliférer puis se re-différencier, en ATI ou en ATII afin de recréer un épithélium *de novo*⁴¹.

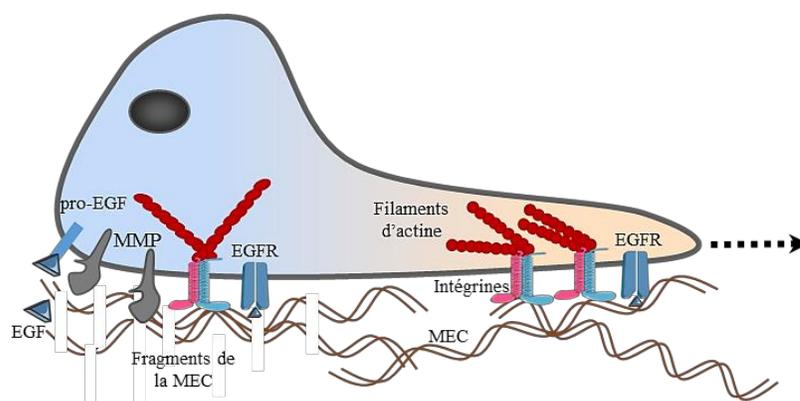


Figure 13. Processus de migration cellulaire

Schéma d'une cellule épithéliale dédifférenciée et ses interactions avec les composants de la MEC lors de la migration. (Modifié Girault et Brochiero, 2014)⁴¹.

L'épithélium alvéolaire sécrète différents facteurs de croissance impliqués dans la régulation de l'homéostasie de l'épithélium alvéolaire. Le facteur de croissance EGF et son

récepteur EGFR, respectivement sécrété et exprimé par les cellules épithéliales, sont des acteurs majeurs de la réparation épithéliale^{15,58,59,60}. En effet, il a été montré au laboratoire du Dre Brochiero que l'activation d'EGFR par l'EGF entraîne la stimulation des processus de migration et prolifération cellulaires de l'épithélium bronchique et alvéolaire suite à des lésions (**Fig.14**)^{59,60,61}.

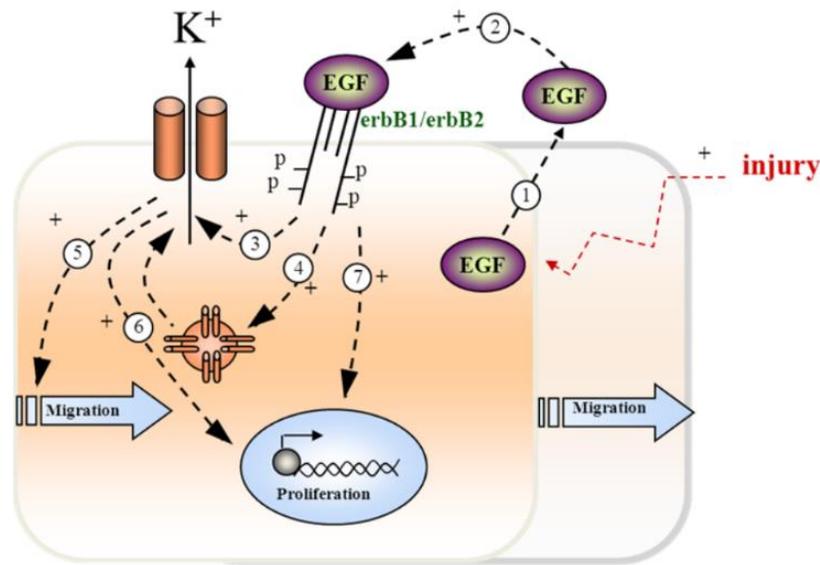


Figure 14. Boucle autocrine d'activation d'EGFR favorisant les mécanismes de réparation épithéliale

Schéma de la stimulation de la migration et de la prolifération cellulaire par l'activation d'EGFR par l'EGF suite à une lésion de l'épithélium bronchique ou alvéolaire. (Modifié de Maillé *et al.*, 2011)⁶⁰.

Au niveau des voies respiratoires, l'expression de l'EGF et de l'EGFR est augmentée en réponse à une lésion tissulaire, formant ainsi une boucle autocrine⁵⁵. En effet, l'augmentation de la sécrétion de ces facteurs permet de moduler les différents mécanismes de réparation ainsi que les réponses inflammatoire et immunitaire.

1.3.3.3 Conditions pathologiques de remodelage épithélial

Lorsque les agressions tissulaires sont répétées, les lésions créées ne sont pas réparées adéquatement et la réponse inflammatoire n'est plus contrôlée ; la condition devient alors pathologique. La réparation non-contrôlée de l'épithélium peut induire une perte de l'intégrité de la membrane basale et activer les fibroblastes et les myofibroblastes qui vont sécréter des facteurs entraînant une fibrose ⁵⁵. Les ATII acquièrent alors un phénotype de cellule mésenchymateuse ⁶². Cette transition induit l'apparition de myofibroblastes activés au niveau sous-épithélial, favorisant l'apparition de fibrose. Un cercle vicieux de réparation épithéliale aberrante s'installe alors. Les réponses immunitaire et inflammatoire dérégées, exacerbées ainsi que les mécanismes de réparation perturbés vont mener, entre autres, au développement désordonné de fibrose et à la perte de compliance pulmonaire ⁵⁵. Ce profil pathologique affectant les fonctions pulmonaires et augmentant la morbidité est notamment retrouvé dans le SDRA.

1.4 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une atteinte pulmonaire alvéolaire grave, classé parmi les défaillances respiratoires aiguës. Cliniquement, le SDRA se définit comme un dommage inflammatoire aigu engendrant des modifications au niveau de l'oxygénation, des radiographies et de la pression pulmonaire, de source non cardiogénique

⁶³.

1.4.1 Causes du SDRA

Le SDRA apparaît chez les patients après une agression alvéolaire intra-vasculaire directe ou indirecte (**Fig. 15**). La principale cause directe du SDRA est la pneumonie, alors que la principale cause indirecte est la septicémie ^{57,64,65}.

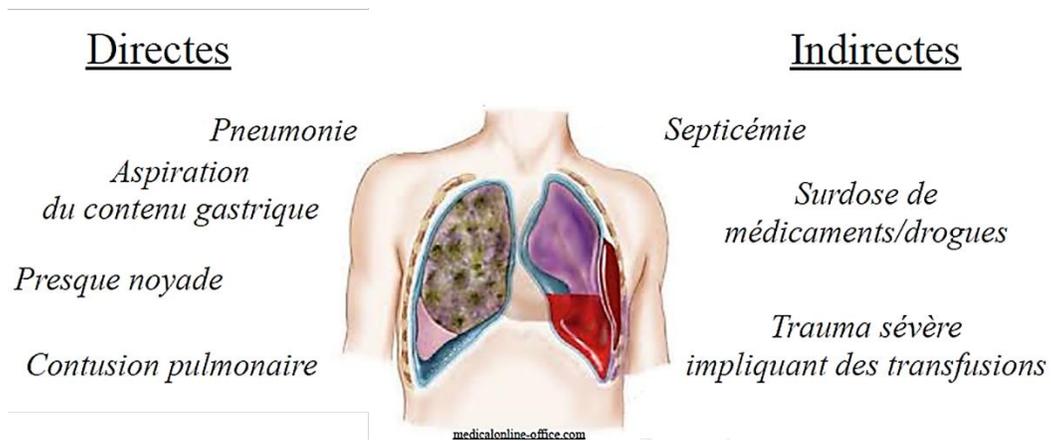


Figure 15. Causes directes et indirectes du syndrome de détresse respiratoire aiguë

Parmi les causes du SDRA, la septicémie est la plus fréquente (40%) ^{58,66}. L'origine de la cause du SDRA chez le patient peut donner un indice sur son pronostic. En effet, un SDRA induit par une atteinte pulmonaire directe est associée à un taux de mortalité plus élevé ainsi qu'à une prise en charge des patients plus importante, notamment au niveau de la respiration artificielle ventilée. Un SDRA résultant d'une cause indirecte sera souvent associé à un œdème interstitiel et à l'affaissement des alvéoles ^{57,67,68}.

De par le vaste éventail de causes et surtout l'hétérogénéité du syndrome, il est difficile de prédire une incidence exacte du SDRA. Cependant, le *National Institutes of Health* (NIH) estime qu'aux États-Unis, le SDRA touche environ 75 habitants sur 100 000 annuellement

^{58,69}. Enfin, certaines conditions peuvent augmenter la prévalence de la maladie ou influencer son pronostic, telles les maladies pulmonaires chroniques, l'alcoolisme, le tabagisme et l'acidose ^{58,30,68,70}. Le taux de mortalité associé au SDRA est de 40 à 45 % ⁷¹.

1.4.2 Phases du SDRA

La progression du SDRA se fait en deux phases distinctes, décrites et caractérisées par des paramètres cliniques, radiographiques et histologiques : la phase aiguë-exsudative et la phase proliférative-fibrotique ⁵⁸. L'évolution de l'état de santé du patient suit généralement une des deux tendances suivantes, soit un rétablissement rapide du patient avec peu de complications, soit un séjour hospitalier prolongé avec peu d'amélioration des fonctions pulmonaires et un développement de fibrose ⁵⁷.

Dans un scénario de phase à risque de SDRA, la phase aiguë débute dès les premières 24 à 48 heures suivant l'apparition des premiers symptômes. Il y a entre autres des atteintes de la barrière alvéolo-capillaire, la formation d'un œdème pulmonaire et de membrane hyaline ainsi que le développement d'une réponse inflammatoire (**Fig.16**). S'il n'y a pas de rétablissement, la phase proliférative-fibrotique se développe pendant les 2 à 7 jours suivants et est caractérisée par l'apparition de fibrose, dont la sévérité augmente au fil du temps ⁶⁷.

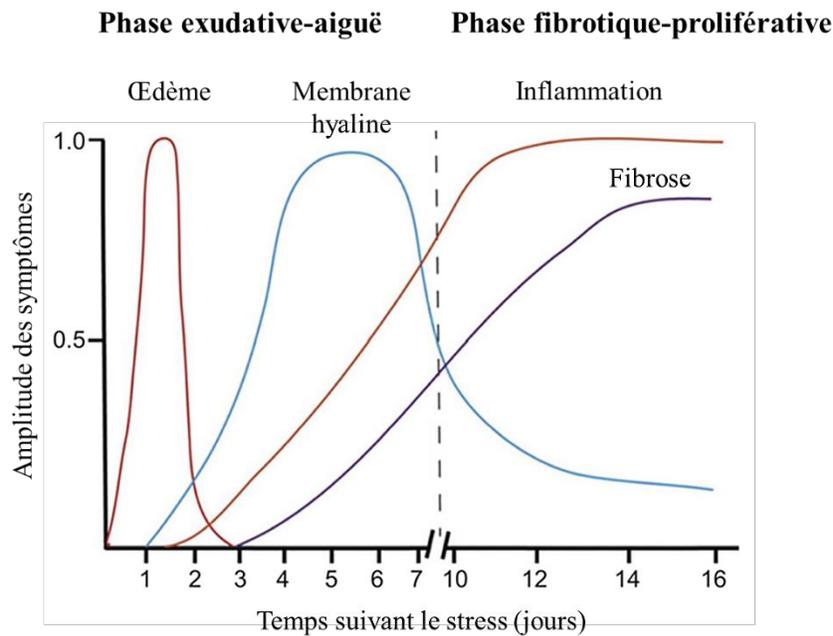


Figure 16. Évolution du syndrome de détresse respiratoire aiguë en fonction du temps
 Chronologie de la progression de la phase exsudative aiguë et fibrotique-proliférative du SDRA.
 (Modifié de Checkley, 2013) ⁷².

1.4.2.1 Phase exsudative-aiguë

Lors de la première phase du SDRA, les stress au niveau des alvéoles vont induire des lésions de la barrière alvéolo-capillaire (**Fig.17**). Les dommages alvéolaires diffus affectent les cellules alvéolaires ATI et ATII. Or, étant plus fragiles que les cellules ATII, les ATI entrent en apoptose et la lame basale entre en desquamation laissant alors une surface alvéolaire partiellement dénudée ⁵⁷. La formation de membrane hyaline (accumulation de fibrine, de globules rouges et de débris cellulaires) au niveau des alvéoles complique, voire empêche, les échanges gazeux compromettant ainsi la fonction pulmonaire ⁶⁷. La rupture de la barrière alvéolo-capillaire va être responsable de l'infiltration cellulaire au niveau alvéolaire et de la formation de l'œdème pulmonaire riche en protéines et en érythrocytes.

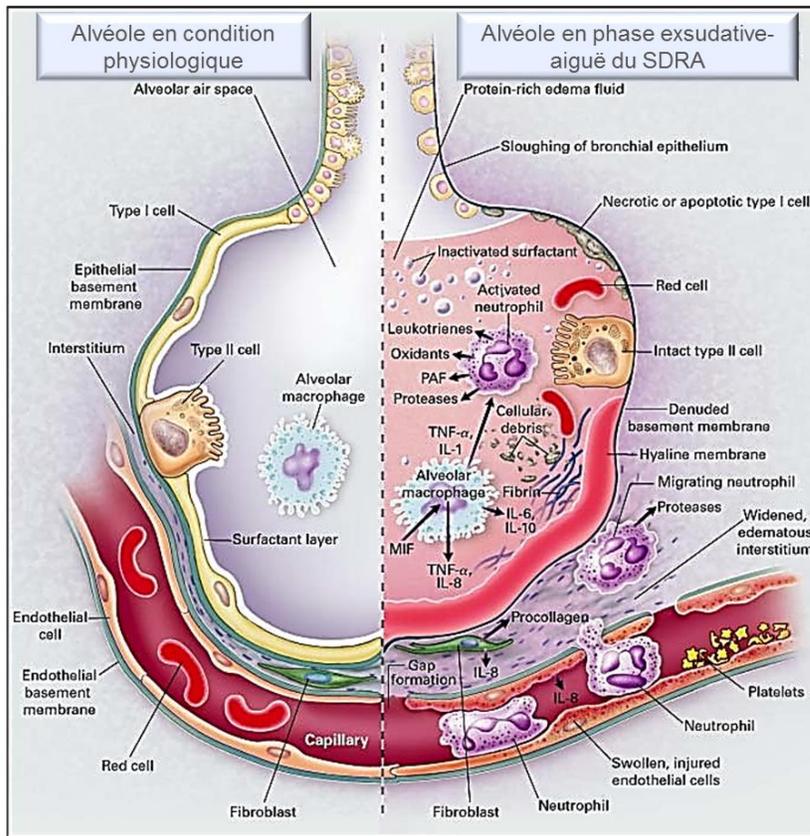


Figure 17. Structure d'une alvéole saine et en condition pathologique de la phase exsudative-aiguë du SDRA

Schématisation des différences entre les cellules et composants retrouvées au niveau alvéolaire en condition physiologique (gauche) et en condition pathologique en phase exsudative-aiguë (droite) : la membrane basale épithéliale dénudée (*denuded basement*

membrane) par la mort cellulaire des cellules ATI (*necrotic or apoptotic type I cell*), formation de membrane hyaline riche en protéines (*hyaline membrane*), neutrophiles recrutés (*activated neutrophil, migrating neutrophil*) au niveau des alvéoles, formation d'un œdème riche en protéines (*protein-rich edema fluid*), sécrétion par les macrophages (*alveolar macrophages*) de cytokines, d'interleukines (IL-1, 6, 8, and 10) et du facteur TNF- α . (Modifié de Ware et Matthay, 2000) ⁸.

L'intégrité des ATI et ATII perdue, leurs fonctions dans l'homéostasie alvéolaire sont alors perturbées. L'augmentation de la perméabilité de la barrière ainsi que le dysfonctionnement des cellules vont limiter la résorption de l'œdème.

La phase exsudative est aussi caractérisée par l'activation et l'infiltration au niveau alvéolaire de cellules inflammatoires, principalement de neutrophiles. Leur activation soutenue va engendrer une forte augmentation de la sécrétion de cytokines et chimiokines

par les macrophages, dont les interleukines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et IL-8, ainsi que le TNF- α et la cytokine anti-inflammatoire IL-10, créant ainsi un déséquilibre entre les cytokines pro et anti-inflammatoires ⁵⁷. L'augmentation de la sécrétion de cytokines et de facteurs pro-inflammatoires stimule la chimiotaxie des neutrophiles et favorise leur activation. Les cellules épithéliales jouent également un rôle dans ce phénomène chimiotaxique des neutrophiles en sécrétant aussi des cytokines et chimiokines ⁵⁸. La réponse inflammatoire exacerbée va créer un cercle vicieux de dommages de l'épithélium alvéolaire en favorisant l'apoptose des cellules et le recrutement d'autres protéines inflammatoires. Les taux de cytokines et chimiokines retrouvées dans les BAL de patients en SDRA permettent entre autres de déterminer un pronostic indiquant une résolution de la réponse inflammatoire ou l'apparition de complications ⁵⁷.

1.4.2.2 Phase proliférative-fibrotique

En absence de réparation de l'épithélium, de la résorption de l'œdème pulmonaire et du contrôle de la réponse inflammatoire, a lieu une progression vers la phase proliférative-fibrotique du SDRA. La persistance voire même l'aggravation de la réponse inflammatoire, l'apparition de fibrose, l'apposition de collagène au niveau du tissu alvéolaire et la persistance de l'hypoxie vont résulter en un épithélium alvéolaire dysfonctionnel (**Fig.18**). Suivent alors de graves complications au niveau pulmonaire, pouvant mener à la défaillance respiratoire et au décès du patient ^{58,73}.

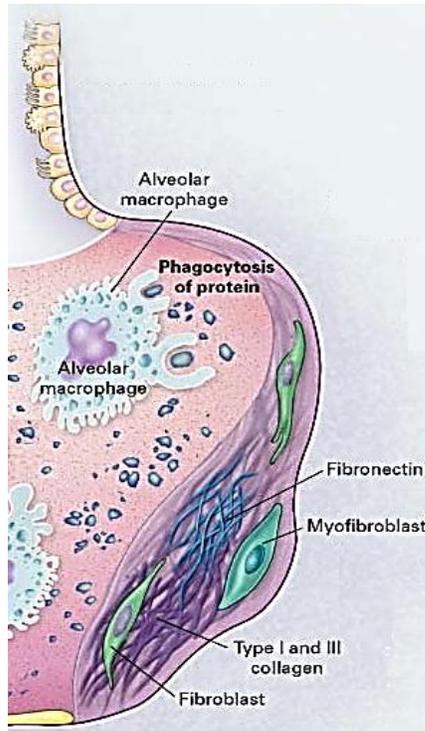


Figure 18. Structure d'une alvéole en condition pathologique lors de la phase proliférative-fibrotique du SDRA

Schématisation de la persistance de l'œdème pulmonaire et des composantes cellulaires favorisant l'apparition de tissus fibrotique (*fibronectin*) au niveau des alvéoles lors de la phase proliférative-fibrotique : myofibroblaste (*myofibroblast*), collagène de type I et III (*type I and III collagen*) et fibroblaste (*fibroblast*). (Modifié de Ware et Matthay, 2000) ⁸.

1.4.3 Traitements du SDRA

Depuis sa caractérisation en 1967 ⁵⁸, le SDRA reste encore une pathologie pour laquelle aucun traitement n'est vraiment efficace, notamment à cause de l'hétérogénéité du syndrome. Plusieurs essais thérapeutiques portant sur les soins apportés au patient ou testant différents composés pharmacologiques ont été effectués.

La ventilation mécanique

Les méthodes de ventilations mécaniques appliquées aux patients en SDRA ont été revues et adaptées à la sévérité des symptômes ⁵⁸. Les dommages au niveau de l'épithélium alvéolaire fragilisent la barrière alvéolo-capillaire et la ventilation mécanique soutenue ainsi qu'un haut volume peuvent être responsables d'une aggravation de l'état des patients.

Une ventilation mécanique protectrice avec un plus petit volume courant ainsi qu'une pression positive en fin d'expiration a permis de réduire le taux de mortalité de 22 % lors d'une étude clinique du programme du *NIH Acute Respiratory Distress Syndrome Network*⁵⁸. Cependant, même si ces résultats sont connus depuis plus de 10 ans, le NIH estime qu'environ 25% patients atteints de SDRA à l'échelle mondiale ne reçoivent pas de ventilation mécanique adaptée³⁰.

Le surfactant synthétique

Étant donné son rôle prépondérant dans les fonctions pulmonaires et dans la défense contre les micro-organismes au niveau alvéolaire, le surfactant alvéolaire est aussi une cible thérapeutique. Des essais d'instillation de surfactant synthétique par nébuliseur, par le circuit de ventilation mécanique ou par voie intrabronchique ont été réalisés, mais aucun résultat n'a permis de montrer d'amélioration significative de la fonction pulmonaire des patients⁶⁷.

Les agents pharmacologiques

Plusieurs molécules pharmacologiques sont utilisées pour tenter de traiter les symptômes du SDRA. Parmi les paramètres physiopathologiques du syndrome, l'œdème pulmonaire et la réponse inflammatoire sont souvent ciblés par les thérapies, notamment *via* les agonistes adrénergiques β_2 et les corticostéroïdes.

Les agonistes des récepteurs adrénergiques β_2 sont entre autres utilisés pour moduler les transports ioniques et liquidiens afin de résorber l'œdème pulmonaire. La liaison des agonistes aux récepteurs (couplés à la protéine Gs) va stimuler la production d'AMPc, qui

va elle induire l'augmentation de l'expression du canal ENaC et de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ au niveau des ATII ⁷⁴. Le transport des ions et la clairance alvéolaire sont alors stimulés. Les agonistes adrénergiques β_2 permettent aussi la relaxation des muscles au niveau bronchique par la diminution de la concentration des ions calciques intracellulaire ⁴⁰. Toutefois, l'activation des récepteurs adrénergiques β_2 par les agonistes ne procure pas de résultats constants, en partie dû à la désensibilisation des récepteurs suite à l'exposition chronique d'agonistes ⁷⁵.

La réponse inflammatoire étant exacerbée dans le SDRA ⁷⁶, l'ajout de corticostéroïdes à la combinaison thérapeutique a été proposé comme agent anti-inflammatoire. Ils permettent d'inhiber la prolifération des macrophages et des fibroblastes, diminuant ainsi la sécrétion de cytokines et de chimiokines inflammatoires, dont le $\text{TNF-}\alpha$ ⁶⁷. Une étude clinique d'observation a aussi démontré que la prise préventive d'anti-inflammatoires (acide acétylsalicylique) chez les patients à risque permet de diminuer les chances de développer le SDRA *de novo* ⁷³. Or, malgré ces résultats, les corticostéroïdes ne s'avèrent pas vraiment efficaces pour résoudre la maladie ^{77,78}.

Les différentes thérapies pour le SDRA ont permis de diminuer les taux de mortalité d'environ 8 à 16% ³⁰. Les échecs thérapeutiques sont souvent liés au délai entre la prise en charge du patient et le moment du diagnostic. L'hétérogénéité du syndrome et l'état du tissu épithélial compliquent également le choix des thérapies à adopter ⁴⁰. En effet, les dommages au niveau de l'épithélium alvéolaire sont parfois trop importants pour que les agents pharmacologiques soient efficaces. De plus, les corticostéroïdes et les agonistes adrénergiques β_2 ne ciblent que l'inflammation et l'œdème pulmonaire, sans favoriser la réparation de l'épithélium alvéolaire.

Le pronostic des patients en SDRA est fortement dépendant de sa capacité à se rétablir tôt de la phase exsudative-aiguë⁵⁷ et de l'état du tissu alvéolaire⁴⁰ ; c'est pourquoi une prise en charge thérapeutique précoce ciblant une réparation efficace de l'épithélium alvéolaire lors de la phase exsudative-aiguë du SDRA est à adopter. À ce jour, malgré les progrès quant à la compréhension de la maladie et les méthodes de prise en charge des patients, aucun traitement pharmacologique efficace n'a été identifié pour le SDRA.

1.5 Évidences de l'implication des canaux potassiques dans les mécanismes de réparation de l'épithélium

Le rôle des canaux potassiques dans le contrôle de l'homéostasie des transports ioniques et liquidiens alvéolaires est déjà bien établi. Les canaux potassiques sont aussi impliqués dans d'autres fonctions de l'épithélium alvéolaire comme la réparation épithéliale⁷⁹.

Différentes études, dont celles de notre laboratoire, ont démontré que l'inhibition de l'activité de différents types de canaux potassiques affecte les mécanismes essentiels à la réparation épithéliale, notamment en diminuant la prolifération, la migration cellulaire et la vitesse de réparation de l'épithélium^{59,61,79,80}.

Au niveau de l'épithélium alvéolaire, deux des canaux majoritairement responsables du transport ionique et liquidien, soit le canal potassique KvLQT1 et le canal K_{ATP}, sont impliqués dans la réparation épithéliale en participant à la régulation de la prolifération et migration cellulaire⁶¹.

Le canal potassique activé par le calcium KCa3.1, également impliqué dans l'homéostasie liquidienne alvéolaire, participe aux processus de réparation au niveau bronchique⁵⁹. En effet, sur un modèle de lignée cellulaire épithéliale bronchique, il a été montré que

l'inhibition pharmacologique du canal par le TRAM-34 diminue la vitesse de réparation ⁵⁹. Cependant, l'implication du canal KCa3.1 dans les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire restait à caractériser au moment où j'ai entrepris ma maîtrise.

1.6 Évidences de l'implication des canaux potassiques dans la réponse inflammatoire

En plus de leur rôle dans les transports ioniques et dans les mécanismes de réparation épithéliale, les canaux potassiques pourraient participer également à la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire ³³.

En effet, il a été montré que l'inhibition pharmacologique des canaux potassiques KCa par la quinine diminue l'expression de l'ARNm du TNF- α dans les macrophages alvéolaires humains ⁸¹. D'autre part, l'inhibition sélective du canal KCa3.1 diminue la migration des fibrocytes humains *in vitro* ⁸² alors que celle du BKCa réduit l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales dans un modèle cellulaire d'endothélium ombilical humain ⁸³. *In vivo*, il a été montré que l'extinction du canal KCa3.1 par KO chez les souris (KCa3.1 -/-) induit une baisse du nombre de neutrophiles retrouvés dans les BAL des souris en réponse à un stimulus inflammatoire (LPS, lipopolysaccharide bactérien) ⁸⁴. Finalement, dans un modèle d'ischémie-reperfusion, l'inhibition pharmacologique du canal K_{ATP} diminue le recrutement des neutrophiles au niveau pulmonaire et l'expression du TNF- α ⁸⁵. Toutefois, le rôle des canaux K⁺ dans le contrôle de la réponse inflammatoire dans des modèles de SDRA *in vivo* n'avait jamais été évalué auparavant.

Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs

Il est bien établi que la réparation efficace de l'épithélium alvéolaire est une étape essentielle à la résolution du SDRA. Les études menées dans le laboratoire du Dre Brochiero ont permis de mettre en évidence un rôle du canal potassique activé par le calcium KCa3.1 et du canal potassique voltage-dépendant KvLQT1, deux acteurs clés dans le transport ionique et des fluides, dans les processus de réparation épithéliale^{33,41,59,61}.

Nous nous sommes donc penchés sur le rôle de ces canaux K^+ (le KCa3.1 à l'aide d'un modèle *in vitro* de siRNA et le KvLQT1 dans un modèle *in vivo* de souris transgéniques) dans les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire et dans la résolution du SDRA.

2.1 Le canal potassique KCa3.1 et l'intégrine- β 1 dans la réparation épithéliale alvéolaire

Afin de reconstituer un nouvel épithélium alvéolaire, les cellules ATII doivent enclencher plusieurs mécanismes de réparation, dont la migration et la prolifération cellulaire. Les ATII doivent alors adhérer avec la MEC notamment *via* les intégrines. Celles-ci interagissent aussi avec d'autres protéines et facteurs de croissance régulant la migration et prolifération cellulaire⁷⁹. En effet, il a été démontré dans un modèle *in vitro* de culture primaire de rat, que l'intégrine- β 1 participe à la régulation de la migration cellulaire des cellules ATII en présence de fibronectine⁸⁶.

Une relation entre les intégrines et les canaux potassiques a déjà été montrée dans d'autres modèles cellulaires ⁸⁷, mais n'avait jamais été explorée au niveau alvéolaire. Plusieurs évidences montrent aussi l'implication du canal potassique KCa3.1 dans les processus de réparation épithéliale. Or, son implication au niveau de la réparation de l'épithélium alvéolaire n'avait pas été explorée.

2.1.a Hypothèse

Nous avons alors émis l'hypothèse que le canal potassique KCa3.1 participe aux mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire en complémentarité avec l'intégrine- β 1.

2.1.b Objectif

Les objectifs pour cette première partie de mon projet étaient donc d'étudier *in vitro* le rôle du canal potassique KCa3.1 dans les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire (migration, prolifération et vitesse de réparation de l'épithélium) stimulés par la fibronectine et de caractériser la relation entre le canal KCa3.1 et un des récepteurs de la fibronectines, soit l'intégrine- β 1.

2.2 Le canal potassique KvLQT1 dans les mécanismes de résolution des processus physiopathologiques du SDRA

Dans la seconde partie de mon projet, un modèle de souris transgéniques disponible au laboratoire nous a permis d'étudier *in vivo* le rôle d'un autre canal potassique, le KvLQT1, dans les processus physiopathologiques du SDRA. Comme mentionné précédemment, étant donné son implication dans la régulation des transports liquidien et ionique, le canal KvLQT1 occupe un rôle primordial dans la physiologie de l'épithélium pulmonaire et dans les mécanismes de réparation épithéliale *in vitro*^{33,61}. Les données de la littérature suggèrent que les canaux potassiques peuvent également réguler la réponse inflammatoire (section 1.6).

2.2.a Hypothèse

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation du canal potassique KvLQT1 participe aux mécanismes de résolution du SDRA en améliorant les processus physiopathologiques du syndrome.

2.2.b Objectifs

Basé sur cette hypothèse, les objectifs étaient donc de déterminer l'impact du canal KvLQT1 sur la vitesse de réparation de l'épithélium alvéolaire, sur la résorption de l'œdème pulmonaire ainsi que sur la résolution de la réponse inflammatoire grâce à des modèles *in vivo* mimant les processus physiopathologiques de SDRA.

Chapitre 3 – Matériel et méthodes

3.1 Déclarations éthiques

Les expériences mentionnées dans ce manuscrit portant sur les modèles animaux, tant rats que souris, respectent les procédures approuvées par le Comité Institutionnel de la Protection des Animaux (CIPA) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, en accord avec les standards du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) en science.

3.2 Élevage murin

Afin d'étudier le canal potassique KvLQT1, une souche de souris C57Bl/6 (lignée J800) déficientes pour le gène *kcnq1*, qui code pour le canal KvLQT1, a été utilisée⁴⁵. Les souris déficientes (KvLQT1 $-/-$, KO) ont été générées *via* l'insertion d'une cassette *Neo (PGK-NeomycinR gene fusion)* de 130 pb au niveau de l'exon 2 du *kcnq1*, invalidant ainsi le gène⁴⁵. Les souris déficientes expriment un phénotype cardiaque qui est différent des souris sauvages (KvLQT1 $+/+$, WT), notamment au niveau de la repolarisation des cellules cardiaques. En effet, les souris KO sont atteintes d'un des syndromes associé à un long intervalle QT qui augmente le risque de fibrillation ventriculaire, soit le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen (JLNS)⁸⁸. De plus, elles sont atteintes de surdité et du syndrome de Shaker/Waltzer leur attribuant un trouble de l'équilibre et des tremblements⁴⁵. Toutefois, leur phénotype au niveau pulmonaire était inconnu au moment où j'ai débuté cette étude. Lors de chaque sevrage de souris, le génotypage a été réalisé afin de confirmer la présence ou non du canal KvLQT1 (**Fig.19**).

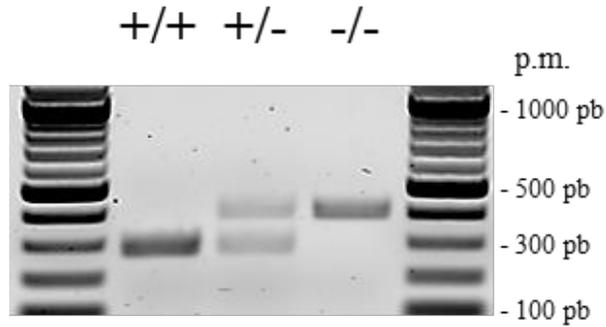


Figure 19. Génotypage des souris

Représentation de gel d'agarose des amplifications par PCR des extraits d'ADN des souris sauvages (KvLQT1 +/+, WT) et transgéniques (KvLQT1 -/-, KO) des fragments codant pour une portion de KvLQT1. L'insertion d'une cassette *Neo* produit des fragments de 370 pb chez les souris KO, comparativement à 240 pb pour les souris WT.

L'extinction du canal par KO a aussi été vérifiée par des mesures fonctionnelles de courant en chambre de Ussing sur des cultures primaires de cellules des voies respiratoires de souris (Fig.20).

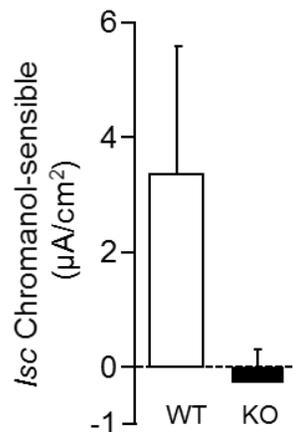


Figure 20. Mesure du courant potassique KvLQT1 basolatéral sensible au chromanol

Mesures en chambre de Ussing du courant stimulé (*Isc*) par l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) sensible au chromanol (inhibiteur de KvLQT1) au travers des membranes basolatérales de cellules épithéliales des voies respiratoires isolées des souris WT et KO (n=8) (Girault A., Chebli J. *et al.*, en préparation).

3.3 Modèle d'induction d'un œdème pulmonaire *in vivo* par la thiourée

La thiourée est un dérivé de l'urée utilisé pour créer un œdème pulmonaire aigu en augmentant la perméabilité vasculaire^{89,90}. La thiourée (Sigma-Aldrich) a été resuspendue dans du PBS (*phosphate-buffered saline*) (7,5 mg/mL) avant d'être injectée de manière intrapéritonéale (i.p.) chez la souris (500 µL) à une dose de 5 mg/kg⁸⁹. Le contrôle négatif consiste en l'injection i.p. de 500µL de PBS seul. Une heure avant l'injection de thiourée, les souris ont reçu une instillation intranasale (i.n.) de 50 µL de l'activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4µM, L-364,373, Tocris, Cedarlane, Burlington, ON, Canada) ou de DMSO (dilué dans du PBS, 1:1000, Diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich). Les souris ont été euthanasiées 4 heures après l'injection de thiourée et leurs poumons ont été récoltés. Brièvement, les souris ont été euthanasiées suite à une surdose de barbiturique (pentobarbital sodique, 75mg/kg) i.p. et exsanguinées suite à une incision de la veine cave inférieure. Le bloc cœur-poumons a été séparé pour isoler les poumons afin de poursuivre avec les mesures d'indice d'œdème pulmonaire^{91,90}.

3.4 Mesure de l'indice de l'œdème pulmonaire (ratio *Wet/Dry*)

Les poumons de souris prélevés ont immédiatement été pesés; cette valeur correspond à leur poids humide (*Wet*, W) (**Fig.21**). Ils ont ensuite été incubés au four à 95°C pendant 24 heures avant d'être à nouveau pesés; cette valeur correspond à leur poids sec (*Dry*, D). Le ratio du poids humide sur le poids sec (*Wet/Dry*, W/D) a alors été calculé donnant ainsi une mesure de l'indice de l'œdème pulmonaire^{90,92}.

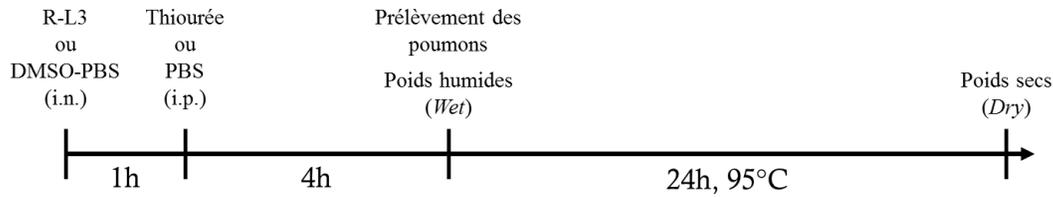


Figure 21. Ligne du temps des expériences de mesure de l'indice de l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin *in vivo*

3.5 Modèle d'induction de SDRA *in vivo* par la bléomycine

La bléomycine est un antibiotique intercalant, produisant des radicaux libres et brisant les liens d'ADN, utilisé comme traitement pour certains cancers ⁹³. La bléomycine est majoritairement utilisée pour les modèles de fibrose pulmonaire, mais ce modèle présente également une phase aiguë d'inflammation et d'œdème pulmonaire ^{57,93}. Les souris anesthésiées, par inhalation à l'isoflurane, ont reçu une instillation i.n. de 50 μ L de bléomycine (3U/kg, Pharmaceutical partners of Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada, resuspendue dans du PBS à 4 U/mL) ou de PBS seul (contrôle négatif) à l'aide d'une pipette automatique (d0) (**Fig.22**). Les animaux ont été sacrifiés 7 jours (d7) après l'instillation. Comme pour les essais avec la thiourée, les souris ont reçu un traitement (50 μ L, i.n.) de R-L3 ou de DMSO 1 heure avant l'instillation de bléomycine; ce traitement a été répété tous les 2 jours jusqu'au sacrifice des animaux à d7.

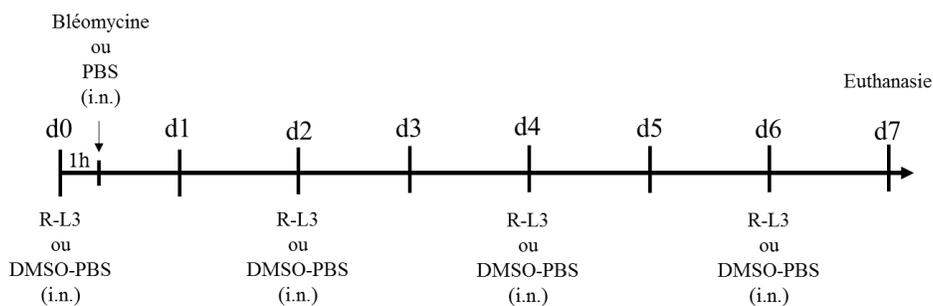


Figure 22. Ligne du temps du modèle de SDRA induit par la bléomycine dans un modèle murin *in vivo*

3.6 Lavages broncho-alvéolaires

Les lavages broncho-alvéolaires (BAL) ont été réalisés chez les souris ayant reçu des instillations de bléomycine. Après l'euthanasie, une trachéotomie a été effectuée afin de réaliser trois lavages consécutifs avec 1,0 mL de PBS. Les échantillons récoltés et conservés sur glace ont ensuite été centrifugés (8 min à 800 rpm et 4°C) afin de séparer les cellules infiltrées des fluides provenant des poumons. Les surnageants ont été séparés des culots pour récolter les protéines et les cytokines-chimiokines. Les protéines ont été dosées puis conservées à -80°C et les cytokines-chimiokines quantifiées par ELISA.

3.7 Compte total et différentiel de cellules de BAL

Le comptage total des cellules a été fait à partir du culot récolté des BAL et leur viabilité vérifiée à l'aide de la coloration par le bleu de Trypan (Gibco, Life Technologies Inc.). Par la suite, un comptage différentiel a été effectué après centrifugations au cytopspin (Shandon CytoSpin 3, ThermoScientific) et plusieurs séries de colorations des lames (Fisher HealthCare™ PROTOCOL™ Hema 3™ Manual Staining System et Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le décompte différentiel a été fait sur cinq champs aléatoires sur chaque lame à l'aide d'un microscope à champs clair au grossissement 20x (**Fig.23**).

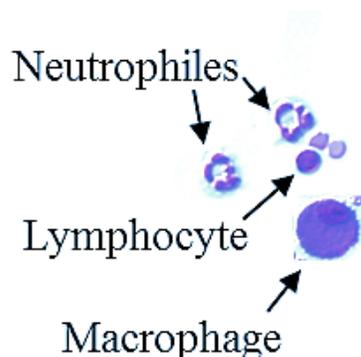


Figure 23. Comptage différentiel des cellules immunitaires

Photographie en microscopie optique de cellules immunitaires sur lames préalablement recueillies des BAL de souris et séparées au cytopspin pour comptage différentiel (grossissement 20x).

3.8 Dosage de cytokines-chimiokines

Les surnageants recueillis des BAL représentent les fluides alvéolaires des lavages broncho-alvéolaires. Les niveaux des cytokines et chimiokines suivantes ont été quantifiés par l'utilisation d'un Multiplex (eBioscience, San Diego, CA, USA) et selon les directives du fournisseur (eBioscience, San Diego, CA, USA) : IL-1 β , IL-6, IL-10, KC, MCP-1 et de TNF- α . Les plaques d'ELISA ont été lues grâce au système Bio-Plex® 200 (Biorad, Mississauga, ON, Canada).

3.9 Inclusion de poumons en paraffine

Après euthanasie, une trachéotomie a été effectuée pour instiller en i.n. de la formaline à 10% (Chapteck Inc., 500 μ L par souris) afin de prévenir un affaissement des alvéoles. Le bloc cœur-poumons a alors été prélevé et fixé tout d'abord dans une solution de formaline à 10%, puis de paraformaldéhyde à 4% (Electron Microscopy Sciences), puis déshydraté avec un gradient d'alcool et enfin avec du xylène (Chapteck Inc.) (Tableau I).

Tableau I. Série de bains pour tissus frais avant inclusion en paraffine

<i>Produits des bains</i>	<i>Température</i>	<i>Temps (heures)</i>
<i>Formaline 10%</i>	4°C	24
<i>Paraformaldéhyde 4%</i>	4°C	24
<i>Alcool 70%</i>	4°C	24

<i>Alcool 95%</i>	t.p.	3
<i>Isopropanol</i>	t.p.	3
<i>Xylène</i>	t.p.	3

Les poumons ont ensuite été inclus dans de la paraffine (Sigma-Aldrich) avant d'être coupés (épaisseur : 4µm) à l'aide d'un microtome (Leica Biosystems) et déposés sur lames. Afin d'assurer une bonne fixation, les lames ont été incubées à 42°C pour 18 heures. Le jour de l'expérience, les lames de poumons ont été déparaffinées et réhydratées dans des bains successifs de xylène et d'éthanol en gradient avant d'être colorées pour des analyses histologiques ou immunohistochimiques.

3.10 Histologie des sections de poumons

La coloration des sections de poumons au Trichrome de Masson a été effectuée suivant les protocoles standards (en collaboration avec l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie de l'Université de Montréal, IRIC). La coloration à l'hématoxyline/éosine a été réalisée grâce au kit Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit (ThermoScientific). Après montage des lames sous lamelle de verre dans du Cytifix (ThermoScientific), les lames ont été conservées à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les lames colorées ont été observées à l'aide d'un microscope Olympus (Olympus, Richmond Hill, ON, Canada caméra) à champ clair et d'une caméra ExiAqua (QImaging, Surrey, BC, Canada), aux grossissements 20x et 40x.

3.11 Immunofluorescence

Pour les expériences d'immunofluorescence sur tissus, les lames des sections de poumons déparaffinées ont été incubées 20 min dans une solution de démasquage (tampon citrate 10 mM : acide citrique 0,1 M (Sigma-Aldrich), citrate de sodium 0,1 M (Sigma-Aldrich)) avant d'être rincées au PBS. Les sections de poumons ont ensuite été perméabilisées avec une solution de Triton X-100 0,5% (Fisher Scientific Ltd.) diluée dans du PBS-FBS 10% (Gibco, Life Technologies Inc.)-BSA 0,5% (Sigma-Aldrich). Les coupes ont alors été saturées dans une solution de blocage pendant 1h30 avant d'être exposées à l'anticorps primaire de lapin anti-pro-SP-C de souris (1 :100, dans du PBS-BSA 0,5%, AB3786, Millipore, Etobicoke, ON, Canada) pendant 24 heures à 4°C. Après des lavages au PBS, un anticorps secondaire fluorescent anti-lapin (Alexa Fluor 488 (Life Technologie Inc.) a été ajouté pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante.

Pour les expériences d'immunofluorescence *in vitro*, les cellules ATII de rats (section 3.12) ont étéensemencées à basse confluence, sur des lamelles de verre. Trois jours suivant l'ensemencement, les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% diluée dans du PBS pendant 20 min et perméabilisées avec une solution de Triton X-100 0,1% diluée dans du PBS pendant 10 min à température ambiante. Les lamelles de verre ont alors été saturées dans une solution de blocage (PBS-BSA 5%) pendant 1h30 à température ambiante avant d'être exposées à l'anticorps primaire spécifique anti-KCa ou anti-intégrine- β 1 (Tableau IV) pendant 1h30 à température ambiante. Après des lavages au PBS, un anticorps secondaire fluorescent (anti-lapin Alexa Fluor 633; SAB4600404, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pour la détection de KCa3.1 et anti-souris Alexa

Fluor 488 (Life Technologie Inc.) pour la détection de l'intégrine- β 1 a été ajouté pendant 45 min à l'obscurité et à température ambiante.

Les lames de sections de poumons ou d'ATII ont finalement été incubées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich) pendant 10 min à l'obscurité à température ambiante afin de marquer les noyaux cellulaires. Des photographies en fluorescence ont été réalisées à l'aide d'une caméra ExiAqua connectée à un microscope Olympus, à grossissement 40x. Les images ont finalement été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.12 Isolation et culture primaire des cellules alvéolaires murines de type II

Les cellules alvéolaires de types II (ATII) ont été isolées à partir de poumons de rats mâles adultes Sprague-Dawley (âgés de 6 à 7 semaines) en suivant un protocole déjà bien établi au laboratoire^{37,61,94,95,79}. Brièvement, les poumons ont été perfusés et soumis à plusieurs lavages avec des solutions physiologiques afin d'éliminer les cellules sanguines et les macrophages alvéolaires, avant de procéder à une digestion enzymatique avec une solution d'élastase (4 U/mL, Worthington, Lakewood, NJ, USA) pendant 30 min.

Les ATII ont aussi été récoltées à partir de poumons de souris WT ou KO pour KvLQT1 (âgées de 7 à 10 semaines). Après euthanasie, les poumons ont été lavés au PBS (1000 μ L) grâce à une trachéotomie avant d'être traités à l'élastase (30 U/mL) pendant 45 min.

Par la suite, les poumons de rats ou de souris ont été finement broyés afin d'obtenir une suspension cellulaire qui a ensuite été filtrée. La purification des cellules alvéolaires a alors été obtenue grâce à une technique d'adhésion différentielle, soit 1 heure d'incubation sur un pétri préalablement recouvert d'une solution d'IgG (Sigma-Aldrich)⁹⁶. Cette méthode,

qui retient les macrophages, permet d'augmenter la proportion d'ATII dans la suspension cellulaire jusqu'à 86%^{95,97}.

Pour l'isolation d'ATII de souris, un traitement de lyse de globules rouges (*ACK lysis* : NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7.4) a été fait sur les culots cellulaires recueillis pendant 5 min sur glace, avant d'être neutralisé avec du FBS.

La suspension cellulaire d'ATII (rats ou souris) a finalement étéensemencée sur différents supports de plastique, soit des pétris (Corning, Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON, Canada) ou des plaques (Corning, Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON, Canada) ainsi que sur des filtres perméants (0.33 cm², ThinCerts-TC inserts, Greiner Bio-one; MJS Biolynx, Brockville, ON, Canada). Les cellules ont été cultivées dans un milieu essentiel minimum (MEM; Gibco, Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) enrichi à 10 % de FBS, de gentamicine (0,08 mg/L, Gibco, Life Technologies Inc.), de sepra (3 µg/mL de trimethoprime + 17 µg/mL de sulfamethoxazole), de 0,2 % de bicarbonate de sodium (NaHCO₃, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), d'HEPES 10 mM (Hyclone, Fisher Scientific Ltd.) et de L-glutamine à 2 mM (Gibco, Life Technologies Inc.)^{61,95}. Après 3 jours de culture, ce milieu a été remplacé par le même milieu MEM-10% FBS, mais exempt de sepra.

3.13 Transfections *in vitro* de *small interfering* (si)RNA

Les cellules ATII en suspension ont été transfectées après leur isolation (d0), à l'aide d'une combinaison de Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) et du siRNA contrôle négatif (Universal negative control) ou des siRNA du canal KCa3.1 (Sigma-Aldrich)⁷⁹. Après 5 heures de transfection, les cellules ont étéensemencées dans du milieu MEM-10% FBS-sepra frais sur des pétris de 35 mm préalablement recouverts ou non de fibronectine (10

μL de fibronectine/mL de PBS, Sigma-Aldrich), puis cultivées pendant 3 à 4 jours (d3, d4). L'efficacité de la transfection et de l'extinction de l'expression du canal KCa3.1 a été mesurée par PCR.

3.14 Réactions en chaîne par polymérase (PCR)

L'ARN total des cellules ATII a été extrait à l'aide d'une solution de TRIzol (Life Technologies Inc.); 5 μg d'ARN ont été utilisés pour la PCR. Brièvement, la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) a été catalysée par l'enzyme de transcription inverse MMLV (RT, Life Technologies Inc.) en présence d'oligonucléotides oligodT (Invitrogen, Life Technologies Inc.)⁷⁹. L'amplification des ADNc a été effectuée à l'aide de l'enzyme polymérase Taq (Life Technologies Inc.) et des amorces spécifiques des gènes d'intérêt (Tableau II) : le canal KCa3.1 et l'actine-β du rat afin de normaliser les produits de transcription :

Tableau II. Amorces des gènes utilisées pour la PCR

Gène	Sens	Anti-Sens	Amplicon
KCa3.1	5' GCT GTT CAT GAC TGA CAA CG 3'	5' CAT AGC CAA TGG TCA GGA AC 3'	500-pb
actine-β	5' CTA AGG CCA AC CGT GAA AAG 3'	5' GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC 3'	311-pb

Les séquences nucléotidiques des amorces ont été conçues dans l'optique d'éviter l'amplification d'ADN génomique en ciblant des exons distincts. L'amplification par transcription inverse (RT-PCR) a été réalisée suivant un protocole bien établi au laboratoire^{37,95,98}. Les produits amplifiés par la RT-PCR ont été séparés sur gel d'agarose et révélés à

l'aide de SYBR Safe (Life Technologies Inc.). Les signaux ont été détectés à l'aide d'un Typhoon Gel Imager (Typhoon TRIO variable mode imager, General Electric Healthcare) et le logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics, Baie d'Urfé, QC, Canada) a permis de faire l'analyse pour la quantification^{37,95,98}.

3.15 Réactions en chaîne par polymérase quantitative (qPCR)

L'ARN total des poumons de souris traitées à la thiourée a été extrait à l'aide d'une solution de TRIzol ; 1 µg d'ARN a été utilisé pour la PCR. La synthèse d'ADNc a été réalisée comme décrit précédemment. Pour chaque échantillon de poumons de souris, 2 ng d'ADNc ont été utilisés pour la qPCR. Brièvement, l'amplification a été réalisée avec du SYBR Green *PCR Master Mix* (Biorad) à l'aide du Rotor-Gene Q *real time cycle* (Qiagen Canada, Toronto) en suivant les instructions du manufacturier. Les réactions ont été réalisées en triplicata pour chaque échantillon; 3 µL d'ADNc total ont été ajoutés au mélange 2x *Universal PCR* avec les amorces spécifiques à 7,5 µM (Tableau III), pour un volume final de 15 µL. La qPCR a été répétée sur 40 cycles : 95 °C pendant 10 min (pré-PCR), 40 cycles de 95 °C pendant 10 s, 60 °C pendant 15 s et 72 °C pendant 20 s et une élévation incrémentée de 72 à 95°C avec + 1°C. Les amorces spécifiques des gènes d'intérêts, soit la sous-unité α -ENaC, la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ et la HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*), afin de normaliser les produits de transcription, ont été utilisées :

Tableau III. Amorces des gènes utilisées pour la qPCR

Gène	Sens	Anti-Sens	Amplicon
α-ENaC	5' TCC AGT GTA CGC GAC AAC 3'	5' CTG GTT GCA CAG TTG GAA GC 3'	139-pb
Na⁺/K⁺/ATPase	5' CAG CGC TGG GAT TAA GGT CA 3'	5' CTC TGG GGT TCA CCT GGT TC 3'	155-pb
HPRT	5' CCT CAC TGC TTT CCG GAG CGG 3'	5' CGC TAA TCA CGA CGC TGG GAC TG 3'	118-pb

L'expression relative des ARNm de l' α -ENaC et de la pompe Na⁺/K⁺/ATPase a été estimée par le nombre de copies (*Rotor-gene 6000 software*) et normalisée au nombre de copies du gène HPRT.

3.16 Migration cellulaire

Des essais de migration en chambres de type Boyden ont été réalisés afin d'évaluer la migration cellulaire en 3-dimensions, tel que décrit précédemment au laboratoire ^{5,79,13}. Brièvement, les cellules ATII préalablement transfectées ont été séparées à d3 de culture par un traitement à la trypsine-EDTA (0.05 %, Gibco, Life Technologies Inc.) (**Fig.24**). Une fois remises en suspension dans du MEM, les ATII ont étéensemencées à raison de 75 000 cellules dans le compartiment supérieur de la chambre de type Boyden (pores de 8 μ M) ; le compartiment inférieur contenant du milieu MEM seul. Après 18 heures de migration, les chambres ont été lavées avec du PBS, puis traitées avec une solution de paraformaldéhyde 4% afin de fixer les cellules. Une coloration à l'hématoxyline (Sigma-Aldrich) a ensuite été effectuée. Les cellules n'ayant pas migré dans le compartiment du bas au cours des 18 heures ont été éliminées grâce à un coton-tige (Fisher Scientific Ltd.) passé sur le côté supérieur des chambres. Le compte total des cellules ayant migré et se

retrouvant sur la partie inférieure du filtre a été fait de manière randomisée (5 champs aléatoires), à l'aide d'un microscope à lampe inversée (grossissement de 20x).

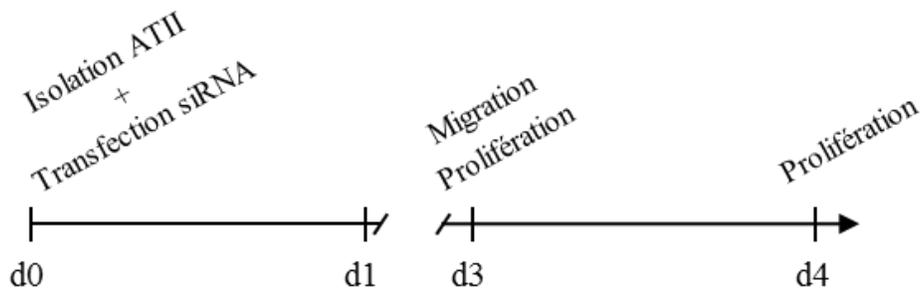


Figure 24. Ligne du temps des expériences sur cellules épithéliales alvéolaires de rat
Chronologie de la culture et des expériences des cellules ATII de rats transfectées des siRNA contrôles ou dirigés contre le canal KCa3.1.

3.17 Prolifération cellulaire

Les cellules transfectées avec les siRNA de KCa3.1 ou les siRNA contrôles ont étéensemencées dans des pétris de 35 mm à faible densité ($50\ 000/\text{cm}^2$) recouverts ou non de fibronectine ⁷⁹. Au 3^{ème} jour de culture (d3), les cellules transfectées ont été séparées suite à un traitement à la trypsine-EDTA. La viabilité cellulaire a été vérifiée par la coloration au bleu de Trypan et le compte total de cellules vivantes a été fait. La prolifération cellulaire a aussi été mesurée à d4.

3.18 Réparation de plaies mécaniques

Au 4^{ème} jour de culture, les monocouches de cellules ATII,ensemencées sur support de plastique et arrivées à environ 95% de confluence, ont été lésées mécaniquement à l'aide

d'un embout de pipette P10 Gilson (6 plaies/pétris ou 3 plaies/puits de plaques) suivant un protocole déjà établi et hautement reproductible^{59,61,60,99-101}. Immédiatement après que les plaies aient été effectuées (t0), les monocouches cellulaires lésées ont été lavées pour enlever tous résidus cellulaires. Des photographies en champs clair (grossissement de 4x) des plaies ont été prises à t0 et à différents temps au cours de la réparation afin de mesurer la taille des plaies et de calculer les vitesses de réparation⁹⁹. Afin de s'assurer de prendre la photographie au même endroit de chaque plaie au cours du temps, une marque a été faite sur l'envers des supports de plastique. La durée nécessaire pour la réparation des plaies varie de 6 à 24 heures selon les types d'ATII (rats ou souris). La surface des plaies au fil du temps a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et convertie en vitesse de réparation ($\mu\text{m}^2/\text{h}$).

3.19 Extraction et dosage protéiques

Les protéines ont été extraites des cellules ATII à l'aide d'un tampon de lyse cellulaire (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, Triton X-100 1% (Fisher Scientific Ltd.), SDS 0,1% (Bioshop Canada Inc., Burlington, ON, Canada), NaCl 150 mM (ACP, Montréal, QC, Canada), 1 pastille d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche Applied Science, Laval, QC, Canada)). Les lysats cellulaires ont été transférés sur glace pendant 30 min et centrifugés à 12 000 rpm à 4°C pendant 15 min. Les surnageants ont été récupérés et les protéines dosées par la méthode de Bradford.

3.20 Co-immunoprécipitation

Les expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées à partir des protéines isolées des cellules ATII de rats. Les protéines ont été extraites dans une solution tampon #1 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, Nonidet P40 1 % et désoxycholate de sodium 0.5 %) d'un kit d'immunoprécipitation (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) suivant les instructions du fournisseur. Les lysats obtenus ont été homogénéisés puis séparés par centrifugation. Un pré-lavage a été effectué à l'aide de 50 µL de 50% de suspension de billes d'agarose protéine-A (protein A, Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) pendant 3 heures puis les lysats ont été récoltés. L'immunoprécipitation a été réalisée avec l'anticorps d'intérêt (1:100) (Tableau IV) pendant 1 heure à 4°C ¹⁰².

Tableau IV. Anticorps utilisés pour les immunoprécipitations

<i>Protéine ciblée</i>	<i>Anticorps</i>	<i>Espèce</i>
<i>Intégrine-β1</i>	Anti-CD29, 610467, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	Souris
<i>KCa3.1</i>	APC-064, Alomone Labs, Jerusalem, Israel	Lapin
<i>EGFR</i>	#2232S ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA	Lapin

Le complexe antigène-anticorps a ensuite été précipité avec la suspension de billes protéine A (50 µL) pendant 18 heures à 4°C. Une série de lavages a ensuite été faite sur le complexe immunoprécipité. Après deux lavages à l'aide de la solution #1, deux lavages avec le tampon #2 (NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, Nonidet P40 0.1 %, et désoxycholate de sodium 0.05 %) et un lavage à l'aide du tampon #3 (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, Nonidet P40 0.1 % et désoxycholate de sodium 0.05 %), le complexe protéique a été centrifugé et élué à l'aide de 50 µL de *SampleBuffer* 2X (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6.8, SDS 2%, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0.2 %, β-mercaptoéthanol 4 % (Sigma-Aldrich)).

3.21 Immunobuvardage (type *Western Blot*)

Après extraction, les protéines ont été dénaturées pendant 5 min à 95°C à l'aide de *SampleBuffer* 2X. Elles ont ensuite été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (7,5 %) et transférées sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada) en respectant le protocole établi au laboratoire^{61,37}. Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de blocage avant d'être incubées avec les anticorps primaires voulus (Tableau V). Après lavage, les membranes ont été incubées dans des solutions contenant les anticorps secondaires couplés à la HRP (*horse raddish peroxydase*) pendant 1 h. L'intensité des bandes a ensuite été analysée et quantifiée par normalisation à l'actine-β à l'aide du logiciel MultiGauge (Fujifilm).

Tableau V. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunobuvardages

<i>Protéine ciblée</i>	<i>Anticorps</i>	<i>Espèce</i>
<i>Intégrine-β1</i>	Anti-CD29, 610467, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	Souris
<i>KCa3.1</i>	APC-064, Alomone Labs, Jerusalem, Israel	Lapin
<i>EGFR</i>	#2232S ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA	Lapin
<i>Actine-β</i>	#4968S ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Lapin
<i>Anti-lapin</i>	#7074 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Chèvre
<i>Anti-souris</i>	AP-308P; Millipore, Etobicoke, ON, Canada	Chèvre

3.22 Statistiques

La moyenne \pm l'erreur standard (*standard error of the mean* (SEM)) des différentes valeurs est représentée sur les différents graphiques. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5 pour Windows (*GraphPad software*, San Diego, CA, USA); des tests de Wilcoxon *signed-rank* ont été réalisés pour les valeurs non-paramétriques de populations différentes et des tests Mann-Whitney pour les hypothèses non-paramétriques au sein de la même population. Les différences ont été considérées comme étant significatives lorsque $p < 0,05$.

Chapitre 4 – Résultats

4.1 Rôle du canal KCa3.1 dans les mécanismes de régulation de la réparation de l'épithélium alvéolaire

Afin de mesurer l'impact de la modulation du canal KCa3.1 sur les processus de réparation de l'épithélium, plusieurs paramètres, tels que la vitesse de réparation, la prolifération ainsi que la migration cellulaire, ont été mesurés.

4.1.1 Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KCa3.1 sur la réparation épithéliale

L'impact de l'inhibition pharmacologique du canal KCa3.1 a tout d'abord été étudié. Des plaies mécaniques ont été effectuées sur des monocouches de cellules ATII de rats en présence ou non d'un inhibiteur pharmacologique sélectif à KCa3.1, le TRAM-34 (5 ou 10 μM). La vitesse de réparation des plaies a été calculée sur une période de 24 h, suivant un protocole déjà bien établi au laboratoire ^{59-61,99-101} (**Fig.25A**).

Sur les pétris non préalablement recouverts de fibronectine (non recouvert), la vitesse de réparation ne semble pas être affectée par l'ajout du TRAM-34 (5 et 10 μM), aucune différence significative n'a été observée (**Fig.25B**). Les cellules cultivées sur fibronectine (Fn) (10 μL de fibronectine/mL de PBS) et en absence de TRAM-34 montrent, quant à elles, une vitesse de réparation significativement supérieure ($38,3 \pm 3,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) à celle sur pétris non recouverts ($30,5 \pm 3,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$). Cette augmentation ($7,8 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) de la vitesse de réparation sur matrice de Fn est en accord avec la littérature ⁸⁶. Celle-ci est toutefois en partie réduite en présence de TRAM-34. En effet, la vitesse de réparation des cellules diminue en présence de l'inhibiteur de manière dose-dépendante et atteint respectivement $32,9 \pm 1,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ et $25,8 \pm 3,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ en présence de 5 et 10 μM

de TRAM-34. Ces diminutions de vitesse de réparation sont significatives par rapport à la vitesse de réparation des cellules cultivées sur matrice de Fn et sans TRAM-34.

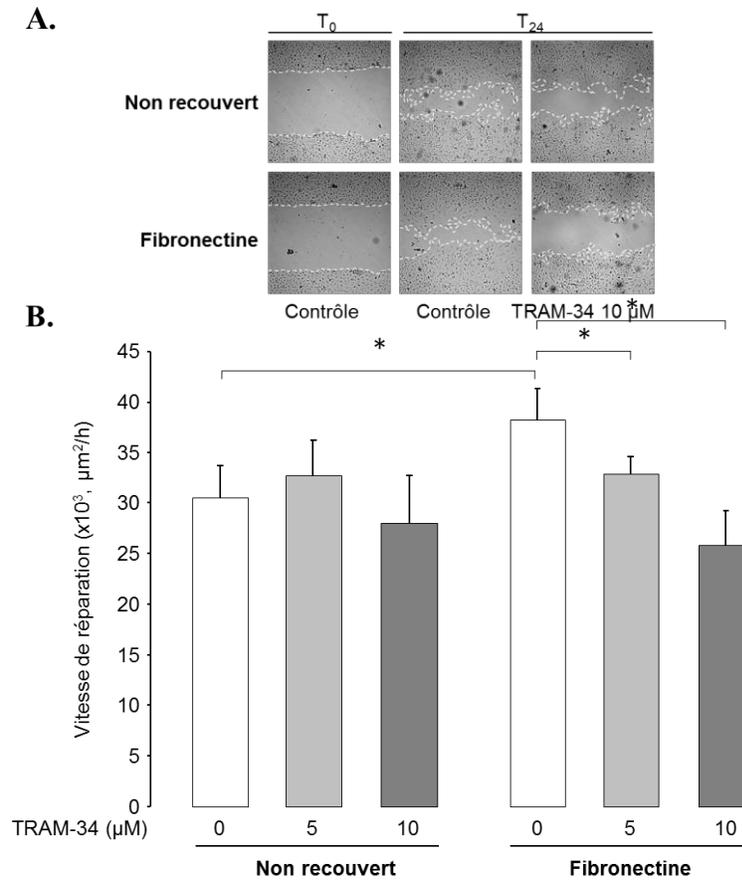


Figure 25. Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KCa3.1 sur la réparation des plaies des monocouches des cellules ATII de rats stimulée par la fibronectine

A. Photographies représentatives des plaies mécaniques sur les monocouches de cellules ATII de rats, cultivées en présence ou non (non recouvert) de fibronectine (Fn) et traitées ou non à l'inhibiteur du canal KCa3.1 (TRAM-34, 10 µM). Les photographies T₀ et T₂₄ ont été prises respectivement au moment suivant la formation de la plaie (pointillés) et 24 h après (grossissement de 4x). **B.** Vitesse de réparation de la monocouche de cellules lésées mécaniquement, cultivées ou non sur matrice de Fn et traitées ou non à l'inhibiteur du canal KCa3.1 (TRAM-34, 5 et 10 µM). La vitesse de réparation est calculée en µm²/h sur une période de 24 heures et comparée à la condition contrôle (absence de TRAM-34, 0 µM) (n=6, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, 2015).

4.1.2 Extinction du canal KCa3.1 par transfection de siRNA spécifiques

Pour confirmer le rôle du canal KCa3.1 dans les différents mécanismes de réparation, les cellules ATII de rats ont été transfectées avec des siRNA (*small interfering RNA*) dirigés contre KCa3.1 afin d'inhiber son expression.

L'efficacité de la transfection des siRNA a été vérifiée par amplification PCR (**Fig.26A**). Le niveau d'expression des ARNm extraits des cellules transfectées avec un siRNA contrôle (siContrôle) ou avec les siRNA dirigés contre KCa3.1 (siKCa3.1) a été quantifié par mesure de densitométrie des fragments d'ADN et rapporté en pourcentage par rapport à la condition contrôle. Une baisse significative d'environ 70% de l'expression de l'ARNm codant pour une séquence spécifique du canal KCa3.1 est observée dans les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre KCa3.1. Des tests de cytotoxicité ont démontré que la viabilité des cellules n'est pas affectée par la transfection (siContrôle ou siKCa3.1).

4.1.3 Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire

4.1.3.a Vitesse de réparation de la monocouche

Afin d'étudier le rôle du canal KCa3.1 dans les mécanismes de réparation épithéliale, la vitesse de réparation de monocouches cellulaires d'ATII de rats transfectées avec les siRNA dirigés contre KCa3.1 a été mesurée. En absence de matrice de Fn, l'extinction de KCa3.1 (siKCa3.1) n'a eu aucun effet sur la vitesse de réparation de plaies sur des monocouches d'ATII (**Fig.26B**). Par contre, les cellules transfectées par les siRNA de KCa3.1 et cultivées sur Fn voient leur vitesse de réparation diminuée significativement ($28,8 \pm 2,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) par rapport à la condition contrôle (siContrôle) ($33,9 \pm 1,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$).

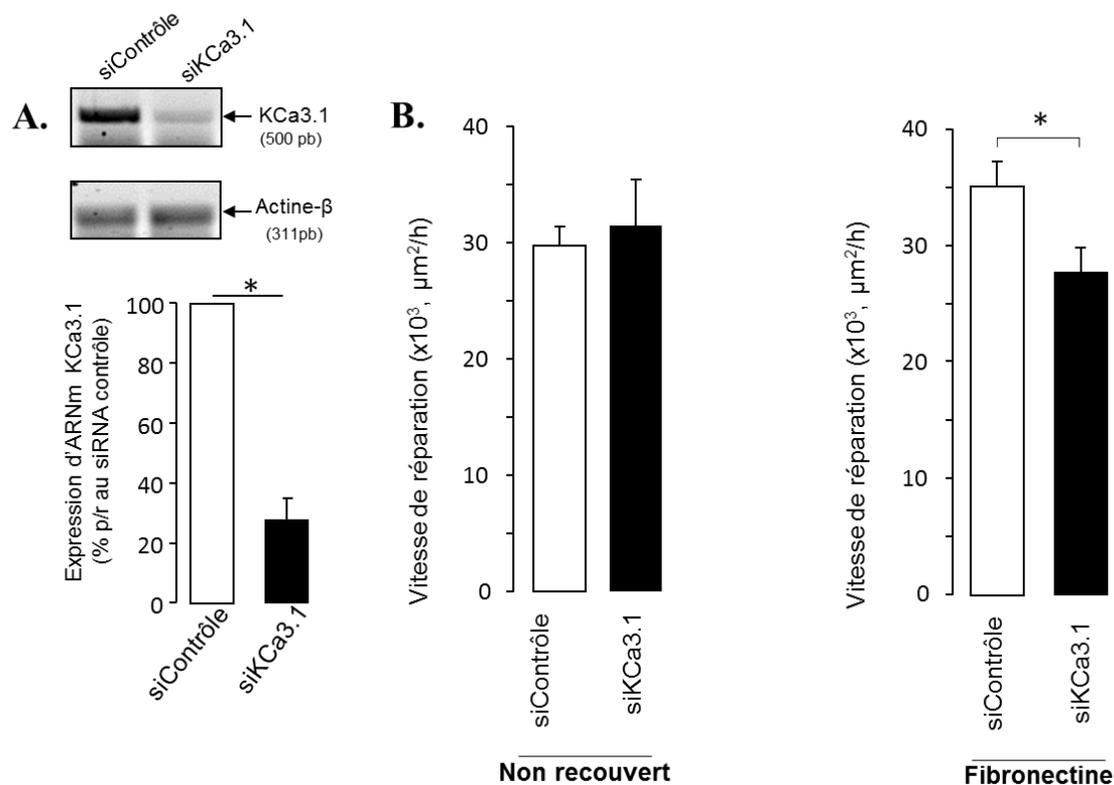


Figure 26. Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur la réparation des monocouches de cellules ATII de rats

A. Photographie représentative d'un gel d'agarose montrant les fragments d'ADN du canal KCa3.1 (500pb) ainsi que de l'actine-β (311pb) amplifiés par PCR obtenus à partir de cellules ATII transfectées avec le siRNA contrôle (siContrôle) ou les siRNA dirigés contre KCa3.1 (siKCa3.1). L'expression en ARNm des cellules transfectées avec le siRNA contrôle (siContrôle) ou les siRNA dirigés contre KCa3.1 (siKCa3.1) a été normalisée à l'actine-β rapportée en pourcentage par rapport au siContrôle (n=8, * p<0,05). **B.** Vitesse de réparation de plaies effectuées sur des monocouches de cellules ATII de rats lésées mécaniquement et transfectées avec des siRNA (siContrôle ou dirigé contre le canal KCa3.1, siKCa3.1). Les cellules ont été cultivées sur pétris non recouverts ou sur matrice de Fn. La vitesse de réparation est calculée en $\mu\text{m}^2/\text{h}$ sur une période de 24 h. (n=7, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, 2015).

4.1.3.b Prolifération cellulaire

La réparation épithéliale fait intervenir différents processus dont la prolifération et la migration cellulaire afin de générer un nouvel épithélium. Dans un premier temps, afin de vérifier si la modulation du KCa3.1 a un impact sur la prolifération des cellules, le décompte cellulaire des ATII a été réalisé 3 jours après la transfection avec les siRNA de KCa3.1 (**Fig.27**), dont l'absence de cytotoxicité avait préalablement été confirmée. Une faible diminution, toutefois non significative, de la prolifération des cellules a été observée en présence du siKCa3.1 sur matrice de Fn comparée aux cellules transfectées avec les siRNA contrôle.

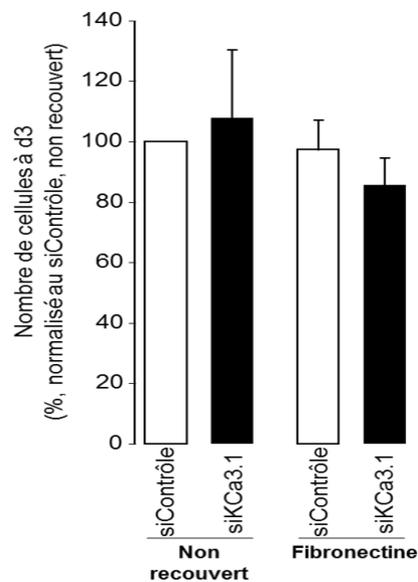


Figure 27. Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur la prolifération cellulaire des ATII de rats

Nombre de cellules ATII transfectées par des siRNA (siContrôle ou dirigés contre le canal KCa3.1, siKCa3.1) 3 jours après la transfection et l'ensemencement des cellules cultivées ou non sur matrice de Fn. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du nombre de cellules mesurées en condition contrôle (siContrôle) sur support non recouvert (n=14). (Girault A., Chebli J., *et al.*, 2015).

4.1.3.c Migration cellulaire

La migration cellulaire a été mesurée en 3-dimensions, en utilisant des chambres de migration de type Boyden. Nos données montrent tout d'abord que le recouvrement par la Fn a augmenté le nombre d'ATII transfectées ayant migré (561 ± 89 cellules / champ) comparativement au recouvrement de gélatine (condition contrôle, substrat qui ne se lie pas à l'intégrine) (308 ± 55 cellules / champ) (**Fig.28**). De plus, la migration cellulaire des ATII transfectées avec les siRNA dirigés contre KCa3.1 est significativement diminuée (253 ± 51 cellules / champ) par rapport à celle des ATII transfectés avec les siContrôle (561 ± 89 cellules / champ) dans les chambres recouvertes de Fn. Aucune différence n'a cependant été observée sur la migration entre les deux types de siRNA sans recouvrement de Fn (gélatine).

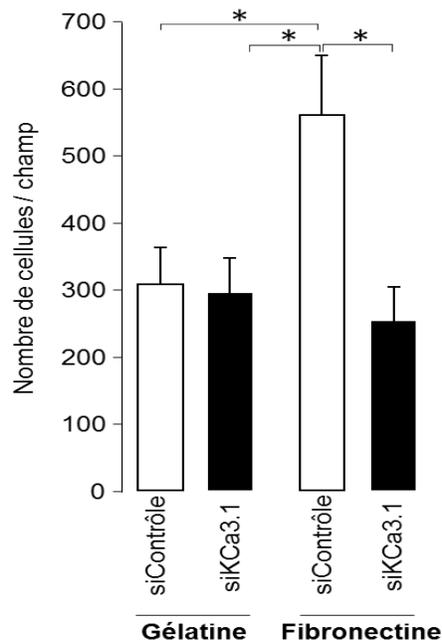


Figure 28. Effet de l'extinction du canal KCa3.1 par siRNA sur la migration cellulaire en 3-dimensions des ATII de rats

Nombre de cellules transfectées par des siRNA (siContrôle ou dirigés contre le canal KCa3.1, siKCa3.1) ayant migré au travers des chambres de type Boyden, recouvertes de gélatine (contrôle) ou de Fn, sur une période de 18 h (n=6, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, 2015).

4.1.4 Relation entre le canal KCa3.1, la matrice extracellulaire et l'intégrine-β1

Comme mentionné précédemment, afin de réparer un épithélium lésé et dénudé, les cellules ont besoin d'interagir avec les protéines de la matrice extracellulaire notamment *via* l'intégrine-β1^{79,86,103}. Les résultats présentés précédemment démontrent un lien fonctionnel possible entre le canal KCa3.1 et la fibronectine (un ligand de l'intégrine), entre autres pour la réparation épithéliale et la migration cellulaire. Afin d'étudier une possible relation protéique entre le canal KCa3.1 et l'intégrine-β1, deux approches ont été utilisées : des essais de co-localisation par immunofluorescence et par co-immunoprécipitation.

4.1.4.a Immunolocalisation

Au niveau intracellulaire, la détection de KCa3.1 (rouge) et de l'intégrine-β1 (vert) a été faite par immunofluorescence (**Fig.29**). Leur co-localisation a été confirmée (jaune) au niveau intra-cellulaire et de la membrane plasmique des ATII de rats.



Figure 29. Co-localisation du canal KCa3.1 et de l'intégrine-β1 exprimés dans les cellules ATII de rats

Photographies représentatives de la détection immunocytochimique du canal KCa3.1 (Alexa 633, rouge), de l'intégrine-β1 (Alexa 488, vert) et de la colocalisation (jaune) sur des cellules ATII de rats observées au microscope optique à fluorescence (grossissement 40x, échelle : 10 μm). (Girault A., Chebli J., *et al.*, 2015).

4.1.4.b Co-immunoprécipitation

En complément à l'immunofluorescence, la relation entre le canal KCa3.1 et l'intégrine- β 1 a été étudiée par co-immunoprécipitation. L'expression de KCa3.1 et de l'intégrine- β 1 dans des extraits protéiques de cellules ATII de rats a d'abord été confirmée par la révélation de l'immunobuvardage (**Fig.30**, Lysat total) : bandes à 105 et 120 kDa pour l'intégrine- β 1 (respectivement les protéines immatures et matures de l'intégrine- β 1) et à 51 kDa pour KCa3.1. Les immunoprécipitations ont ensuite été réalisées soit avec un anticorps sélectif de l'intégrine- β 1 (IP intégrine- β 1) ou de KCa3.1 (IP KCa3.1). Dans ces deux conditions, l'intégrine- β 1 et le canal KCa3.1 ont pu être détectés, suggérant une interaction entre ces deux types de protéines.

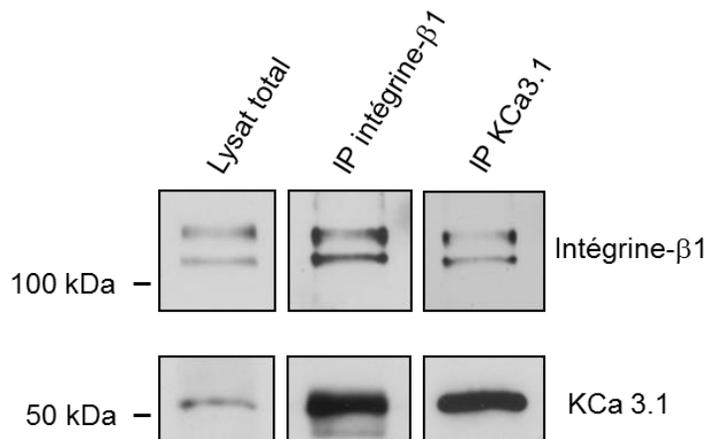


Figure 30. Co-immunoprécipitations du canal KCa3.1 et de l'intégrine- β 1 exprimés dans les cellules ATII de rats

Immunobuvardages des éluats des immunoprécipitations de KCa3.1 (IP KCa3.1) et de l'intégrine- β 1 (IP intégrine- β 1) sur protéines totales de cellules ATII de rats. Révélation de l'intégrine- β 1 (ligne du haut, 105-120 kDa) et du KCa3.1 (ligne du bas, 55 kDa). Le lysat total (colonne Lysat total) a été déposé en guise de contrôle. (Girault A., Chebli J., *et al.*, 2015).

4.1.5 Relation entre le canal KCa3.1 et le récepteur EGFR

Comme il a été montré précédemment, les canaux potassiques sont impliqués dans la régulation des mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire. Il a également été montré que cette régulation peut être modulée par les facteurs de croissances ^{59,60}. Au niveau de l'épithélium bronchique, l'activation par l'EGF de son récepteur (EGFR) entraîne la stimulation des processus de migration et de prolifération cellulaires, augmentant ainsi la vitesse de réparation épithéliale ⁶⁰.

Afin d'étudier une possible relation protéique entre les canaux potassiques KCa3.1 et le récepteur EGFR, une approche de co-immunoprécipitation a été utilisée.

L'expression de l'EGFR et du canal KCa3.1 dans des extraits protéiques totaux de cellules ATII de rats a été confirmée par la révélation de l'immunobuvardage (**Fig.31**, Lysat total) : bandes à 175 kDa pour l'EGFR et à 55 kDa pour KCa3.1. L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps sélectif de l'EGFR (IP EGFR). Dans ces deux conditions, l'EGFR et le canal KCa3.1 ont pu être détectés, suggérant une interaction entre ces protéines.

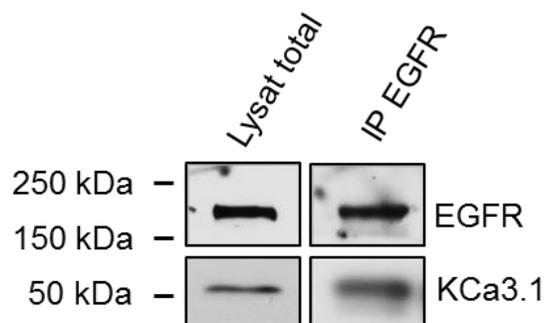


Figure 31. Co-immunoprécipitation de l'EGFR et du canal KCa3.1 exprimés dans les ATII de rats

Immunobuvardages des éluats de l'immunoprécipitation de l'EGFR (IP EGFR) sur protéines totales extraites de cellules ATII de rats. Révélation de l'EGFR (lignes du haut, 175 kDa) et de KCa3.1 (ligne du bas, 55 kDa). Le lysat total (colonne Lysat total) a été migré en guise de contrôle.

Contributions

Les précédents résultats (**Fig.25 à Fig.30**) sont décrits dans un article joint en annexe (voir *ANNEXE*) dont je suis co-auteur. Parmi les données de cet article, seuls les résultats auxquels j'ai pu contribuer ont été sélectionnés et présentés dans ce mémoire.

4.2 Rôle du canal KvLQT1 dans les processus physiopathologiques du SDRA

Précédemment, il a été montré au laboratoire que le canal potassique voltage-dépendant KvLQT1 est impliqué dans les différents mécanismes de réparation de l'épithélium *in vitro*⁹⁹. De plus, des études précédentes menées au laboratoire ont montré que la modulation du canal KvLQT1 régulaient la réabsorption ionique (*via* ENaC) et de fluides au travers des monocouches de cellules ATII de rats *in vitro*³⁷. Mon but était donc d'évaluer le rôle de KvLQT1 dans un modèle d'œdème pulmonaire (section 4.2.1) et dans un modèle de SDRA (section 4.2.2). La modulation du KvLQT1 a été réalisée par l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques (activateur : R-L3, 4 µM et inhibiteur : chromanol, 20 µM) sur des souris sauvages (WT) ou déficientes pour KvLQT1 (KO).

4.2.1 Modèle d'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin

Comme décrit dans l'introduction, l'œdème pulmonaire est un des paramètres physiopathologiques décrits du SDRA. Un modèle *in vivo* d'œdème pulmonaire induit par une injection de thiourée (i.p., 4h) a donc été utilisé, chez des souris⁹⁰.

4.2.1.1 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin

Afin de mesurer l'indice d'œdème pulmonaire, le ratio *Wet/Dry* (W/D) est calculé *via* le poids des poumons humides (avec liquide) et secs (sans liquide), selon une technique tirée de la littérature⁹⁰ et bien établie au laboratoire.

4.2.1.1.1 Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

Comme attendu, le ratio W/D augmente de manière significative suivant l'injection de thiourée ($5,55 \pm 0,18$) comparativement à la condition contrôle ($4,17 \pm 0,16$), indiquant le développement d'un œdème pulmonaire. Le ratio diminue significativement chez les souris ayant reçu un pré-traitement au R-L3 ($4\mu\text{M}$) ($5,03 \pm 0,13$), indiquant que l'activation de KvLQT1 pourrait prévenir le développement de l'œdème pulmonaire ou aider à sa résolution. Il est à noter que l'activation seule de KvLQT1 par le R-L3, soit sans induction d'œdème par la thiourée, n'engendre aucun changement significatif du W/D (**Fig32**).

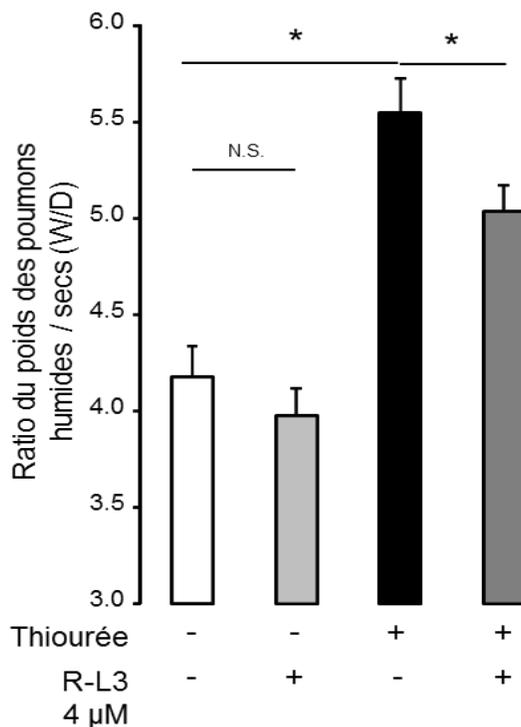


Figure 32. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans le modèle *in vivo*

Ratio du poids des poumons humides et secs (*Wet/Dry*, W/D) des souris WT en condition contrôle (-) ou suite à l'injection de thiourée (+) (i.p., 5 mg/kg), traitées (+) ou non (-) au R-L3 (i.n., $4\mu\text{M}$, 50 μL , 1h) (n= 4-11 par groupe) (* $p < 0,05$). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.1.1.2 Inhibition de l'activité du canal KvLQT1

Afin d'étudier l'impact de l'inhibition du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire, deux approches ont été choisies, soit l'inhibition pharmacologique par le chromanol (inhibiteur sélectif à KvLQT1) et un modèle de souris déficientes pour ce canal (KO).

4.2.1.1.2.a Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KvLQT1

Tout comme observé précédemment, la thiourée provoque une augmentation du ratio W/D ($5,46 \pm 0,41$) de manière significative comparativement au ratio W/D de la condition contrôle ($4,22 \pm 0,12$) (**Fig.33**). Le traitement à l'inhibiteur de KvLQT1 (chromanol $20\mu\text{M}$) n'a eu aucun effet de base sur le ratio W/D ($4,32 \pm 0,03$) ni suite à l'injection de thiourée ($5,41 \pm 0,22$).

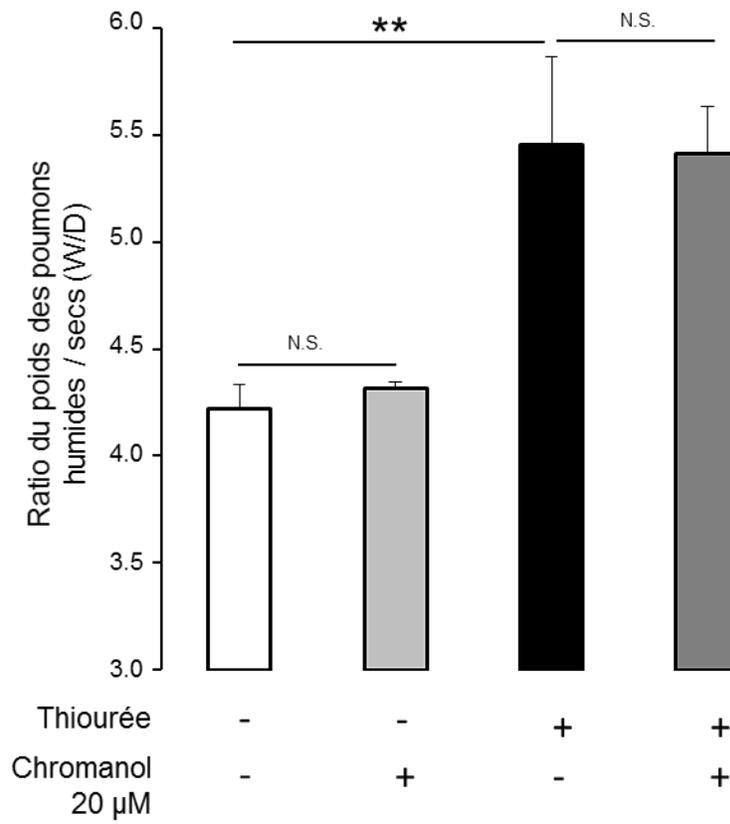


Figure 33. Effet de l'inhibition pharmacologique du KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans le modèle *in vivo*

Ratio du poids des poumons humides et secs (*Wet/Dry*, W/D) des souris WT en condition contrôle (-) ou suite à l'injection de thiourée (+) (i.p., 5 mg/kg), traitées (+) ou non (-) au chromanol (i.n., 20 μ M, 50 μ L, 1h) (n= 4-5 par groupe) (* p<0,05, **p<0,01). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.1.1.2.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

L'œdème pulmonaire a aussi été évalué chez les souris déficientes pour le canal KvLQT1 (KO) afin de confirmer les résultats obtenus précédemment. La thiourée a provoqué une augmentation de l'indice d'œdème pulmonaire chez les souris KO ($5,07 \pm 0,18$, $p < 0,05$) comparativement au PBS (**Fig.34**). Par contre, le ratio W/D est plus faible que celui retrouvé chez les souris WT (**Fig32**). L'effet bénéfique de l'activation du canal KvLQT1 par le R-L3 sur l'œdème pulmonaire (**Fig32**) est prévenu dans les souris KO.

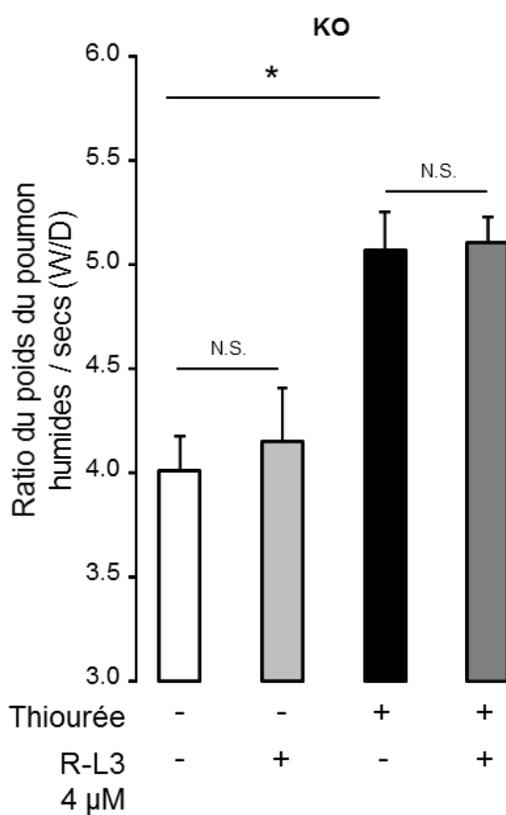


Figure 34. Effet de l'extinction du KvLQT1 par KO sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée dans le modèle *in vivo*

Ratio du poids des poumons humides et secs (*Wet/Dry*, W/D) des souris KO en condition contrôle (-) ou suite à l'injection de thiourée (+) (i.p., 5 mg/kg), traitées (+) ou non (-) au R-L3 (i.n., 4μM, 50 μL, 1h) (n= 4-11 par groupe) (* $p < 0,05$). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.1.2 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'expression génomique de canaux ioniques dans un modèle d'œdème pulmonaire induit par la thiourée *in vivo*

Comme mentionné dans l'introduction, la modulation des canaux potassiques peut influencer l'expression d'autres transporteurs ioniques *in vitro*, tel le canal sodique ENaC³⁷.

Afin d'étudier l'impact de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur l'expression génomique des transporteurs ioniques dans le modèle d'œdème pulmonaire induit par la thiourée, les niveaux d'ARNm codant pour le canal ENaC (α -ENaC) et pour la pompe Na⁺/K⁺/ATPase ont été mesurés. Ces deux protéines ont un rôle prépondérant dans le transport des ions et fluides. Les niveaux d'ARNm ont été mesurés par une analyse de PCR quantitative (qPCR), à partir des poumons de souris WT et KO pour KvLQT1.

4.2.1.2.a Étude de l'expression des ARNm codant pour l' α -ENaC

Les résultats semblent montrer une légère baisse non significative des niveaux d'expression des ARNm de la sous-unité α -ENaC chez les souris WT et KO traitées à la thiourée (respectivement $1,34 \pm 0,3$; $1,32 \pm 0,2$) comparées aux souris WT et KO contrôles (respectivement $1,69$ (n=1) ; $1,74 \pm 0,4$) (**Fig.35**). Cette baisse est retrouvée dans les souris WT traitées au R-L3 ($1,13 \pm 0,3$).

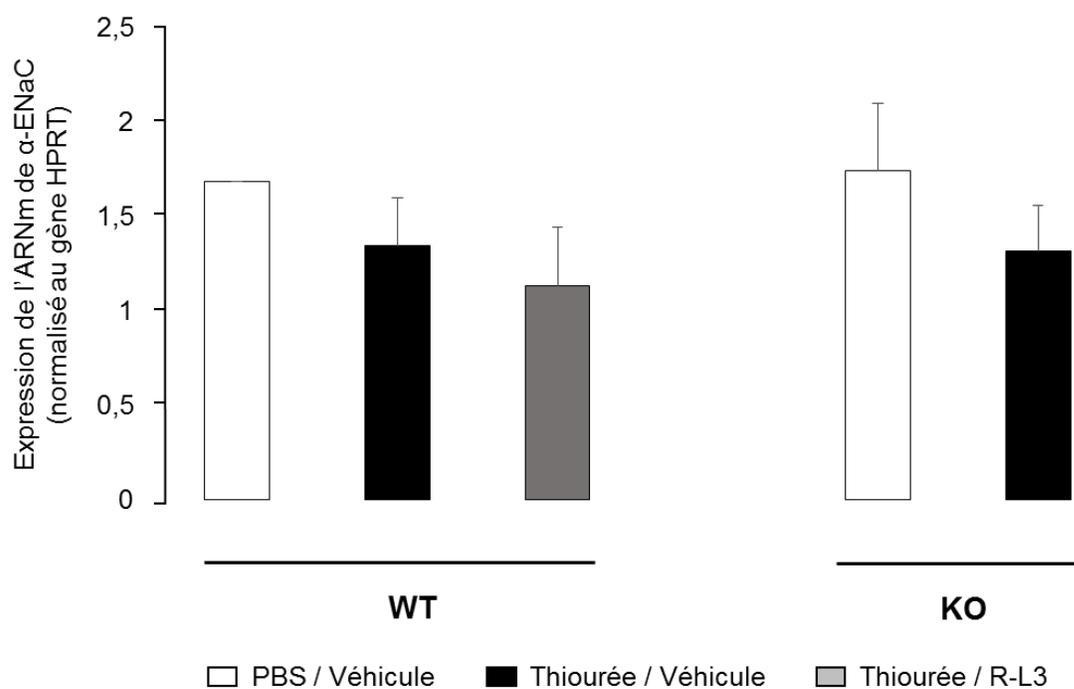


Figure 35. Effet de la thiourée et de la modulation du canal KvLQT1 sur l'expression des ARNm codant pour α -ENaC *in vivo*

L'expression des ARNm codant pour α -ENaC des poumons de souris WT et KO pour le canal KvLQT1 en condition contrôle (PBS/Véhicule) ou suite à l'injection de thiourée (i.p., 5 mg/kg), traitées ou non (Véhicule) au R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) a été calculée en nombre de copies et normalisée à la HPRT (n=1 (WT, PBS/Véhicule) ; n=4).

4.2.1.2.b Étude de l'expression des ARNm codant pour la pompe Na⁺/K⁺/ATPase

Les résultats montrent que les niveaux d'expression des ARNm de la pompe Na⁺/K⁺/ATPase chez les souris WT ($1,11 \pm 0,007$) ne sont pas modulés par la thiourée ($1,08 \pm 0,03$) ni par le R-L3 ($1,03 \pm 0,05$) (**Fig.36**). Il y a aussi une absence d'effet de modulation de l'expression de la pompe Na⁺/K⁺/ATPase chez les souris KO ($1,11 \pm 0,06$) par la thiourée ($1,03 \pm 0,04$).

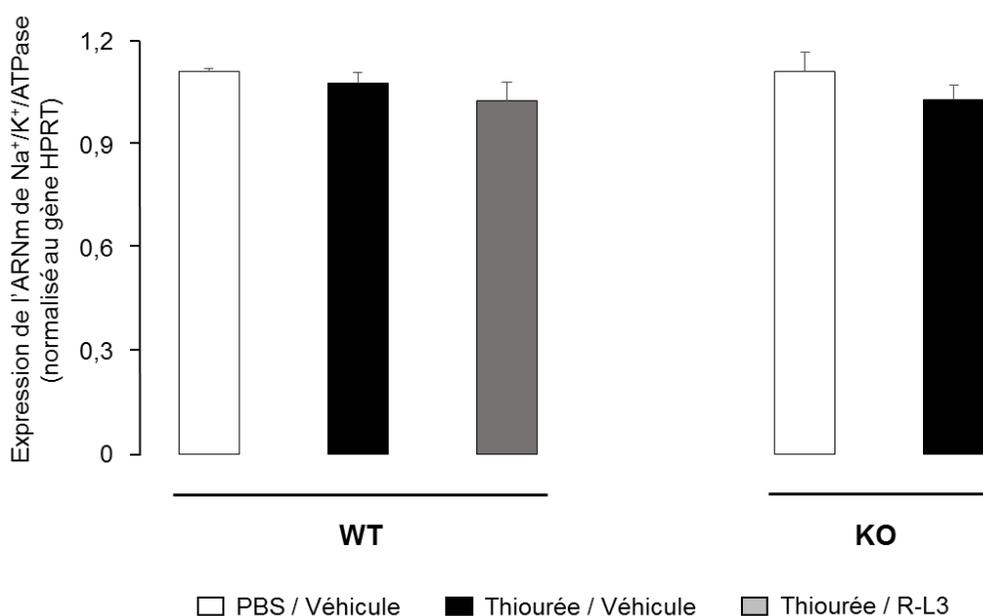


Figure 36. Effet de la thiourée et de la modulation du canal KvLQT1 sur l'expression des ARNm codant pour la pompe Na⁺/K⁺/ATPase *in vivo*

L'expression des ARNm codant pour la pompe Na⁺/K⁺/ATPase des poumons de souris WT et KO pour le canal KvLQT1 en condition contrôle (PBS/Véhicule) ou suite à l'injection de thiourée (i.p., 5 mg/kg), traitées ou non (Véhicule) au R-L3 (i.n., 4μM, 50 μL, 1h) a été calculée en nombre de copies et normalisée à la HPRT (n=2-4).

4.2.1.3 Analyse histologique des poumons de souris avec un œdème pulmonaire induit par la thiourée dans un modèle murin

Afin de visualiser les effets de la modulation de KvLQT1, une analyse histologique des poumons de souris a été réalisée avec l'aide d'un pathologiste, Dr L. Gaboury (Institut de recherche en immunologie et en oncologie, IRIC, Université de Montréal). Les coupes de sections de poumons des souris WT et KO, injectées ou non avec de la thiourée en présence ou non avec le R-L3, ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (**Fig.37**). Ni l'administration de la thiourée ni l'activation de KvLQT1 n'a eu d'effets notables sur la structure histologique des poumons des souris (WT et KO).

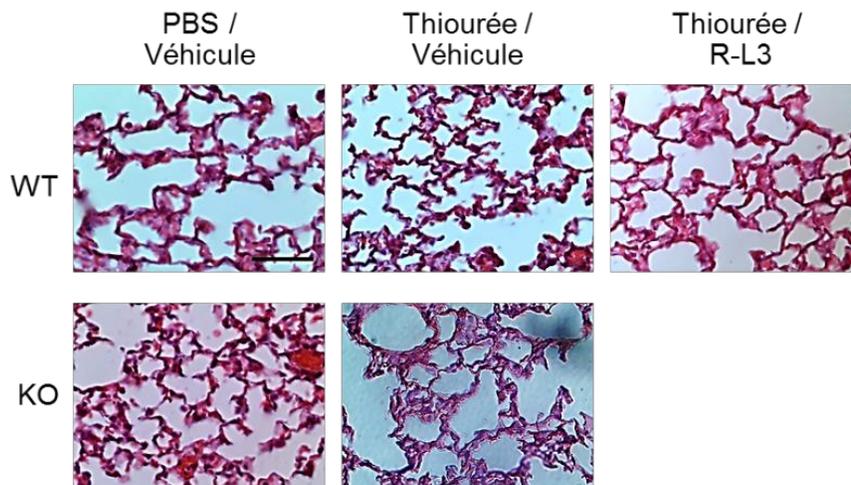


Figure 37. Effet de la thiourée sur la structure histologique des poumons de souris

Photographies optiques en champs clairs de sections de poumons de souris sauvages (WT) et déficientes pour le canal KvLQT1 (KO), ayant reçu une injection de thiourée (i.p., 5 mg/kg) ou PBS, pré-traitées ou non (Véhicule) avec l'activateur R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h). La coloration a été effectuée à l'hématoxyline-éosine (grossissement à 40x, échelle : 25 μ M).

4.2.2 Modèle de SDRA induit par la bléomycine dans un modèle murin

Afin de poursuivre plus en profondeur l'évaluation du rôle du canal KvLQT1 sur la résolution du SDRA, un autre modèle *in vivo*, plus complet que celui de la thiourée, a été utilisé. L'instillation intranasale de bléomycine (i.n., 3U/kg), composé intercalant, est décrite comme un modèle représentatif de la pathophysiologie du SDRA : une première phase aiguë (d0 à d12, suivant l'administration de bléomycine) présentant des dommages au niveau de l'épithélium alvéolaire, le développement d'un œdème pulmonaire et une réponse inflammatoire exacerbée ainsi qu'une seconde phase (d12 à d21) avec le développement de fibrose¹⁰⁴. La majorité des expériences ont été menées sur 7 jours (d7) (12 jours pour les exceptions, lorsqu'indiqué) sur des souris sauvages (WT) ou déficientes pour le canal KvLQT1 (KO).

4.2.2.1 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la bléomycine dans le modèle murin de SDRA

4.2.2.1.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

7 jours après l'instillation i.n. de bléomycine, on note non seulement une augmentation du poids humides des poumons des souris (**Fig.38A**, $143,74 \pm 6,47$ mg vs $285,63 \pm 9,30$ mg), mais également du poids sec (**Fig.38B**, $32,91 \pm 0,98$ mg vs $54,54 \pm 1,20$ mg). L'augmentation du poids des poumons secs (pouvant notamment être due à l'infiltration cellulaire liée au modèle de bléomycine) affecte alors le ratio W/D (**Fig.38C**) qui n'est donc pas représentatif de l'indice d'œdème pulmonaire. L'activation du canal KvLQT1 par

le R-L3, administré i.n. aux 2 jours tend à diminuer les poids humides (non-significatif) ($277,95 \pm 11,69$ mg) et les poids secs (significatif) ($49,07 \pm 1,47$ mg), mais n'a, en conséquence, pas d'effet sur le ratio W/D.

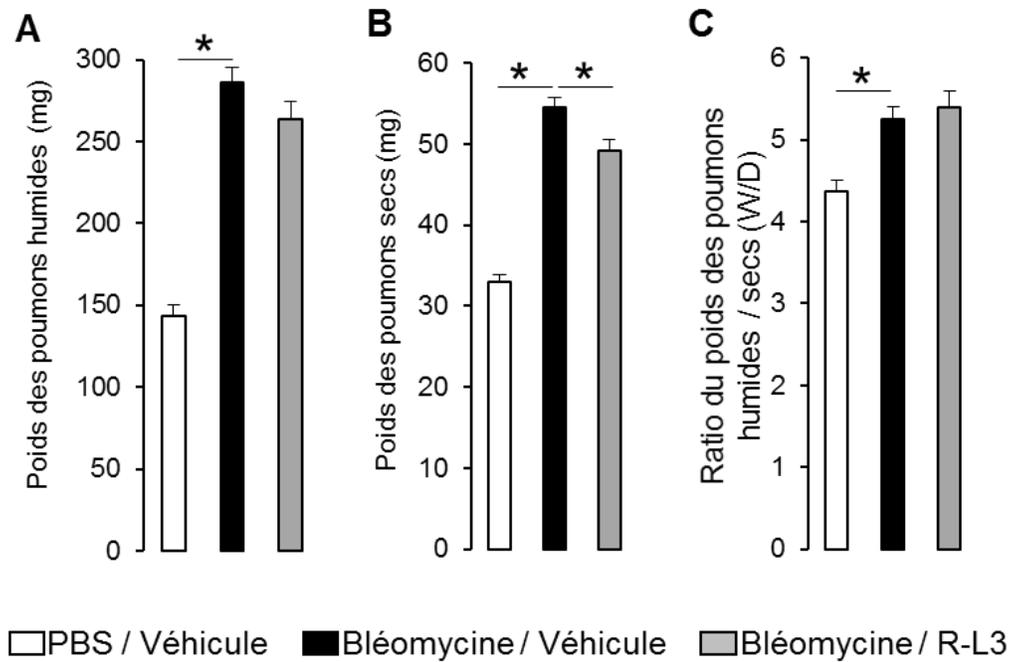


Figure 38. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire induit par la bléomycine dans le modèle *in vivo*

Mesures du poids des poumons humides (A.), secs (B.) et du ratio W/D (*Wet/Dry*, W/D) (C.) des poumons de souris WT en condition contrôle (PBS) ou de bléomycine (i.n., 3 U/kg, d7) en présence de R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) ou de saline (Véhicule) (n=9-13, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

Tout comme pour les souris WT (**Fig.39A**), les poids des poumons humides et secs ont augmenté suivant le traitement à la bléomycine par rapport au PBS chez les souris KO (**Fig.39B**) (respectivement $226,64 \pm 10,42$ et $48,92 \pm 1,58$ mg). La bléomycine tend à augmenter le ratio W/D chez les souris WT et KO, mais aucune aggravation de l'œdème chez les souris KO n'a été notée.

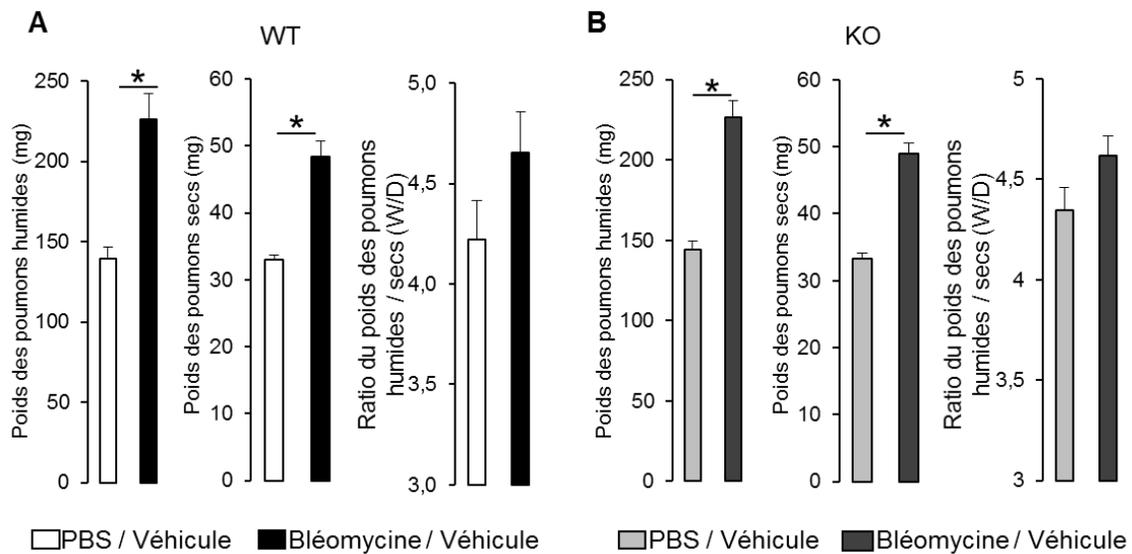


Figure 39. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur l'œdème pulmonaire induit par la bléomycine dans le modèle *in vivo*

Mesures du poids des poumons humides, secs et ratio W/D (*Wet/Dry*, W/D) des poumons de souris sauvages (**A.**, WT) et déficientes pour le canal KvLQT1 (**B.**, KO) en condition contrôlée (PBS) ou de bléomycine (i.n., 3 U/kg, d7) (n=9, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.2 Impact de la modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur la réparation épithéliale dans un modèle *in vitro*

4.2.2.2.1 Inhibition du canal KvLQT1

Afin d'étudier le rôle du canal KvLQT1 dans les mécanismes de réparation épithéliale *in vitro*, la vitesse de réparation de monocouches de cellules ATII fraîchement isolées de souris sauvages (WT) ou de souris déficientes pour KvLQT1 (KO) a été mesurée. Afin de mesurer l'impact de l'inhibition pharmacologique de l'activité de KvLQT1 chez les souris WT, l'inhibiteur pharmacologique de KvLQT1 chromanol (20 μ M) a été ajouté au milieu de culture.

4.2.2.2.1.a Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KvLQT1

Le chromanol induit une diminution significative de la vitesse de réparation de la monocouche de cellules ATII de souris WT ($61,8 \pm 7,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) par rapport à la condition contrôle ($77,1 \pm 5,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) (**Fig.40**).

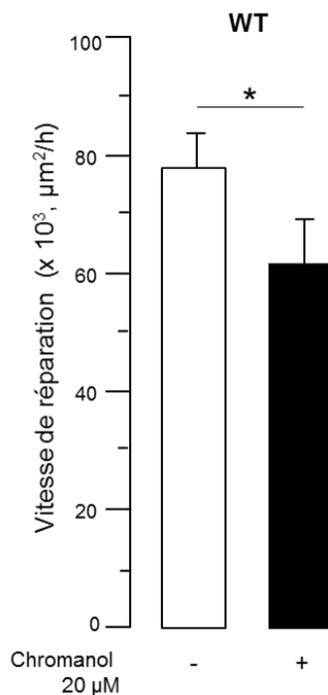


Figure 40. Effet de l'inhibition pharmacologique du canal KvLQT1 sur la réparation des monocouches lésées des cellules ATII de souris

Vitesse de réparation des monocouches de cellules ATII de souris sauvages (WT) lésées mécaniquement, en présence (+) de chromanol 20 µM (inhibiteur spécifique de KvLQT1) ou non (-). La vitesse de réparation est calculée en µm²/h sur une période de 6 heures. (n=10, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.2.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

La vitesse de réparation des monocouches de cellules ATII des souris déficientes pour le canal KvLQT1 (KO) est significativement plus faible ($58,2 \pm 5,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) que la vitesse des cellules ATII des souris sauvages (WT) ($77,1 \pm 5,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) (**Fig.41**).

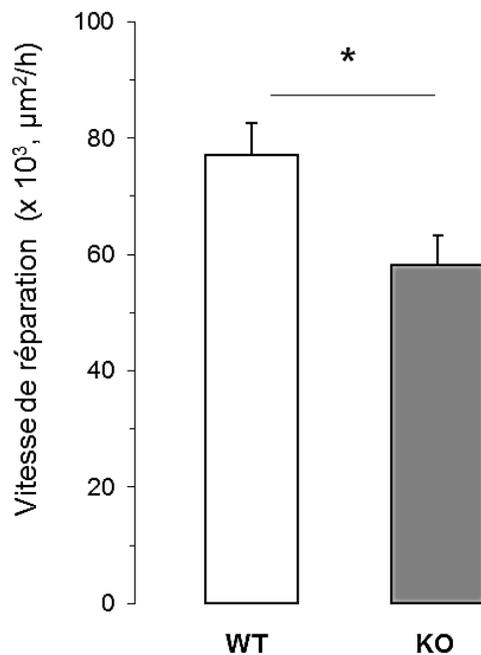


Figure 41. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur la réparation des monocouches lésées des cellules ATII de souris

Vitesse de réparation des monocouches de cellules ATII de souris sauvages (WT) et déficientes pour le canal KvLQT1 (KO) lésées mécaniquement. La vitesse de réparation est calculée en $\mu\text{m}^2/\text{h}$ sur une période de 6 heures. (n=10, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.2.2 Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

L'impact de la bléomycine sur la réparation a été étudié *in vitro*, avec les mesures de vitesse de réparation sur des cellules ATII de rats. La bléomycine (25 et 50 mU) a ralenti significativement et de manière dose-dépendante la vitesse de réparation des ATII de rats (respectivement $31,5 \pm 2,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ et $20,0 \pm 2,8 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) par rapport à la condition contrôle (respectivement $42,8 \pm 2,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ et $39,3 \pm 3,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) (**Fig.42**). L'activation pharmacologique du KvLQT1 par le R-L3 (4 μM) permet de renverser complètement l'effet négatif de la bléomycine à la concentration de 25 mU ($42,7 \pm 1,6 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) et renverse partiellement l'effet de la bléomycine à 50 mU ($27,3 \pm 2,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$).

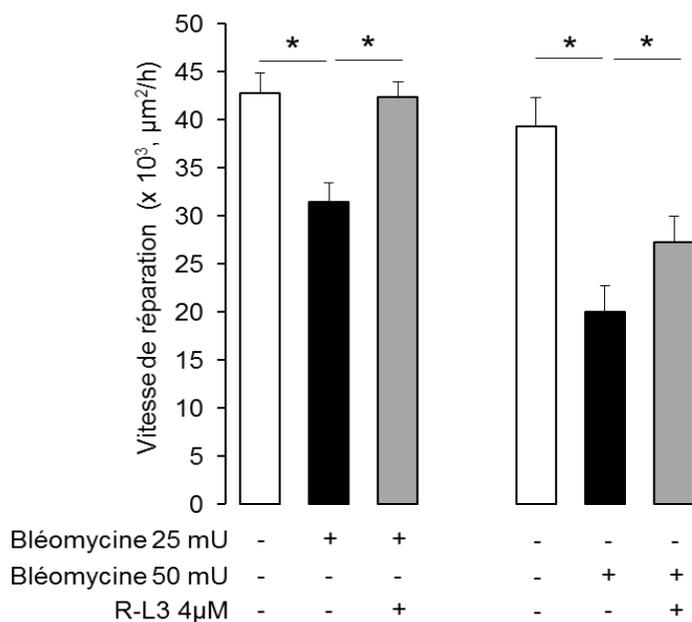


Figure 42. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur la réparation des monocouches lésées des cellules ATII de rats en présence de bléomycine

Vitesse de réparation des monocouches de cellules ATII de rats lésées mécaniquement, traitées (+) ou non (-) par l'activateur R-L3 (4 μM , 1h), en présence de bléomycine (+) (25 et 50 mU). La vitesse de réparation est calculée en $\mu\text{m}^2/\text{h}$ sur une période de 24 heures. (n=8-9, * p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.3 Analyse histologique des poumons de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Une analyse histologique de l'effet de la bléomycine chez les souris WT et KO a été réalisée, en collaboration avec l'IRIC. Les coupes de sections de poumons des souris, euthanasiées 7 jours (d7) après l'instillation de bléomycine (ou de PBS) en présence ou non de R-L3 (4 μ M, i.n., instillées aux 2 jours) ont été colorées au trichrome de Masson, afin d'observer le développement d'une éventuelle fibrose précoce. Afin de voir l'effet de la bléomycine à plus long terme, l'expérience a aussi été reconduite sur 12 jours (d12).

4.2.2.3.1 Modulation du canal KvLQT1 sur la structure histologique des poumons de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

4.2.2.3.1.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

L'activation par le R-L3 (4 μ M, i.n., aux 2 jours) chez les souris WT ne semble pas modifier l'impact histologique créé par l'administration de bléomycine seule, à d7. Quant aux coupes histologiques des poumons des souris WT à d12, le R-L3 a non seulement diminué l'infiltration cellulaire, mais a également réduit les dépôts de collagène (bleu) causés par la bléomycine (**Fig.43**).

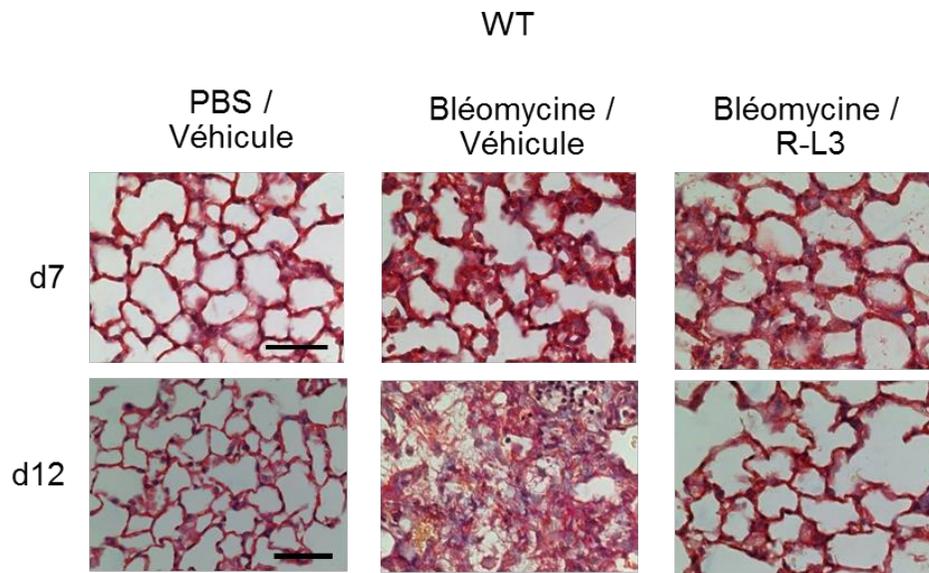


Figure 43. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur la structure histologique des poumons de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Photographies obtenues par microscopie optique en champs clairs de sections de poumons de souris sauvages (WT), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg) ou PBS pendant 7 (d7) ou 12 jours (d12) et pré-traitées ou non (Véhicule) avec l'activateur spécifique des canaux KvLQT1, R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h). La coloration a été effectuée au trichrome de Masson (grossissement à 40x, échelle : 25 μ M). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.3.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

Une aggravation des dommages au niveau épithélial peut être décrite sur les coupes de sections de poumons des souris KO, suivant l'instillation de bléomycine (d7), par rapport à celles de sections de poumons des souris WT (**Fig.44**). La coloration bleue (flèches) montre l'apparition de fibrose précoce par dépôts de collagène induit par la bléomycine sur les coupes de poumons de souris KO.

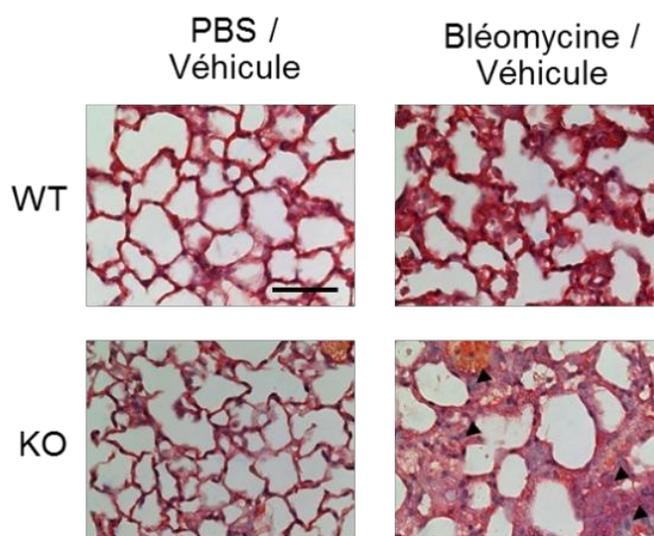


Figure 44. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur la structure histologique des poumons de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Photographies obtenues par microscopie optique en champs clairs de sections de poumons de souris sauvages (WT) et déficientes pour le canal KvLQT1 (KO), ayant reçu ou non (PBS) la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d). La coloration a été effectuée au trichrome de Masson (grossissement à 40x, échelle : 25 μ M). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.3.2 Immunofluorescence de la pro-SP-C sur coupes de poumons de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Comme mentionné précédemment, les ATII sont des cellules progénitrices permettant la réparation et la régénération de l'épithélium alvéolaire. Elles sont aussi sécrétrices des protéines du surfactant, notamment de la SP-C. Un marquage du pro-SP-C a donc été effectué afin de détecter la présence de cellules ATII dans les poumons de souris WT atteintes dans le modèle de SDRA induit par la bléomycine (d7), en présence ou non de R-L3 (4 μ M, i.n., instillées aux 2 jours).

La détection immunohistochimique de la protéine pro-SP-C par immunofluorescence sur des sections de poumons de souris WT ayant reçu la bléomycine (d7) montre une diminution par rapport à la condition contrôle (PBS) (**Fig.45**), indiquant une perte de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire induit par la bléomycine. Le traitement des souris au R-L3 permet d'augmenter le marquage de la pro-SP-C malgré l'instillation de la bléomycine.

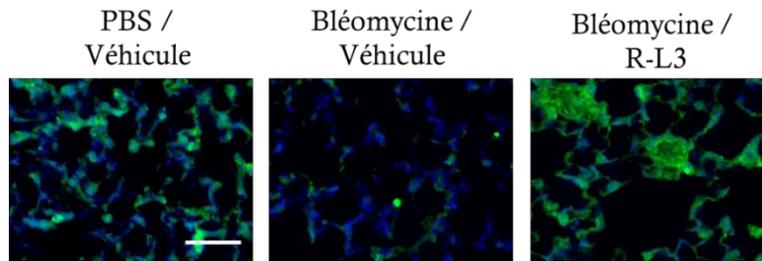


Figure 45. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur le marquage de la pro-SP-C sur des sections de poumons de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Photographies représentatives de la détection immunohistochimique par immunofluorescence de la pro-SP-C (Alexa 488, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, bleu) sur des coupes de sections de poumons de souris sauvages (WT), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d) ou PBS, pré-traitées ou non (Véhicule) avec l'activateur des canaux KvLQT1 R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) observées au microscope optique à fluorescence (grossissement à 40x, échelle : 25 μ M). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.4 Analyse de la réponse inflammatoire induite par la bléomycine dans le modèle murin de SDRA

L'analyse des BAL de souris WT et KO a permis de poursuivre l'étude du canal potassique KvLQT1 sur la réponse inflammatoire en dosant et quantifiant les cellules immunitaires infiltrées ainsi que les taux de cytokines sécrétées en présence de bléomycine. L'impact de l'activation de KvLQT1 par le R-L3 a aussi été mesuré chez les souris WT.

4.2.2.4.1 Modulation de l'activité du canal KvLQT1 sur l'infiltration cellulaire dans les BAL de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

4.2.2.4.1.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

Le nombre total de cellules retrouvées dans les BAL des souris WT est augmenté significativement par la bléomycine ($1,93 \pm 0,2 \times 10^6$ cellules/ml) par rapport à la condition contrôle ($0,31 \pm 0,03 \times 10^6$ cellules/ml) (**Fig.46**). De plus, l'effet de la bléomycine est diminué de manière significative par le R-L3 ($0,92 \pm 0,08 \times 10^6$ cellules/ml).

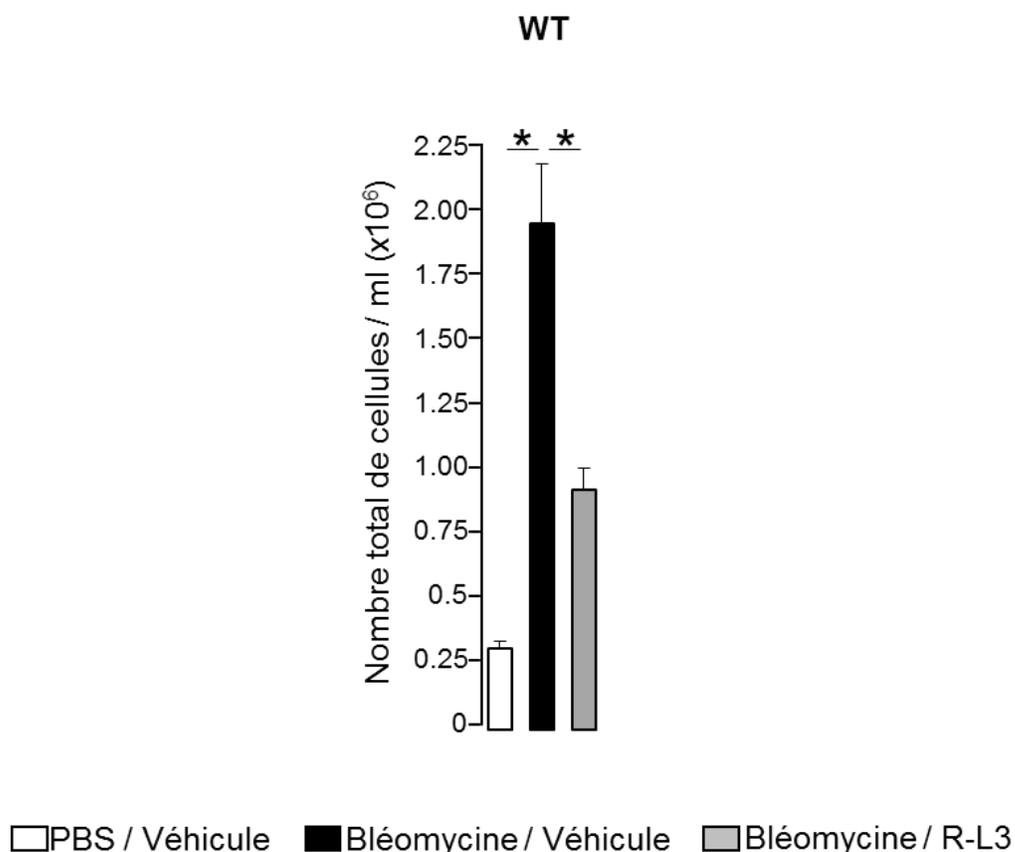


Figure 46. Effet de l'activation du canal KvLQT1 sur le nombre total de cellules infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Décompte cellulaire total (nb de cellules $\times 10^6$ /ml) provenant des BAL de souris sauvages (WT), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d) ou du PBS, pré-traitées ou non (Véhicule) avec l'activateur R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) (n=9-10, p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation)

4.2.2.4.1.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

Le nombre total de cellules retrouvées dans les BAL des souris KO est augmenté significativement par la bléomycine ($1,58 \pm 0,2 \times 10^6$ cellules/ml) comparativement à la condition contrôle (PBS) ($0,32 \pm 0,03 \times 10^6$ cellules/ml) (**Fig.47**). Aucune différence significative par rapport aux souris WT (**Fig.46**) n'a cependant été notée.

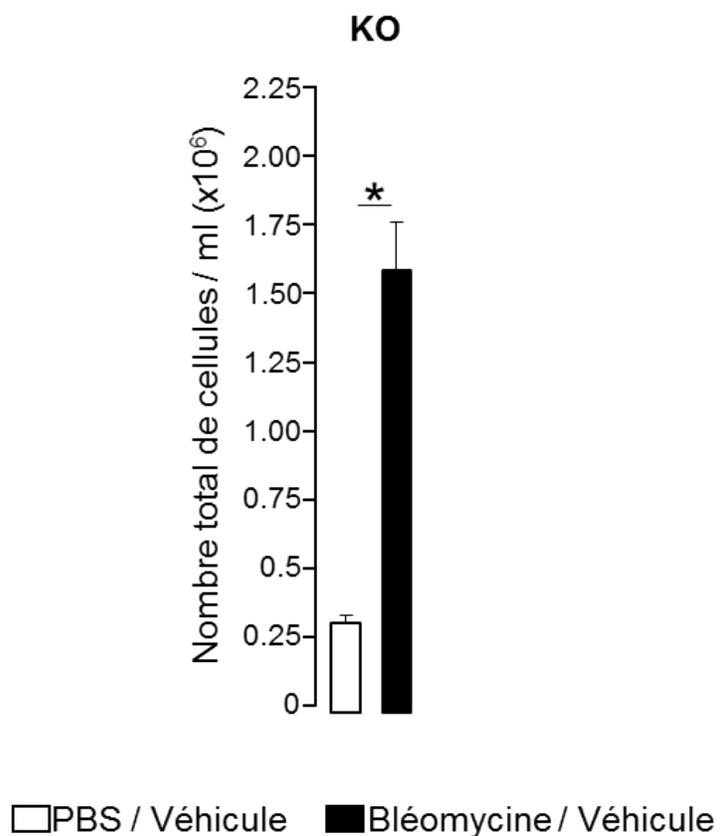


Figure 47. Effet de la bléomycine chez les souris déficientes pour le canal KvLQT1 par KO sur le nombre total de cellules infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle *in vivo* de SDRa induit par la bléomycine

Décompte cellulaire total (nb de cellules $\times 10^6$ /ml) provenant des BAL de souris déficientes pour le canal KvLQT1 (KO), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d) ou PBS (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) (n=9-12, p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.4.2 Impact de la modulation du canal KvLQT1 sur le comptage différentiel des cellules immunitaires infiltrées dans les BAL de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Pour approfondir l'analyse de la réponse inflammatoire, un comptage différentiel des cellules infiltrées dans les BAL a été réalisé. Les pourcentages du nombre d'éosinophiles, neutrophiles, macrophages et lymphocytes recrutés par rapport au nombre total de cellules ont été comptés chez les souris WT et KO, ayant reçu ou non la bléomycine.

4.2.2.4.2.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

En présence de bléomycine, les proportions d'éosinophiles ($3,73 \pm 0,6 \%$), de lymphocytes ($9,11 \pm 2,4 \%$) et de neutrophiles ($45,32 \pm 6,2 \%$) sont augmentées par rapport à la condition contrôle (respectivement $1,18 \pm 0,4 \%$, $4,19 \pm 1,1 \%$ et $7,98 \pm 2,0 \%$) (**Fig.48**). Le recrutement majeur de neutrophiles en condition de bléomycine diminue la proportion de macrophages ($41,84 \pm 5,6 \%$) par rapport à la condition contrôle ($86,65 \pm 1,9 \%$). L'activation du KvLQT1 par le R-L3 a permis une diminution significative des ratios de neutrophiles ($28,27 \pm 3,6 \%$) et une augmentation de ceux des macrophages ($59,25 \pm 4,2\%$) par rapport à la bléomycine dans les BAL des **WT** souris WT.

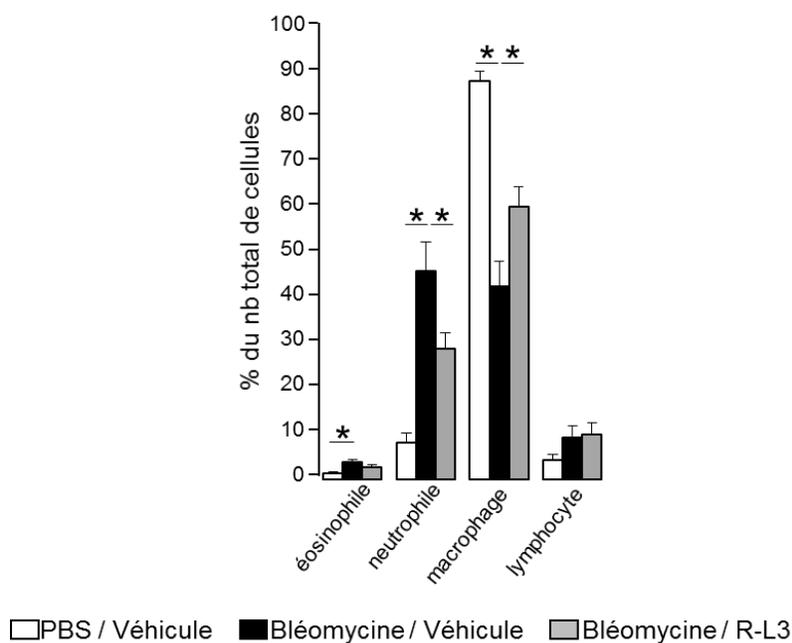


Figure 48. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur le comptage différentiel des cellules immunitaires infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Décompte différentiel réalisé au microscope optique des cellules infiltrées (% par rapport au nombre total de cellules) provenant des BAL de souris sauvages (WT), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d) ou PBS, pré-traitées ou non (Véhicule) avec l'activateur R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) (n=9-10, p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.4.2.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

Comme observé chez les souris WT (**Fig.49**), chez les souris KO, le stress induit par la bléomycine a augmenté significativement les proportions d'éosinophiles ($3,46 \pm 0,3 \%$) et de neutrophiles ($24,48 \pm 2,8 \%$), mais augmente aussi significativement la proportion de lymphocytes ($7,95 \pm 0,9 \%$) (**Fig.49**). À l'inverse, le ratio de macrophages recrutés en condition contrôle ($86,38 \pm 2,2 \%$) est significativement diminué par la bléomycine ($64,11 \pm 2,4 \%$).

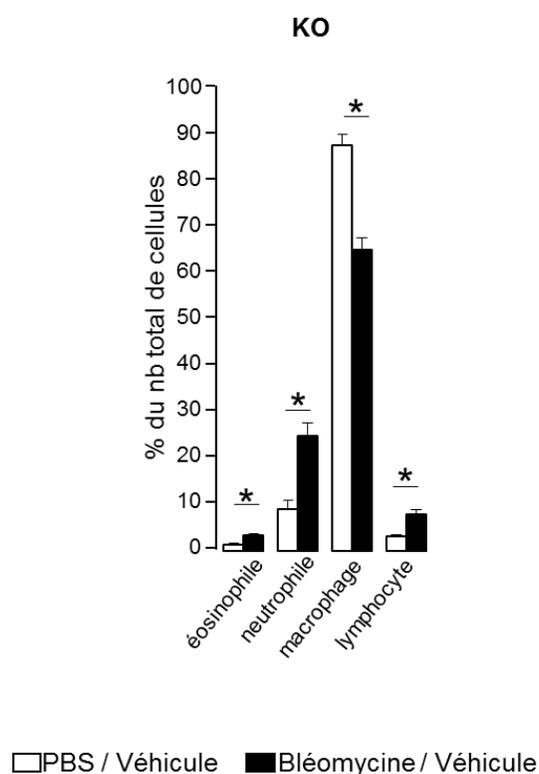


Figure 49. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur le comptage différentiel des cellules immunitaires infiltrées au niveau alvéolaire dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Décompte différentiel réalisé au microscope optique des cellules infiltrées (% par rapport au nombre total de cellules) provenant des BAL de souris déficientes pour le canal KvLQT1 (KO), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg) ou PBS, (n=9-12, p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.4.3 Modulation du canal KvLQT1 sur la sécrétion de cytokines-chimiokines dans les BAL de souris dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Finalement, afin de confirmer l'impact de la modulation du canal KvLQT1 dans la réponse inflammatoire, les taux de cytokines et chimiokines sécrétées dans les BAL des souris WT et KO, traitées ou non à la bléomycine en présence ou non de R-L3, ont été dosés.

4.2.2.4.3.a Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1

L'analyse des BAL récoltés des souris WT ayant reçu la bléomycine montre une augmentation significative des taux de MCP-1 ($948,29 \pm 410,7$ pg/mL), de TNF- α ($24,75 \pm 7,8$ pg/mL), d'IL-6 ($194,92 \pm 111,9$ pg/mL) et de KC ($78,42 \pm 12,8$ pg/mL). De façon intéressante, l'activation par le R-L3 diminue significativement les taux de MCP-1 ($54,01 \pm 8,2$ pg/mL), de TNF- α ($5,00 \pm 1,1$ pg/mL), d'IL-6 ($7,38 \pm 2,7$ pg/mL) et de KC ($35,79 \pm 7,8$ pg/mL) (**Fig.50**). Les taux sécrétés de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ont diminué significativement en présence de bléomycine ($0,96 \pm 0,3$ pg/mL), mais l'activation par le R-L3 n'a eu aucun effet.

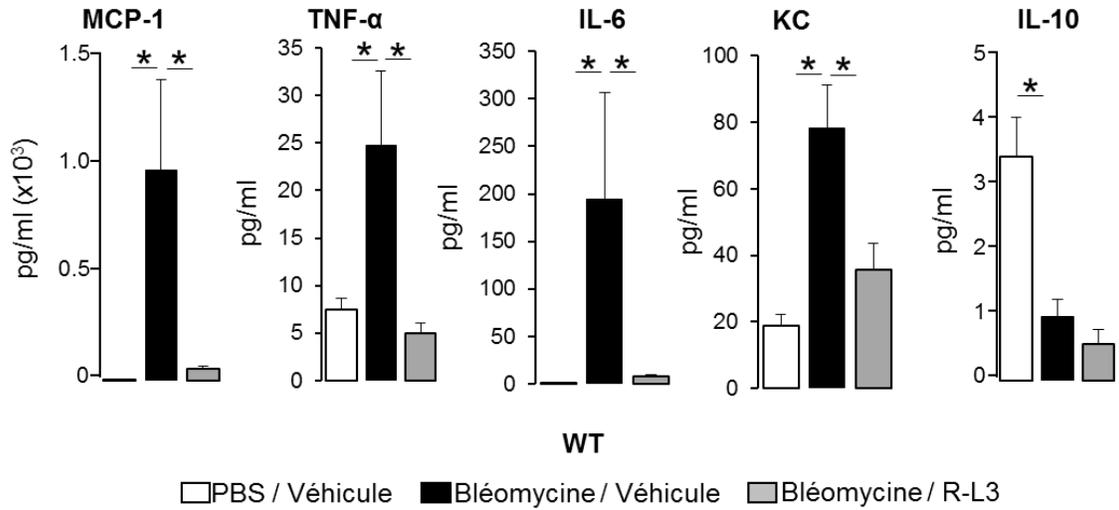


Figure 50. Effet de l'activation pharmacologique du canal KvLQT1 sur les cytokines et les chimiokines sécrétées au niveau alvéolaire dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Dosages par ELISA multiplex des cytokines et des chimiokines sécrétées (pg/ml) provenant des BAL de souris sauvages (WT), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d) ou du PBS, pré-traitées ou non (Véhicule) avec l'activateur R-L3 (i.n., 4 μ M, 50 μ L, 1h) (n=6, p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

4.2.2.4.3.b Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO

La bléomycine augmente les taux de MCP-1 ($184,09 \pm 74,0$ pg/mL) et d'IL-6 ($46,33 \pm 30,5$ pg/mL) retrouvés dans les BAL de souris KO. Le taux d'IL-10 est quant à lui diminué par la bléomycine (contrôle : $3,83 \pm 0,5$ pg/mL vs bléomycine : $1,08 \pm 0,3$ pg/mL) (**Fig.51**). Les taux sécrétés de TNF- α et de KC n'ont pas été modifiés par rapport à la condition contrôle par la bléomycine chez les souris KO.

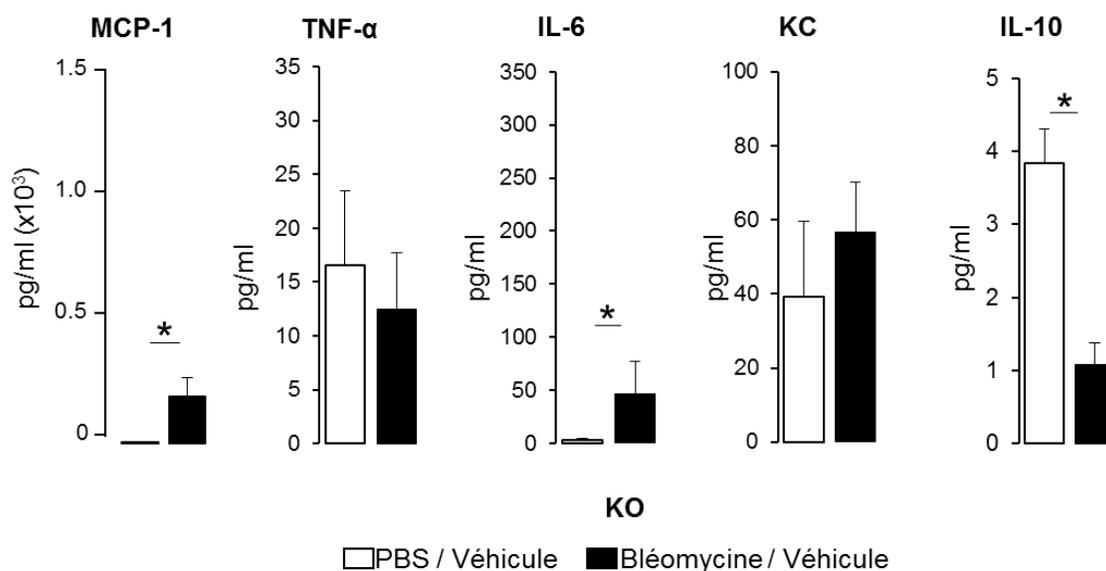


Figure 51. Effet de l'extinction du canal KvLQT1 par KO sur les cytokines et les chimiokines sécrétées au niveau alvéolaire dans le modèle *in vivo* de SDRA induit par la bléomycine

Dosages par ELISA multiplex des cytokines et des chimiokines sécrétées (pg/ml) provenant des BAL de souris déficientes pour le canal KvLQT1 (KO), ayant reçu la bléomycine (i.n., 3 U/kg, 7d) ou du PBS (n=6, p<0,05). (Girault A., Chebli J., *et al.*, en préparation).

Chapitre 5 – Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'implication de deux types de canaux potassiques, soit le KCa3.1 et le KvLQT1, dans les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire à l'aide d'un modèle *in vitro* de culture primaire de cellules alvéolaires et dans des processus physiopathologiques du SDRA *in vivo* à l'aide de modèles murins.

Implication du canal KCa3.1, de la matrice de fibronectine et de l'intégrine-β1 dans les mécanismes de régulation de la réparation de l'épithélium alvéolaire

Effet de la fibronectine

Notre étude a permis de montrer que la culture de cellules alvéolaires sur matrice de fibronectine (Fn), protéine exprimée par la MEC à laquelle les cellules adhèrent, favorise les mécanismes de réparation de l'épithélium en augmentant la vitesse de réparation de monocouches de cellules ATII lésées ainsi que la migration cellulaire. Ces données sont en accord avec une étude montrant l'influence d'une matrice provisoire de Fn sur l'augmentation de la migration des cellules alvéolaires en chambre de Boyden ⁸⁶.

L'importance de la MEC, et de ses composantes, afin de reconstruire un épithélium a été montrée dans d'autres modèles de cellules épithéliales. Nishida et ses collaborateurs ont été parmi les premiers à montrer l'effet de la Fn sur la migration des cellules épithéliales de la cornée *in situ* ¹⁰⁵. Il a aussi été montré, par Takashima et collaborateurs, que la matrice de Fn favorise l'adhésion et l'étalement des kératinocytes ¹⁰⁶.

Nos résultats sont en concordance avec la revue de littérature de Bachman et collaborateurs rapportant le rôle prépondérant de la Fn dans les mécanismes cellulaires tels l'adhésion avec les cellules notamment *via* les intégrines, mais également son rôle dans les mécanismes de réparation épithéliale ¹⁰⁷.

Implication du canal KCa3.1

Notre étude a montré que l'inhibition pharmacologique de KCa3.1 ou de son extinction avec des siRNA n'a aucun effet sur la vitesse de réparation de monocouches d'ATII cultivées en absence de matrice de Fn; seules les cellules cultivées sur matrice voient leur vitesse de réparation diminuée en réponse à l'inhibition/extinction de KCa3.1. À l'inverse, les résultats du laboratoire qui font l'objet de l'article scientifique joint en annexe (Girault A., Chebli J., *et al.*) montrent que l'activation pharmacologique de KCa3.1 augmente la vitesse de réparation de l'épithélium alvéolaire en présence de matrice de Fn. Nos données montrent également que le canal KCa3.1 semble être impliqué dans les mécanismes de migration et prolifération cellulaire des ATII lorsqu'elles sont cultivées sur Fn. Le rôle de KCa3.1 dans les mécanismes de prolifération cellulaire a aussi été montré dans des modèles de cellules souches mésenchymateuses et de leucémie lymphoïde chronique ^{108,109}.

Nos données indiquent donc qu'au niveau de l'épithélium alvéolaire, le KCa3.1 nécessiterait la présence d'une matrice de Fn afin qu'il ne régule significativement la réparation épithéliale, contrairement aux canaux potassiques KvLQT1 et K_{ATP} qui jouent un rôle dans les processus de réparation même en absence de MEC ⁵⁹. L'activité ou l'expression de base du KCa3.1 au niveau alvéolaire n'est peut-être pas assez importante pour contrôler les processus de réparation en absence de Fn. En effet, nous avons pu

montrer que les ATII cultivées sur matrice de Fn expriment à leur membrane plus de canaux KCa3.1; ce qui pourrait expliquer les résultats de réparation obtenus en présence de Fn (Girault A., Chebli J., *et al.*).

Sachant que la matrice de Fn, en plus d'augmenter l'adressage à la membrane du canal KCa3.1 dans des cellules ATII, crée des liens avec les cellules *via* les intégrines, nous avons alors évalué l'expression à la membrane de l'intégrine- β 1, un récepteur de la Fn et transducteur de signal intracellulaire. Nos résultats ont pu montrer que la culture sur Fn augmente aussi l'expression à la membrane de l'intégrine- β 1 dans les cellules ATII (Girault A., Chebli J., *et al.*).

Relation entre le canal KCa3.1 et l'intégrine- β 1

Ces résultats suggèrent alors une relation entre le canal KCa3.1 et l'intégrine- β 1 activée par la liaison avec la Fn. Notre étude a permis de montrer pour la première fois que ces deux protéines co-localisent au niveau membranaire des cellules alvéolaires et qu'elles co-immunoprécipitent.

D'autres études ont déjà montré une relation physique et fonctionnelle entre des canaux potassiques et des intégrines, dans différents types cellulaires. En effet, deHart et ses collaborateurs ont montré que l'intégrine- α 9 favorise la migration des fibroblastes embryonnaires de souris par la modulation du canal potassique Kir4.2 et que ces deux protéines co-localisent aux points d'adhésion entre la matrice de Fn et les fibroblastes en migration ⁸⁷. Au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire, Yang et ses collaborateurs ont montré que l'activation de l'intégrine- α 5 β 1 par la Fn favorise l'activation du canal potassique BKCa et augmente son courant spécifique ¹¹⁰. Leurs analyses ont permis

d'identifier que la relation entre l'intégrine- $\alpha 5\beta 1$ et l'activation du canal BKCa se fait par des mécanismes dépendant du calcium, causés par une augmentation de la sensibilité du canal pour le Ca^{2+} , et par des mécanismes de phosphorylation de la sous-unité α du canal potassique par la kinase c-*Src*¹¹⁰.

Nos résultats obtenus à ce jour ne permettent pas de définir par quels mécanismes et voies intracellulaires l'intégrine- $\beta 1$ module l'activité et l'expression du canal KCa3.1 au niveau alvéolaire. Il serait alors intéressant d'étudier plus en profondeur la transduction de signal émis par l'intégrine- $\beta 1$ activée par la Fn dans des cellules ATII et de mesurer par exemple par immunobuvardage l'expression des protéines d'adhésion *Focal Adhesion Kinase* (FAK) impliquées dans les mécanismes de migration cellulaire.

L'identification de sites de phosphorylation, par exemple au niveau des extrémités NH_3^+ et COOH^- des sous-unités du canal KCa3.1, par mutagénèse permettrait de poursuivre l'étude au niveau mécanistique de la relation entre le canal KCa3.1 et l'intégrine- $\beta 1$. Il serait d'autant plus intéressant de vérifier l'hypothèse de Yang et collaborateurs de la phosphorylation par la kinase c-*Src*, mais sur le canal KCa3.1. D'autre part, des mesures de courants des canaux KCa3.1 en électrophysiologie pourraient permettre d'évaluer l'effet de l'activation de l'intégrine- $\beta 1$ par la Fn sur la fonction du canal.

En parallèle, nous avons montré la relation, par co-immunoprécipitation, entre le canal KCa3.1 et le récepteur au facteur de croissance EGFR, dont le rôle dans les processus de réparation épithéliale a déjà été montré au laboratoire^{59,60}. Le canal KCa3.1 semble donc s'associer avec des protéines impliquées dans les processus de réparation épithéliale. Nos résultats ont permis de montrer une possible relation entre le canal potassique KCa3.1, l'intégrine- $\beta 1$ activée par la matrice de Fn et le récepteur EGFR; occupant tous un rôle

prépondérant dans les mécanismes de réparation épithéliale. Il serait alors intéressant d'étudier la co-localisation de ces trois protéines au niveau des ATI, sur matrice de Fn. Toutefois, cela ne nous permettrait pas de déterminer s'il y a ou non une relation fonctionnelle entre l'EGFR, le KCa3.1 et l'intégrine- β 1; c'est pourquoi l'identification, notamment par immunobuvardage ou par qPCR, de seconds messagers relâchés en réponse à l'activation de ces protéines serait nécessaire. Il serait également possible de déterminer si l'activation du canal KCa3.1 est associée à une augmentation de l'intégrine- β 1 active qui peut être détectée par l'anticorps HUTS-21 ¹¹¹.

Perspectives

Notre étude montre que l'implication de KCa3.1 dans les processus de réparation de l'épithélium alvéolaire est dépendante de la présence de Fn avec laquelle le canal semble interagir *via* l'intégrine- β 1. Nos résultats nous permettent de poser l'hypothèse selon laquelle l'activation du canal KCa3.1 pourrait stimuler la réparation d'un épithélium lésé dans un contexte pathologique tel que celui du SDRA. Or en SDRA, les bris au niveau de l'épithélium alvéolaire sont parfois trop importants pour fournir une MEC permettant l'activation complète des intégrines et ces dommages créent une augmentation de la concentration protéique et du dépôt de débris de la MEC en circulation, dont la fibrine ¹¹². Il serait donc intéressant de reproduire *in vitro* ces conditions en ajoutant de la Fn soluble, comme proposé par Nishida et ses collaborateurs, dans le milieu de culture et de caractériser l'implication du KCa3.1 dans les mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire. Dans l'optique de recréer les paramètres biologiques du SDRA *in vitro*, un milieu de culture hyper-oncotique et hypo-osmotique pourrait mimer l'œdème pulmonaire

caractéristique du syndrome. Finalement, il a été montré par Roach et ses collaborateurs que l'activité de KCa3.1 favorise le développement de fibrose par la différenciation de fibroblastes et de myofibroblastes par la voie de Smad2/3 dans un modèle de fibrose idiopathique pulmonaire¹¹³. Il serait donc intéressant de déterminer si l'activation du canal KCa3.1 (*in vivo* dans le modèle de SDRA induit par la bléomycine) permet de promouvoir la réparation épithéliale, ou si au contraire elle favorise l'apparition de fibrose précoce.

Implication du canal KvLQT1 dans les mécanismes de résolution des processus physiopathologiques du SDRA

Dans cette deuxième partie du projet, nous avons étudié le rôle du canal KvLQT1 dans un modèle *in vivo* d'œdème pulmonaire induit par la thiourée et dans un modèle de SDRA et de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine.

Modèle *in vivo* d'œdème pulmonaire induit par la thiourée

Activation du canal KvLQT1

Nos résultats ont permis de montrer que l'activation du canal KvLQT1 par le R-L3 est associée à un moins grand œdème pulmonaire induit par la thiourée chez la souris. Ce résultat est en accord avec l'étude menée au laboratoire par Bardou et collaborateurs montrant que les canaux K⁺, en collaboration avec le canal ENaC, permettent de contrôler l'absorption liquidienne par l'épithélium alvéolaire³³.

Notre mesure d'indice de l'œdème ne nous permet cependant pas de définir si le traitement au R-L3 prévient la formation de l'œdème pulmonaire ou s'il aide à sa résolution. Afin de

caractériser l'effet de l'activation de KvLQT1 sur l'œdème pulmonaire, il serait intéressant de procéder à des tests de perméabilité *in vivo*, par injection de colorant, tel que le bleu d'Evans, afin de vérifier si l'intégrité de la barrière endothéliale est mieux conservée suite à l'activation par le R-L3. Des mesures de clairance *in vivo*, par mesure de distribution du dextran, nous permettraient de tester notre hypothèse selon laquelle le R-L3 diminue l'œdème en favorisant sa résolution.

La diminution de l'œdème pourrait aussi être due à un effet secondaire à la stimulation du KvLQT1 sur l'expression du canal ENaC. En effet, une étude précédente du laboratoire a montré que l'activation du KvLQT1 était associée à une augmentation de l'expression de ENaC, *via* une stimulation de l'activité de son promoteur dans les cellules ATII *in vitro*³⁷. Han et ses collaborateurs ont également montré que l'activation des canaux potassiques KCa3.1 et K_{ATP}, par respectivement l'1-EBIO et le minoxidil, permet d'augmenter la clairance des fluides alvéolaires, préalablement diminuée par l'inhibition du canal ENaC par le verapamil dans un modèle de monocouches de cellules épithéliales humaines¹¹⁴. Nos données, combinées à celles de la littérature, nous permettent alors de proposer les canaux potassiques comme acteurs importants dans le contrôle de l'œdème pulmonaire.

Extinction du canal KvLQT1

Avec les souris KO pour le canal KvLQT1, nos résultats ont montré que l'instillation de R-L3 n'induit pas de diminution des ratios W/D comparativement aux valeurs obtenues dans les souris WT. Ces résultats nous permettent alors de confirmer de manière fonctionnelle le génotype des souris KO, qui amène donc bien à la perte de l'effet du R-L3 sur les niveaux d'œdème pulmonaire. Plus important encore, les résultats obtenus montrent

que l'effet bénéfique du R-L3 dans les souris WT dépend bien de l'activation du canal KvLQT1. Ces résultats supportent un rôle de ce canal comme acteur dans la régulation de l'œdème pulmonaire.

Étonnement, l'extinction de KvLQT1 n'a eu aucun effet d'aggravation sur l'accumulation de liquide au niveau pulmonaire. Il a aussi été montré par Egli et ses collaborateurs que l'extinction du canal ENaC dans un modèle murin n'a montré aucune différence des ratios W/D, suggérant aucune accumulation de fluide en condition contrôle⁹⁰. Pour expliquer ces résultats, nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle les souris KO pour KvLQT1 dès la naissance compensent l'absence de ce canal potassique par l'augmentation de l'expression d'une autre protéine de transport. Nous avons alors mesuré les niveaux d'expression de deux autres protéines majoritairement impliquées dans le contrôle de la réabsorption de fluide au niveau alvéolaire, soit le canal ENaC et la pompe Na⁺/K⁺/ATPase. Notre hypothèse n'a cependant pas pu être confirmée, car aucune différence n'a été notée dans les niveaux d'expression de ces protéines dans les souris WT et KO. D'autres canaux ioniques pourraient par contre être impliqués dans ce possible mécanisme de compensation, tels le canal K_{ATP} ou le co-transporteur Na⁺K⁺2Cl⁻. En effet, nos analyses au laboratoire montrent une baisse totale des courants KvLQT1 chez les souris KO, qui entraîne une diminution d'environ 50% des courants totaux, suggérant la présence des autres canaux K⁺ actifs, comme décrit par Bardou et ses collaborateurs³³.

Inhibition du canal KvLQT1

L'inhibition pharmacologique de KvLQT1 par le chromanol n'a également eu aucun effet sur l'œdème pulmonaire induit par la thiourée. Ces données nous obligent donc à écarter

l'hypothèse de possibles mécanismes compensatoires en réponse à l'inhibition/extinction de KvLQT1, du moins dans un modèle aigu.

Il est possible que l'activité de base de KvLQT1 ne soit pas assez importante comparativement à l'ensemble des courants potassiques contrôlés par les canaux K^+ retrouvés au niveau pulmonaire, soit plus d'une trentaine³³, pour que son inhibition ou extinction ait un effet majeur sur l'œdème. Par contre, nos résultats montrent que l'activation de KvLQT1 dans les souris WT est favorable en permettant de diminuer les niveaux d'œdème.

Analyses histologiques

Notre analyse histologique n'a révélé aucune différence au niveau alvéolaire entre les souris ayant reçu la saline et celles injectées à la thiourée. Toutefois, nous pensons que nos méthodes de prélèvement des poumons ainsi que d'inclusion ne sont pas adaptées pour l'analyse d'infiltration de liquide. Le modèle d'induction d'œdème pulmonaire par la thiourée est déjà bien établi dans la littérature et les dommages histologiques ont été rapportés^{90,89}. Une analyse histologique plus adaptée nous permettrait donc de comparer les différences au niveau de l'intégrité des alvéoles et de la formation d'œdème pulmonaire en présence ou non d'activateur de KvLQT1.

La caractérisation de l'activation par le R-L3 sur l'œdème pulmonaire reste encore à approfondir. De plus amples études combinant des analyses histologiques adéquates et des tests de perméabilité permettraient peut-être d'identifier un rôle du KvLQT1 dans la cinétique de la formation de l'œdème, dans la modulation de la perméabilité endothéliale et/ou dans la conservation de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, favorisant ainsi la

prévention de l'œdème. Si des différences au niveau de la perméabilité étaient notées, il serait alors pertinent de vérifier si ces différences sont dues à une atteinte moins sévère de la barrière alvéolo-capillaire grâce à un effet protecteur occasionnant par exemple un stress oxydatif moins grand.

Modèle de SDRA et de fibrose pulmonaire *in vivo* induit par la bléomycine

Œdème pulmonaire

Notre étude sur le modèle de SDRA induit par la bléomycine a confirmé la formation d'un œdème pulmonaire, caractérisé par l'augmentation du poids des poumons humides chez les souris WT et KO.

Contrairement à l'injection de thiourée, dans le modèle de bléomycine on note, en plus de la formation d'un œdème pulmonaire, une infiltration cellulaire ainsi qu'un développement de fibrose ¹¹⁵, entraînant une augmentation du poids des poumons secs. Interpréter des variations du ratio *Wet/Dry* est donc plus complexe que dans le modèle de thiourée, car les cellules infiltrées peuvent influencer le poids des poumons secs, créant ainsi des biais dans le ratio. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les valeurs des W/D en présence de bléomycine ne sont pas augmentées significativement, malgré la formation d'un œdème noté par l'augmentation du poids des poumons humides. Certaines équipes, dont celles d' Egger et collaborateurs, préfèrent alors montrer les poids séparés des poumons (humides et secs), comme nous l'avons fait, afin de montrer l'effet de la bléomycine, où l'on note bien une augmentation des poids humides et secs comparativement à la saline ¹¹⁶. Une mesure des volumes des poumons par imagerie par résonance magnétique (IRM) en

parallèle à des analyses de W/D serait une bonne complémentarité, comme le propose Egger.

L'inhibition de l'expression de KvLQT1, comme dans le modèle de thiourée, ne semble pas influencer la formation d'un œdème pulmonaire par la bléomycine (tant le poids humide que sec), suggérant que l'extinction d'un seul canal K^+ n'a pas un effet marqué sur l'infiltration de liquide au niveau pulmonaire. Il serait intéressant de déterminer l'effet de l'extinction de plusieurs canaux K^+ , par exemple le KvLQT1, le K_{ATP} et le $KCa3.1$, simultanément par instillation de siRNA *in vivo*.

Par contre, nos données ont montré que l'activation de KvLQT1 par le R-L3 diminue les poids de poumons humides, suggérant la formation d'un œdème pulmonaire moins important. Bien que Crawley et collaborateurs aient montré que la bléomycine n'induisait pas de changement de la perméabilité de l'endothélium de l'artère pulmonaire *in vitro*, Lee et ses collaborateurs associent quant à eux la formation de l'œdème pulmonaire *in vivo* à l'augmentation de la perméabilité vasculaire¹¹⁷. L'hypothèse que l'activation par le R-L3 prévient de possibles changements au niveau de la perméabilité vasculaire n'est donc pas écartée.

Nous posons également l'hypothèse que la baisse des poids humides occasionnée par l'activation de KvLQT1 pourrait être aussi associée à la résolution de l'œdème par une meilleure clairance alvéolaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en procédant à des mesures de clairance alvéolaire *in vivo*.

La baisse des poids secs en réponse à l'activation par le R-L3 quant à elle pourrait être due à une diminution du nombre de cellules infiltrées, tel que suggéré par notre analyse de la réponse inflammatoire (section *Réponse inflammatoire*). Encore une fois, il est impossible

de déterminer par quelle voie l'activation du canal KvLQT1 module le poids sec des poumons. Moins de dommages au niveau épithélial, favorisant une conservation de l'intégrité tissulaire, pourrait expliquer nos résultats sur le poids humide, tout comme une diminution de l'infiltration cellulaire, par un contrôle de la réponse inflammatoire, pourrait être responsable de la baisse du poids sec. Nous avons alors étudié plus en profondeur l'impact du canal KvLQT1 sur l'intégrité de l'épithélium et la réponse inflammatoire, deux paramètres physiopathologiques importants à cibler pour la résolution du SDRA.

Intégrité de l'épithélium alvéolaire

L'impact de KvLQT1 sur la vitesse de réparation de l'épithélium alvéolaire *in vitro* nous a permis d'approfondir l'hypothèse de l'implication du canal KvLQT1 dans les mécanismes de résolution du SDRA. La baisse de la vitesse de réparation de la monocouche des cellules dont l'activité de KvLQT1 était inhibée (chromanol ou KO) confirme l'implication du canal dans les mécanismes de réparation épithéliale alvéolaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment au laboratoire par Trinh et collaborateurs montrant une diminution de la vitesse de réparation de l'épithélium bronchique et alvéolaire par l'inhibition pharmacologique de KvLQT1^{59,61}. Nos données montrent que l'ajout de bléomycine au milieu de culture diminue fortement la vitesse de réparation, mais que cette baisse de vitesse est contrée par l'addition de R-L3. Ces résultats supportent l'importance du canal KvLQT1 dans les mécanismes de réparation de l'épithélium en conditions pathologiques. Il serait intéressant de confirmer en parallèle l'effet du R-L3 sur la bléomycine dans un autre modèle *in vitro*, par exemple dans un modèle de culture en 3-dimensions sur cellules polarisées afin de reproduire le plus possible *in vitro*

l'environnement alvéolaire; cette technique est déjà maîtrisée au laboratoire sur d'autres types de cultures primaires.

La poursuite de l'étude de l'impact de KvLQT1 sur l'intégrité épithéliale dans notre modèle *in vivo* de SDRA nous a permis de montrer, par nos analyses histologiques, que l'extinction de KvLQT1 par KO semble être associée à une aggravation des dommages tissulaires. Toutefois, l'apparition de fibrose au niveau alvéolaire 7 jours suivant l'administration de bléomycine chez les souris KO pourrait indiquer que l'extinction du canal modifie la cinétique du développement du SDRA en engageant une phase fibrotique plus précoce que chez les WT. Tout comme Lee, Shanmuga et leurs collaborateurs, il serait intéressant de quantifier l'expression de l'ARNm ou protéique des marqueurs de fibrose, tels le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le TGF- β et le collagène-I^{117,118}. Une analyse de ces marqueurs à des temps plus précoces suivant l'injection de bléomycine (d1 et d3) nous permettrait de dresser un portrait de l'évolution au niveau biomoléculaire de la fibrose, afin de déterminer s'il y a aussi une différence entre les souris WT et KO. Il est important de noter que l'histologie de base, sans bléomycine, entre les souris WT et KO pour KvLQT1 ne présente aucune différence (analyses histologiques non-présentées dans ce mémoire); indiquant une modification dans la réponse au stress créée par la bléomycine plutôt qu'une différence au niveau basal.

Nos analyses histologiques montrent que les dommages créés par la bléomycine à d7 ne sont pas empirés par des traitements au R-L3 chez les souris WT et semblent être prévenus. L'action bénéfique de l'activation de KvLQT1 est encore plus marquée 12 jours suivant l'administration de bléomycine, ce qui pourrait suggérer que le R-L3 favorise une réparation efficace de l'épithélium et permet la résorption de l'inflammation et des

dommages. Or, il est encore une fois impossible de savoir exactement si les effets du R-L3 sont dus à une amélioration de la capacité de réparation épithéliale (tel qu'indiqué par nos données *in vitro*) ou à une prévention des dommages.

Nous avons aussi étudié l'expression de la pro-SP-C (un marqueur des cellules ATII) qui permet ainsi de donner, en parallèle avec l'histologie, un indice de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire. Comme pour nos analyses histologiques, la bléomycine induit une baisse de marquage de la pro-SP-C, qui est toutefois prévenue par le traitement au R-L3.

Il serait intéressant de pousser plus loin l'étude de la modulation de KvLQT1 sur l'intégrité de l'épithélium en poursuivant les analyses que nous avons commencées sur les fonctions pulmonaires *in vivo*, dans notre modèle murin de SDRA, à l'aide d'un ventilateur spécialisé (FlexiVent™ SCIREQ, Canada). Ce ventilateur permettrait de corrélérer les données fonctionnelles comme la compliance dynamique et l'élastance du tissu pulmonaire, avec les aspects histologiques, ce qui augmenterait l'impact de notre étude.

Réponse inflammatoire

En parallèle, nos analyses sur la réponse inflammatoire ont d'abord confirmé l'induction d'inflammation par la bléomycine ¹¹⁵. Nos résultats ont aussi pu montrer que l'extinction du canal KvLQT1 par KO n'aggrave pas la réponse inflammatoire, contrairement aux dommages histologiques. Les niveaux de neutrophiles recrutés au niveau alvéolaire chez les souris KO en réponse à la bléomycine sont en fait plus faibles que chez les souris WT. Cette observation est en accord avec les résultats rapportés par Henríquez et ses collaborateurs montrant que l'inhibition de l'expression du canal KCa3.1 (par l'inhibiteur pharmacologique TRAM-34 ou par KO) diminue la migration des neutrophiles recrutés

par chimiotactisme *via* IL-8 et la molécule chemoattractante fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) ⁸⁴. Comme pour l'histologie, il se pourrait que l'extinction du canal engendre un changement dans l'évolution et la cinétique de la réponse inflammatoire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu caractériser la réponse inflammatoire induite par la bléomycine, mais à des temps plus précoces, soit à d1 et d3 suivant l'administration. Nos résultats préliminaires (non-présentés dans ce mémoire) semblent indiquer que le recrutement de neutrophiles se fait dès le lendemain de l'administration de bléomycine (d1) chez les souris KO alors que chez les souris WT, l'augmentation des ratios de neutrophiles est plus tardive (d3).

Les mesures des marqueurs inflammatoires étant prises à d7, il se peut alors que les données ne soient pas représentatives de l'intensité de la réponse si l'exacerbation de la réponse inflammatoire chez les souris KO est plus précoce que chez les souris WT. Ces résultats pourraient appuyer l'hypothèse suggérant que l'extinction de KvLQT1 modifie la cinétique des processus du SDRA.

Nos données ont montré que les niveaux des cytokines et des chimiokines sécrétées par les souris KO en réponse à la bléomycine étaient moins élevés que chez les souris WT. L'absence d'aggravation des marqueurs pro-inflammatoires chez des souris déficientes pour un canal potassique a aussi été montrée par Schwingshackl et ses collaborateurs. Dans leur étude, les niveaux de la cytokine IL-6 et de MCP-1 varient moins chez les souris qui n'expriment pas le canal potassique TREK-1 ⁴². Les niveaux moins élevés de cytokines pro-inflammatoires observés pourraient être dus au nombre de neutrophiles plus faibles retrouvés dans les BAL des souris KO. Or, tout comme pour l'infiltration cellulaire, la caractérisation de la sécrétion des niveaux de cytokines et de chimiokines à des temps plus

précoces nous permettrait de poser une hypothèse plus précise quant à la différence observée.

Finalement, nos données montrent que l'activation du canal KvLQT1 par le R-L3 induit une forte baisse des paramètres inflammatoires induit par la bléomycine; ces données sont en concordance avec nos analyses histologiques. Nos résultats montrent en effet que le R-L3 entraîne une diminution de l'infiltration cellulaire et du recrutement des neutrophiles au niveau alvéolaire ainsi qu'une baisse de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. L'activation du canal potassique pourrait également moduler les mécanismes de recrutement de cellules inflammatoires, minimisant la chimiotaxie des neutrophiles et induisant alors une baisse de la sécrétion des cytokines et des chimiokines. Le rôle dans l'intégrité épithéliale du KvLQT1 pourrait aussi engendrer un changement dans la sécrétion des cytokines et des chimiokines par les cellules structurales telles les cellules épithéliales ATII et donc diminuer le nombre de neutrophiles recrutés au niveau alvéolaire.

Nos données sur la réponse inflammatoire induite par la bléomycine suggèrent, tout comme pour le modèle de thiourée, que l'activation du canal KvLQT1 semble bénéfique au niveau physiologique. Notre étude portant sur le canal KvLQT1 dresse pour la première fois un portrait descriptif de l'implication de ce canal sur les impacts au niveau alvéolaire.

Finalement, de confirmer l'impact de l'activation KvLQT1 dans un autre modèle *in vivo* de SDRA, par exemple induit par administration de LPS, permettrait de confirmer le rôle du canal dans la résolution du SDRA ^{67,119}.

Conclusion

Les études présentées dans ce mémoire, ainsi que celles décrites dans la littérature, appuient l'importance de la réparation de l'épithélium dans la résolution rapide et efficace des paramètres physiopathologiques du SDRA. Nos résultats ont permis de renforcer l'hypothèse du rôle des canaux potassiques dans les mécanismes de réparation. L'effet bénéfique de l'activation du canal KvLQT1 par la résolution des processus du SDRA dont l'œdème pulmonaire, la réponse inflammatoire et l'intégrité alvéolaire nous permettent alors de proposer le KvLQT1 comme cible potentielle pour le SDRA. Une thérapie pharmacologique combinant des activateurs du canal sodique ENaC et des canaux potassiques pourrait être une avenue potentielle pour la guérison du syndrome.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fraser, R.S. Histology and gross anatomy of the respiratory tract. *Physiol. Basis Respir. Dis.* Chapter 1. (BC Decker, 2005).
2. Sobotta, J., Putz, R., Pabst, R., Taylor, A.N. *Atlas of human anatomy : Head, neck, upper limbs.* (Williams & Wilkins, 1997).
3. Drake, R.L., Vogl, W., Mitchell, A.W.M., Gray, H., Gray, H. *Gray's anatomy for students.* (Churchill Livingstone/Elsevier, 2010).
4. Losa, D., Chanson, M. The lung communication network. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2793–2808 (2015).
5. Stone, K.C., Mercer, R.R., Freeman, B.A, Chang, L.Y., Crapo, J.D. Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 454–456 (1992).
6. Schmitz, G., Müller, G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J. Lipid Res.* **32**, 1539–70 (1991).
7. Johnson, M.D., Bao, H.-F., Helms, M.N., Chen, X.-J., Tigue, Z., Jain, L., Dobbs, L.G., Eaton, D.C. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* **103**, 4964–4969 (2006).
8. Ware, L., Matthay, M. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1334–1349 (2000).
9. Stone, K.C., Mercer, R.R., Gehr, P., Stockstill, B., Crapo, J.D. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**, 235–243 (1992).
10. Dobbs, L., Johnson, M., Vanderbilt, J., Allen, L., Gonzalez, R. The great big alveolar TI cell: Evolving concepts and paradigms. *Cell. Physiol. Biochem.* **25**, 55–62 (2010).
11. Melo-Silva, C. A., Gaio, E., Trevizoli, J.E., Souza, C.S., Gonçalves, A.S., Sousa, G.C.C., Takano, G., Tavares, P., Amado, V.M. Respiratory mechanics and lung tissue remodeling in a hepatopulmonary syndrome rat model. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **179**, 326–33 (2011).
12. Nielsen, S., King, L.S., Christensen, B.M., Agre, P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am. J. Physiol.*

- 273**, C1549–C1561 (1997).
13. Johnson, M.D. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol. Biosyst.* **3**, 178–186 (2007).
 14. Wang, D., Haviland, D.L., Burns, A.R., Zsigmond, E., Wetsel, R.A. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4449–4454 (2007).
 15. Fehrenbach, H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* **2**, 33–46 (2001).
 16. Hawgood, S., Brown, C., Edmondson, J., Stumbaugh, A., Allen, L., Goerke, J., Clark, H., Poulain, F. Pulmonary Collectins Modulate Strain-Specific Influenza A Virus Infection and Host Responses. *Society* **78**, 8565–8572 (2004).
 17. Parks, W.C., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L. Matrilysin in epithelial repair and defense. *Chest* **120**, 36S–41S (2001).
 18. Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A., Voyno-Yasenetskaya, T.A. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L259–71 (2007).
 19. Homer, R.J., Zheng, T., Chupp, G., He, S., Zhu, Z., Chen, Q., Ma, B., Hite, R.D., Gobran, L.I., Rooney, S.A., Elias, J.A. Pulmonary type II cell hypertrophy and pulmonary lipoproteinosis are features of chronic IL-13 exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L52–9 (2002).
 20. Thorley, A.J., Ford, P.A., Giembycz, M.A., Goldstraw, P., Young, A., Tetley, T.D. Differential Regulation of Cytokine Release and Leukocyte Migration by Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Human Lung Alveolar Type II Epithelial Cells and Macrophages. *J. Immunol.* **178**, 463–473 (2006).
 21. Vanderbilt, J. N., Mager, E.M., Allen, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., Gonzalez, R., Dobbs, L.G. CXC Chemokines and Their Receptors Are Expressed in Type II Cells and Upregulated following Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 661–668 (2003).
 22. Witherden, I.R., Vanden Bon, E.J., Goldstraw, P., Ratcliffe, C., Pastorino, U., Tetley, T.D. Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: Effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 500–509 (2004).

23. Yang, W., Hu, B., Wu, W., Batra, S., Blackburn, M.R., Alcorn, J.L., Fallon, M.B., Zhang, J. Alveolar type II epithelial cell dysfunction in rat experimental hepatopulmonary syndrome (HPS). *PLoS One* **9**, 1–17 (2014).
24. Hawgood, S., Shiffer, K. Structures and Properties of the surfactant-associated proteins. *Annu.Rev.Physiol.* 375–94 (1991).
25. Raghavendran, K., Willson, D., Notter, R. Surfactant Therapy of ALI and ARDS. *Cirt Care Clin* **27**, 525–559 (2012).
26. Wright, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 58–68 (2005).
27. Bräuer, L., Kindler, C., Jäger, K., Sel, S., Nölle, B., Pleyer, U., Ochs, M., Paulsen, F.P. Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 3945–3953 (2007).
28. Weaver, T. E., Conkright, J. J. Functions of surfactant proteins B and C. *Annu. Rev. Physiol.* 555–78 (2001).
29. Nogee, L. M. Abnormal expression of surfactant protein C and lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 641–644 (2002).
30. Ware, L.B., Matthay, M.A. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1376–1383 (2001).
31. Dagenais, A., Boncoeur, É., Berthiaume, Y. Transport du Na⁺ dans les poumons. *Med. Sci.* **25**, 815–820 (2009).
32. Hastings, R.H., Folkesson, H.G., Matthay, M.A. Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, L679–L689 (2004).
33. Bardou, O., Ngan Trinh, N.T., Brochiero, E. Canaux potassiques et physiologie de l'épithélium respiratoire. *Medecine/Sciences* **25**, 391–397 (2009).
34. Matthay, M.A. Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1301–1308 (2014).
35. Gormley, K., Dong, Y., Sagnella, G. A. Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem. J.* **371**, 1–14 (2003).
36. Rainer Waldmann, G.C., Frédéric Bassilana, N.V., Lazdunski, M. Molecular

- Cloning and Functional Expression of a Novel Amiloride-sensitive. 27411–27414 (1995).
37. Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Brochiero, E. K⁺ channels regulate ENaC expression *via* changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 1682–1690 (2012).
 38. Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D., Rossier, B.C. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463–467 (1994).
 39. Marunaka, Y., Niisato, N., Taruno, A., Ohta, M., Miyazaki, H., Hosogi, S., Nakajima, K., Kusuzaki, K., Ashihara, E., Nishio, K., Iwasaki, Y., Nakahari, T., Kubota, T. Regulation of epithelial sodium transport *via* epithelial Na⁺ channel. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 978196 (2011).
 40. Berthiaume, Y., Matthay, M.A. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **159**, 350–359 (2007).
 41. Girault, A., Brochiero, E. Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C307–19 (2014).
 42. Schwingshackl, A., Teng, B., Makena, P., Ghosh, M., Sinclair, S.E., Luellen, C., Balasz, L., Rovnaghi, C., Bryan, R.M., Lloyd, E.E., Fitzpatrick, E., Saravia, J.S., Cormier, S.A., Waters, C.M. Deficiency of the two-pore-domain potassium channel TREK-1 promotes hyperoxia-induced lung injury. *Crit. Care Med.* **42**, e692–701 (2014).
 43. Roan, E., Waters, C.M., Teng, B., Ghosh, M., Schwingshackl, A. The 2-pore domain potassium channel TREK-1 regulates stretch-induced detachment of alveolar epithelial cells. *PLoS One* **9**, 1–6 (2014).
 44. Jespersen, T., Grunnet, M., Olesen, S.-P. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda)*. **20**, 408–416 (2005).
 45. Casimiro, M.C. Knollmann, B.C., Ebert, S.N., Vary, J.C. Jr, Greene, A.E., Franz, M.R., Grinberg, A., Huang, S.P., Pfeifer, K. Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* **98**, 2526–31 (2001).
46. Melman, Y.F., Krummerman, A., McDonald, T.V. KCNE regulation of KvLQT1 channels: Structure-function correlates. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 182–187 (2002).
 47. Laube, M., Bossmann, M., Thome, U. H. Glucocorticoids distinctively modulate the CFTR channel with possible implications in lung development and transition into extrauterine life. *PLoSOne* **10**, 1–21 (2015).
 48. Jow, F., Tseng, E., Maddox, T., Shen, R., Kowal, D., Dunlop, J., Mekonnen, B., Wang, K. Rb⁺ efflux through functional activation of cardiac KCNQ1/minK channels by the benzodiazepine R-L3 (L-364,373). *Assay Drug Dev. Technol.* **4**, 443–450 (2006).
 49. Lerche, C., Bruhova, I., Lerche, H., Steinmeyer, K., Wei, A.D., Strutz-Seebohm, N., Lang, F., Busch, A.E., Zhorov, B.S., Seebohm, G. Chromanol 293B binding in KCNQ1 (Kv7.1) channels involves electrostatic interactions with a potassium ion in the selectivity filter. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1503–1511 (2007).
 50. Wulff, H., Castle, N. Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **3**, 385–396 (2010).
 51. Klein, H., Abu-Arish, A., Trinh, N.T., Luo, Y., Wiseman, P.W., Hanrahan, J.W., Brochiero, E., Sauvé, R. Investigating CFTR and KCa3.1 Protein/Protein Interactions. *PLoSOne* **11**, e0153665 (2016).
 52. Garneau, L., Klein, H., Parent, L., Sauvé, R. Toward the rational design of constitutively active KCa3.1 mutant channels. *Methods Enzymol.* **485**, 437–457 (2010).
 53. Vetter, A. E., Deachapunya, C., O’Grady, S. M. Na absorption across endometrial epithelial cells is stimulated by cAMP-dependent activation of an inwardly rectifying K channel. *J. Membr. Biol.* **160**, 119–126 (1997).
 54. Liu, J., Hu, F., Wang, G., Zhou, Q., Ding, G. Lipopolysaccharide-induced expression of surfactant proteins A1 and A2 in human renal tubular epithelial cells. *J. Inflamm.* **10**, 2 (2013).
 55. Crosby, L.M., Waters, C.M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **298**, L715–L731 (2010).

56. Sivakumar, P., Ntoliou, P., Jenkins, G., Laurent, G. Into the matrix: targeting fibroblasts in pulmonary fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **18**, 462–469 (2012).
57. Shimabukuro, D.W., Sawa, T., Gropper, M.A. Injury and repair in lung and airways. *Crit. Care Med.* **31**, S524–31 (2003).
58. Ware, Lorraine B., Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. *New Engl. J. Med. Rev.* **342**, 1334–1349 (2014).
59. Trinh, N., Privé, A., Maillé, E., Noe, J., Brochiero, E. EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L866–L880 (2008).
60. Maillé, E., Trinh, N.T., Privé, A., Bilodeau, C., Bissonnette, E., Grandvaux, N., Brochiero, E. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**, L945–55 (2011).
61. Trinh, N.T., Privé, A., Kheir, L., Bourret, J.C., Hijazi, T., Amraei, M.G., Noël, J., Brochiero, E. Involvement of K_{ATP} and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L870–L882 (2007).
62. Fernandez, I.E., Eickelberg, O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **9**, 111–116 (2012).
63. The ARDS Definition Task Force., Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., Thompson, B.T., Ferguson, N.D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., Slutsky, A.S. Acute Respiratory Distress Syndrome. *Jama* **307**, 2526–2533 (2012).
64. Doyle, R.L., Szaflarski, N., Modin, G.W., Wiener-Kronish, J.P. & Matthay, M.A. Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 1818–1824 (1995).
65. Sloane, P.J., Gee, M.H., Gottlieb, J.E., Albertine, K.H., Peters, S.P., Burns, J.R., Machiedo, G., Fish, J.E. A Multicenter Registry of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: Physiology and Outcome. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 419–426 (1992).
66. Pepe, P.E., Potkin, R.T., Reus, D.H., Hudson, L.D., Carrico, C.J. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Surg.* **144**, 124–130 (1982).

67. Tasaka, S., Hasegawa, N., Ishizaka, A. Pharmacology of acute lung injury. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **15**, 83–95 (2002).
68. Hudson, L.D., Milberg, J.A., Anardi, D., Maunder, R.J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 293–301 (1995).
69. Conference report: Mechanisms of acute respiratory failure. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**, 1071–1078 (1977).
70. Moss, M. The Role of Chronic Alcohol Abuse in the Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Adults. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **275**, 50 (1996).
71. Phua, J., Badia, J.R., Adhikari, N.K., Friedrich, J.O., Fowler, R.A., Singh, J.M., Scales, D.C., Stather, D.R., Li, A., Jones, A., Gattas, D.J., Hallett, D., Tomlinson, G., Stewart, T.E, Ferguson, N.D. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 220–227 (2009).
72. Checkley, W. Neuregulin-1 as a potentially novel biomarker in acute respiratory distress syndrome. *The European respiratory journal* **41**, 259–261 (2013).
73. Fitzgerald, M., McAuley, D. F., Matthay, M. Is there a need for emerging drugs for the acute respiratory distress syndrome? *Expert Opin. Emerg. Drugs* **19**, 323–8 (2014).
74. Berthiaume, Y., Lesur, O., Dagenais, A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* **54**, 150–160 (1999).
75. Maron, M. B., Luther, D.J., Pilati, C.F., Ohanyan, V., Li, T., Koshy, S., Horne, W.I., Meszaros, J.G., Walro, J.M., Folkesson, H.G. Beta-adrenoceptor stimulation of alveolar fluid clearance is increased in rats with heart failure. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L487–95 (2009).
76. Zhao, J., Liu, Y., Li, H. Corticosteroids in treatment of aspiration-related acute respiratory distress syndrome: results of a retrospective cohort study. *BMC Pulm. Med.* **16**, 29 (2016).
77. Umberto Meduri, G., Tolley, E.A., Chrousos, G.P., Stentz, F. Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with

- unresolving acute respiratory distress syndrome: Evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucoc. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 983–991 (2002).
78. Sprung, C.L., Annane, D., Keh, D., Moreno, R., Singer, M., Freivogel, K., Weiss, Y.G., Benbenishty, J., Kalenka, A., Forst, H., Laterre, P.F., Reinhart, K., Cuthbertson, B.H., Payen, D., Briegel, J. CORTICUS Study Group. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N. Engl. J. Med.* **358**, 111–124 (2008).
 79. Girault, A., Chebli, J., Privé, A., Trinh, N.T., Maillé, E., Grygorczyk, R., Brochiero, E. Complementary roles of KCa3.1 channels and β 1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir. Res.* **16**, 1–15 (2015).
 80. Schwingshackl, A., Teng, B., Ghosh, M., West, A.N., Makena, P., Gorantla, V., Sinclair, S.E., Waters, C.M. Regulation and function of the two-pore-domain (K2P) potassium channel Trek-1 in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L93–L102 (2012).
 81. Maruyama, N., Kakuta, Y., Yamauchi, K., Ohkawara, Y., Aizawa, T., Ohru, T., Nara, M., Oshiro, T., Ohno, I., Tamura, G. Quinine inhibits production of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 514–520 (1994).
 82. Cruse, G., Singh, S.R., Duffy, S.M., Doe, C., Saunders, R., Brightling, C.E., Bradding, P. Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human fibrocyte migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 1303–1309.e2 (2011).
 83. Burgazli, K. M., Venker, C.J., Mericililer, M., Atmaca, N., Parahuleva, M., Erdogan, A. Importance of large conductance calcium-activated potassium channels (BKCa) in interleukin-1b-induced adhesion of monocytes to endothelial cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **18**, 646–656 (2014).
 84. Henriquez, C., Riquelme, T.T., Vera, D., Julio-Kalajzić, F., Ehrenfeld, P., Melvin, J.E., Figueroa, C.D., Sarmiento, J., Flores, C.A. The calcium-activated potassium channel KCa3.1 plays a central role in the chemotactic response of mammalian neutrophils. *Acta Physiol. (Oxf).* **216**, 132–145 (2016).
 85. Pompermayer, K., Amaral, F.A., Fagundes, C.T., Vieira, A.T., Cunha, F.Q., Teixeira, M.M., Souza, D.G. Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-

- sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* **556**, 215–222 (2007).
86. Kim, H. J., Henke, C. A., Savik, S. K., Ingbar, D. H. Integrin mediation of alveolar epithelial cell migration on fibronectin and type I collagen. *Am. J. Physiol.* **273**, L134–L141 (1997).
 87. deHart, G.W., Jin, T., McCloskey, D.E., Pegg, A.E., Sheppard, D. The alpha-beta-integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7188–7193 (2008).
 88. Tyson, J., Tranebjaerg, L., Bellman, S., Wren, C., Taylor, J.F., Bathen, J., Aslaksen, B., Sørland, S.J., Lund, O., Malcolm, S., Pembrey, M., Bhattacharya, S., Bitner-Glindzicz, M. IsK and KvLQT1: Mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2179–2185 (1997).
 89. Cunningham, A.L., Hurley, J.V. Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study. *J. Pathol.* **106**, 25–35 (1972).
 90. Egli, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., Sartori, C., Scherrer, U. Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J. Physiol.* **560**, 857–65 (2004).
 91. Havill, A.M., Gee, M.H. Resolution of Increased Permeability Pulmonary Edema in Rats. *American Journal of Pathology.* **127**, 1–6 (1987).
 92. Pittet, J.F., Wiener-Kronish, J.P., McElroy, M.C., Folkesson, H.G., Matthay, M.A. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J. Clin. Invest.* **94**, 663–671 (1994).
 93. Matute-bello, G., Frevert, C.W., Martin, T.R. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295** **295**, L379–L399 (2008).
 94. Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Brochiero, E. Molecular identity and function in transepithelial transport of K_(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1027–37 (2004).

95. Leroy, C., Privé, A., Bourret, J.C., Berthiaume, Y., Ferraro, P., Brochiero, E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, L1207–L1219 (2006).
96. Dobbs, L.G., Gonzalez, R., Williams, M.C. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* **134**, 141–145 (1986).
97. Brochiero, E., Dagenais, A., Privé, A., Berthiaume, Y., Grygorczyk, R. Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L382–92 (2004).
98. Dagenais, A., Fréchette, R., Clermont, M.E., Massé, C., Privé, A., Brochiero, E., Berthiaume, Y. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, L1220–L1231 (2006).
99. Girault, A., Privé, A., Trinh, N.T., Bardou, O., Ferraro, P., Joubert, P., Bertrand, R., Brochiero, E. Identification of KvLQT1 K⁺ channels as new regulators of non-small cell lung cancer cell proliferation and migration. *Int. J. Oncol.* 838–848 (2013).
100. Trinh, N.T., Bardou, O., Privé, A., Maillé, E., Adam, D., Lingée, S., Ferraro, P., Desrosiers, M.Y., Coraux, C., Brochiero, E. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur. Respir. J.* **40**, 1390–1400 (2012).
101. Bilodeau, C., Bardou, O., Maille, E., Berthiaume, Y., Brochiero, E. Deleterious impact of hyperglycemia on cystic fibrosis airway ion transport and epithelial repair. *J. Cyst. Fibros.* **15**, 43–51 (2014).
102. Klein, H., Garneau, L., Trinh, N.T., Privé, A., Dionne, F., Goupil, E., Thuringer, D., Parent, L., Brochiero, E., Sauvé, R. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. **7**, 285–295 (2009).
103. Herard, A., Zahm, J.M., Pierrot, D., Hinrasky, J., Fuchey, C., Puchelle, E. Epithelial barrier integrity during *in vitro* wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 624–632 (1996).
104. Hay, J., Shahzeidi, S., Laurent, G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* **65**, 81–94 (1991).
105. Nishida, T., Nakagawa, S., Awata, T., Ohashi, Y., Watanabe, K., Manabe, R.

- Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. *J. Cell Biol.* **97**, 1653–1657 (1983).
106. Takashima, A., Grinnell, F. Human Keratinocyte Adhesion and Phagocytosis Promoted by Fibronectin. *J Invest Dermatol* **83**, 352–358 (1984).
 107. Bachman, H., Nicosia, J., Dysart, M., Barker, T. H. Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Adv. wound care* **4**, 501–511 (2015).
 108. Grössinger, E.M., Weiss, L., Zierler, S., Rebhandl, S., Krenn, P.W., Hinterseer, E., Schmölzer, J., Asslaber, D., Hainzl, S., Neureiter, D., Egle, A., Piñón-Hofbauer, J., Hartmann, T.N., Greil, R., Kerschbaum, H.H. Targeting proliferation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through KCa3.1 blockade. *Leukemia* **28**, 954–958 (2014).
 109. Tao, R., Lau, C.-P., Tse, H.-F., Li, G.-R. Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca²⁺-activated potassium and volume-sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C1409–C1416 (2008).
 110. Yang, Y., Wu, X., Gui, P., Wu, J., Sheng, J.Z., Ling, S., Braun, A.P., Davis, G.E., Davis, M.J. alpha5beta1 integrin engagement increases large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel current and Ca²⁺ sensitivity through c-src-mediated channel phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **285**, 131–141 (2010).
 111. Luque, A., Gómez, M., Puzon, W., Takada, Y., Sánchez-Madrid, F., Cabañas, C. Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta1 chain. *J. Biol. Chem.* **271**, 11067–11075 (1996).
 112. Bertozzi, P., Astedt, B., Zenzius, L., Lynch, K., LeMaire, F., Zapol, W., Chapman, H.A. Jr. Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **322**, 890–897 (1990).
 113. Roach, K. M., Feghali-Bostwick, C., Wulff, H., Amrani, Y., Bradding, P. Human lung myofibroblast TGFβ1-dependent Smad2/3 signalling is Ca²⁺-dependent and regulated by KCa3.1 K⁺ channels. *Fibrogenesis Tissue Repair* **8**, 1–12 (2015).
 114. Han, D.-Y., Nie, H.G., Gu, X., Nayak, R.C., Su, X.F., Fu, J., Chang, Y., Rao, V., Ji,

- HL. K⁺ channel openers restore verapamil-inhibited lung fluid resolution and transepithelial ion transport. *Respir. Res.* **11**, 65–82 (2010).
115. Della Latta, V., Cecchetti, A., Del Ry, S., Morales, M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol. Res.* **97**, 122–130 (2015).
116. Egger, C., Gérard, C., Vidotto, N., Accart, N., Cannet, C., Dunbar, A., Tigani, B., Piaia, A., Jarai, G., Jarman, E., Schmid, H.A., Beckmann, N. Lung volume quantified by MRI reflects extracellular-matrix deposition and altered pulmonary function in bleomycin models of fibrosis: Effects of SOM230. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **306**, 1064–1077 (2014).
117. Lee, S.-H., Jang, A.S., Kim, Y.E., Cha, J.Y., Kim, T.H., Jung, S., Park, S.K., Lee, Y.K., Won, J.H., Kim, Y.H., Park, C.S. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. *Respir. Res.* **11**, 16–30 (2010).
118. Chilakapati, S.R., Serasanambati, M., Vissavajhala, P., Kanala, J.R., Chilakapati, D.R. Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model by a combination therapy of bosentan and imatinib. *Exp. Lung Res.* **41**, 173–188 (2015).
119. Shyamsundar, M., McKeown, S.T., O'Kane, C.M., Craig, T.R., Brown, V., Thickett, D.R., Matthay, M.A., Taggart, C.C., Backman, J.T., Elborn, J.S., McAuley, D.F. Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 1107–1114 (2009).

ANNEXE

Complementary roles of KCa3.1 channels and β 1-integrin during alveolar epithelial repair

Alban Girault^{1,2}, Jasmine Chebli^{1,2}, Anik Privé¹, Nguyen Thu Ngan Trinh^{1,2}, Emilie Maillé¹, Ryszard Grygorczyk^{1,2}, Emmanuelle Brochiero^{1,2}.

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Tour Viger, 900 rue Saint-Denis, Montréal, Québec, Canada, H2X0A9; ²Département de médecine, Université de Montréal, CP6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C3J7.

jasmine.chebli@umontreal.ca; anik.prive.chum@ssss.gouv.qc.ca;

tnguyenngan@jgh.mcgill.ca; emilie.maille.chum@ssss.gouv.qc.ca;

ryszard.grygorczyk@umontreal.ca; emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

CORRESPONDING AUTHOR:

Emmanuelle Brochiero, Ph.D.

Centre de recherche du CHUM (CRCHUM)

Tour Viger, 8ième étage, 900 rue Saint-Denis, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

Telephone: 514-890-000 ext. 14691

ABSTRACT

Background: Extensive alveolar epithelial injury and remodelling is a common feature of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (ARDS) and it has been established that epithelial regeneration, and secondary lung oedema resorption, is crucial for ARDS resolution. Much evidence indicates that K^+ channels are regulating epithelial repair processes; however, involvement of the KCa3.1 channels in alveolar repair has never been investigated before.

Results: Wound-healing assays demonstrated that the repair rates were increased in primary rat alveolar cell monolayers grown on a fibronectin matrix compared to non-coated supports, whereas an anti- β 1-integrin antibody reduced it. KCa3.1 inhibition/silencing impaired the fibronectin-stimulated wound-healing rates, as well as cell migration and proliferation, but had no effect in the absence of coating. We then evaluated a putative relationship between KCa3.1 channel and the migratory machinery protein β 1-integrin, which is activated by fibronectin. Co-immunoprecipitation and immunofluorescence experiments indicated a link between the two proteins and revealed their cellular co-distribution. In addition, we demonstrated that KCa3.1 channel and β 1-integrin membrane expressions were increased on a fibronectin matrix. We also showed increased intracellular calcium concentrations as well as enhanced expression of TRPC4, a voltage-independent calcium channel belonging to the large TRP channel family, on a fibronectin matrix. Finally, wound-healing assays showed additive effects of KCa3.1 and TRPC4 inhibitors on alveolar epithelial repair.

Conclusion: Taken together, our data demonstrate for the first time complementary roles of KCa3.1 and TRPC4 channels with extracellular matrix and β 1-integrin in the regulation of alveolar repair processes.

KEYWORDS: KCa3.1, TRPC4, β 1-integrin, fibronectin, epithelial wound repair, injury, migration, proliferation.

BACKGROUND

Extensive damage and remodelling of the alveolar epithelium occur in various lung pathologies, including acute lung injury (ALI) and its more severe form, acute respiratory distress syndrome (ARDS) [1-3]. Alveolar regeneration, which is crucial to restore alveolar epithelial integrity and function, is thus a critical component of ARDS resolution and patient recovery [1,2,4].

After damage, several cellular events are engaged in an attempt to restore alveolar integrity, including changes in cell-matrix adhesion through the action of matrix metalloproteinases and integrin receptors, cytoskeleton reorganization, cell spreading and migration, as well as cell proliferation and differentiation [5]. These complex processes integrate multiple mechanisms and proteins, which are regulated by various components such as growth factors, growth factor receptors and downstream signalling pathways [5-7]. Integrins play an active role in epithelial repair, not only by creating a link between the ECM and cell cytoskeleton but also by interacting with proteins involved in cell migration and proliferation, including growth factor receptors, protein kinases as well as ion channels [8-11]. β 1-integrin, for example, has been shown to regulate alveolar type II (ATII) cell migration on fibronectin matrix [12]. Moreover, increased levels of fibronectin and collagen have been detected in lung tissues from patients with ARDS [13].

Increasing evidence also indicates a function of potassium (K^+) channels in the regulation of epithelial repair processes [14]. More precisely, silencing or inhibition of different types of K^+ channels has been reported to decrease epithelial cell proliferation [15-18], motility [15,16,19-23] and differentiation [20], as well as epithelial wound repair [15,16,24-26]. Our data on primary rat ATII cells previously highlighted an involvement of two types of K^+ channels, i.e. K_vLQT1 and K_{ATP} , in the control of cell proliferation, motility and repair [15]. A role for $KCa3.1$ channels in airway ion transport [27,28], as well as repair processes of several epithelial tissues [16,22,29] has also been established; however, the contribution of this channel in alveolar repair has not been explored before.

The mechanisms whereby K^+ channels control epithelial repair processes may be multiple, including changes in membrane potential, cell volume and shape, $[Ca^{2+}]_i$ and various signalling pathways (for review see [14]). In addition, several reports indicated that different types of K^+ channels (e.g. $BKCa$, $Kv1.3$, $hERG$, $GIRK$, $Kir4.2$) could also directly

interact with migratory machinery proteins, such as β 1-integrins [30-33]. However, to the best of our knowledge, a relationship between the KCa3.1 and β 1-integrin in epithelial cells has never been investigated before.

Based on these data, we postulated that KCa3.1 and β 1-integrin play a complementary role during alveolar epithelial repair. We thus evaluated the roles of extracellular fibronectin matrix, β 1-integrin and KCa3.1 channels in alveolar repair processes, especially cell migration, proliferation and wound healing after mechanical injury. Finally, the regulation and complementary function of TRPC4 Ca^{2+} channels were explored.

METHODS

Alveolar Epithelial Type II Cell Isolation and Primary Culture

Alveolar epithelial cells were isolated from rat lungs according to a procedure approved by our institutional animal care committee (CIPA) of Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) in accordance with the Canadian Council of Animal Care (CCAC) standards. Alveolar epithelial type II (ATII) cells were isolated from adult male Sprague-Dawley rats (6–7 wk), according to a well-established protocol [15,34-36]. In brief, the lungs were washed to remove blood cells and alveolar macrophages before treatment with elastase (Worthington, Lakewood, NJ, USA). They were then minced, and the resulting suspension was filtered. Alveolar cells were collected and purified using a differential adherence technique [37], which enhances the purity of the ATII cell pool up to 86% [35,38]. Although most of the macrophages are bound on IgG coated plates during this differential adherence technique, some retained in the final post-IgG cell mix (along with some red blood cells), where they likely constituted a significant proportion of non-alveolar cells in the cell prep at day 0 [38]. This freshly isolated cell suspension was seeded on Petri dishes (Corning, Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON, Canada) or on glass slides (VWR International, Mississauga, ON, Canada) and adherent alveolar epithelial cells were cultured in minimal essential medium (MEM; Gibco, Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) containing 10% FBS (Gibco, Life Technologies Inc.), 0.08 mg/l gentamicin, septria (3 µg/ml trimethoprim + 17 µg/ml sulfamethoxazole), 0.2% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 10 mM HEPES (Hyclone, Fisher Scientific Ltd.) , and 2 mM L-glutamine (Gibco, Life Technologies Inc.), as previously described [15,35]. The MEM-FBS-septria medium was replaced after 3 days by the same MEM-FBS without septria.

Wound-healing assay

ATII cells, cultured for 3-4 days, were injured mechanically with a pipette tip (six wounds per Petri dish) according to a highly reproducible technique [15,16,39-42]. This commonly employed “wound-healing assay” allows for the study of early mechanisms engaged after injury, i.e. cell migration and proliferation [39]. A mark on the Petri dishes enabled us to photograph the wounds at exactly the same place at various times (at time 0 after injury and after 24 h of repair). The rate of wound closure, presented in µm²/h, was calculated

with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) from the wound area measured after repair compared with the initial wound area, for each wound.

Proliferation assay

ATII cells were seeded at low density (52,000/cm²) in 35-mm Petri dishes for 3 days in MEM-FBS-sepra medium and then exposed or not to TRAM-34 (Sigma-Aldrich) for a 24-h period. Cell growth was evaluated by counting the number of ATII cells by separation with trypsin-EDTA (0.05%, Gibco, Life Technologies Inc.) before (at day 3, T₀) and after (at day 4, T_{24h}) treatment. The absence of drug cytotoxicity was verified by trypan-blue exclusion assay. The number of ATII cells was also counted at day 3 after transfection with negative control or KCa3.1 siRNAs (see section on siRNA transfection).

Cell migration assays

ATII cell migration was first evaluated by Boyden-type chamber assays, as previously described [15,39]. Briefly, primary ATII cells were separated with trypsin-EDTA (Gibco, Life Technologies Inc.), counted, and their viability was verified with Trypan blue assay (Sigma-Aldrich). A series of experiments was also performed on ATII cells previously transfected with negative control or KCa3.1 siRNAs (see section on siRNA transfection). The cell suspensions (75,000 cells in FBS-free MEM) were placed in the upper compartment of 8- μ m pore filters (0.33 cm², ThinCerts-TC inserts, Greiner Bio-one; MJS Biolynx, Brockville, ON, Canada) coated on the lower side with a gelatin (control condition, Sigma-Aldrich) or fibronectin matrix (Sigma-Aldrich). The lower compartment was filled with FBS-free MEM in the absence or presence of TRAM-34. After an 18-h migration period, the filters were washed with PBS, the cells were fixed with paraformaldehyde-acetone solution and then stained with hematoxylin (Sigma-Aldrich). Non-migrating cells in the upper compartment were scraped off with cotton-tipped applicators (Fisher Scientific Ltd.), whereas migrating cells on the lower face of the filters were counted in different randomly chosen fields under a light-inverted microscope at x20 magnification. Two-D cell migration rates (μ m/h) of single cells were also evaluated by single-cell tracking in live-video microscopy experiments. Images were captured at 5-min intervals over a 24-h period by digital camera connected to Zeiss microscope. The migration rates and cell trajectories were analyzed by AxioVision software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Immunoblotting of enriched ATII membrane fractions and co-immunoprecipitation of KCa3.1 and β 1-integrin

For enriched membrane fraction assays, ATII cells were scraped into TRIS-sucrose buffer (20 mM TRIS HCl (Life Technologies Inc.), 5 mM EDTA (ACP, Montréal, QC, Canada), 200 mM sucrose (Sigma-Aldrich), protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche Applied Science, Laval, QC, Canada)) and then homogenized with a glass putter for 1 min. Cell lysates were centrifuged 15 minutes at 3,000 rpm (4°C), supernatants were collected and then centrifuged at 38,000 rpm for 1h30 at 4°C. Supernatants were harvested and enriched membrane fractions in pellet were resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl (ACP), 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Triton X-100 (Fisher Scientific Ltd.), 0.1% SDS (Bioshop Canada Inc., Burlington, ON, Canada), protease inhibitor cocktail). Protein concentrations were then measured by Bradford assay and immunoblotting was conducted as described below.

For co-immunoprecipitation assays, ATII cell lysis was performed in buffer 1 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P40, and 0.5% sodium deoxycholate) from the immunoprecipitation kit (protein A, Roche Applied Science) following the manufacturer's instructions. The lysates were homogenized and isolated by centrifugation. After quantification using the Bradford method, 1–2 mg proteins from the soluble lysate were precleared with 50 μ l of 50% protein A-agarose suspension. The precleared soluble lysates were then incubated for 1–2 h with a rabbit anti-KCa3.1 antibody (APC-064, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) [43] or a mouse anti- β 1-integrin antibody (610467, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The immunocomplexes were precipitated by overnight incubation at 4°C with 50 μ l of 50% protein A-agarose suspension. After being washed twice with both buffer 1 (see composition above) and buffer 2 (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% Nonidet P40, 0.05% sodium deoxycholate) and then once with buffer 3 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% Nonidet P40, 0.05% sodium deoxycholate), proteins bound to beads were collected by centrifugation and eluted by 30–50 μ l of 2X sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 4% β -mercaptoethanol). Control assays, in the absence of lysate or antibodies during IP, have also been performed.

Enriched membrane fraction proteins and immunoprecipitated proteins were then separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada) according to a well-established laboratory protocol [15,36]. After blocking, the membranes were incubated with anti-KCa3.1 (APC-064, Alomone Labs), anti- β 1-integrin (610467, BD Biosciences) or anti-TRPC4 (ACC-018, Alomone Labs) antibodies. After washing, the membranes were incubated with goat anti-rabbit (for KCa3.1 and TRPC4, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and goat anti-mouse (for β 1-integrin, Millipore, Etobicoke, ON, Canada) IgG linked to horseradish peroxidase for 1 h. The intensity of each specific band was quantified with ChemiDoc XRS+ Molecular Imager and Image Lab software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Immunofluorescence assay

ATII cells were seeded at low confluency on glass coverslips. On day 3, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in PBS for 20 minutes and permeabilized with 0.1% triton X100 in PBS for 10 minutes at room temperature. After blocking in PBS containing 5% bovine serum albumin (Fisher Scientific Ltd.) for 1h30, cells were incubated with specific anti-KCa3.1 and β 1-integrin antibodies for 1h30. Absence of background signal and non-specific staining was verified in control experiments, by omitting primary antibodies. Cells were then incubated with anti-rabbit-CF633 (Sigma-Aldrich, for KCa3.1 detection) or Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse (Life Technologies Inc., for β 1-integrin detection) antibodies for 45 min. Slides were finally rinsed and counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich). Fluorescent images were captured with an ExiAqua camera (QImaging, Surrey, BC, Canada) connected to an Olympus fluorescence microscope (Olympus, Richmond Hill, ON, Canada).

Small interfering (si)RNA transfections

After isolation, ATII cells in suspension were transfected with a combination of LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) and Universal negative control or KCa3.1 siRNAs (Sigma-Aldrich). Five h after seeding, fresh complete MEM was added onto cells, which were then primary cultured for 3 to 4 days. Efficient transfection (>80%) was observed in these conditions and KCa3.1 silencing (>70%) was verified by PCR (see below).

PCR amplifications

Five μg of total RNA purified from ATII cells with TRIzol reagent (Life Technologies Inc.) was reverse-transcribed into cDNA with MMLV reverse transcriptase (RT, Life Technologies Inc.) in the presence of oligodT primers (Invitrogen, Life Technologies Inc.). cDNAs were amplified with Taq polymerase (Life Technologies Inc.) and specific primers designed from sequences of rat KCa3.1 and TRPC channels: KCa3.1 5'-gctgttcatgactgacaacg-3' and 5'-catagccaatggcaggaac-3', 500-bp product; TRPC1 5'-gattttgggaaatttctaggaatg-3' and 5'-ctcatgattgctatcagctgg-3', 363-bp product; TRPC2 5'-cgttccagtttcttcttctggacat-3' and 5'-agcatcgtcctcgatcttctgg-3', 191-bp product; TRPC3 5'-tgatgaggtgaacgaaggtgaactg-3' and 5'-tgccccacattgtgccagagtca-3', 206-bp product; TRPC4 5'-tetgcagatatctctgggaaggatgc-3' and 5'-aagctttgttcgagcaaattccattc-3', 415-bp product; TRPC5 5'-cccggcatgaattcacggag-3' and 5'-catggtcggcaatgagctggtag-3', 129-bp product; TRPC6 5'-gagaacataggctatgttctgtatggagtc-3' and 5'-gccatcatcctcaatttctctgg-3', 114-bp product; TRPC7 5'-tcctttaacctgggtgccgagtc-3' and 5'-ttcagcatgccatttcagg-3', 129-bp product. Primer pairs were designed in distinct exons to avoid genomic DNA amplification. RT-PCR amplification was undertaken according to a well-established laboratory protocol [35,36,44]. PCR products were normalized with the β -actin signal for each cDNA sample (β -actin 5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3' and 5'-gccatcttctgctcgaagtc-3', 311-bp product). The RT-PCR products were finally separated on agarose gels, stained with SYBR Safe (Life Technologies Inc.). Signals were detected by Typhoon Gel Imager and analyzed by ImageQuant software (Molecular Dynamics, Baie d'Urfé, QC, Canada) [35,36,44].

Fura-2 calcium imaging

Intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was monitored using the fluorescent dye Fura-2. Briefly, ATII cells cultured on coverslips were loaded (1h15 at 37°C) with 5 μM Fura-2-AM (Life Technologies Inc.) in MEM containing 0.04% pluronic F127 (Life technologies Inc.) followed by a 45 min de-esterification in MEM. Coverslips with loaded cells were then mounted in the imaging chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon TE300, Mississauga, ON, Canada) and bathed with a physiological saline solution (PSS, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 11.1 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4). To measure the Ca^{2+} permeability through ATII cell plasma membranes, PSS was replaced by the same solution without Ca^{2+} and supplemented with 1 mM EGTA (PSS 0 Ca^{2+}). Cells were then alternately excited at 340 and 380 nm with a high-pressure

mercury lamp via interference filters (Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA) mounted on a filter wheel (Sutter Lambda 10-C, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) with a dichroic mirror (510/540 nm, Chroma Technology). Fluorescence images were recorded at 5-s intervals by digital camera using Metafluor software (Molecular Devices, Guelph, ON, Canada) and analyzed with Metafluor Analysis (Molecular Devices). Fura-2 fluorescence measurements (corresponding to the mean fluorescence values of 30 cells / field) are presented as $[Ca^{2+}]_i$, which was calculated accordingly to the Grynkiewicz equation [45], using a Kd of 225 nM. Rmax was determined by the addition of digitonin (4 μ M, Sigma-Aldrich) to PSS (2mM Ca^{2+}) and Rmin by subsequent addition of ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) at a final concentration of 20 mM.

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad software, San Diego, CA, USA) using Wilcoxon signed rank test and one sample sign test. Two-way Anova tests were performed with IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp., Armonk, NY). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Involvement of KCa3.1 in ATII epithelial repair on fibronectin matrix

A well-established wound-healing assay with mechanical injury of primary ATII cell monolayers was used to study the contribution of KCa3.1 channels in the healing process. We first observed that the presence of TRAM-34 (5 and 10 μM), a specific KCa3.1 inhibitor, did not affect the wound-healing rates of ATII cell monolayers in the absence of coating (**Fig. 1B**). In agreement with data from the literature [12], we then confirmed that the wound-closure rates of ATII cell monolayers grown on a fibronectin matrix were higher ($38.3 \pm 3.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) compared to cells cultured in the absence of matrix ($30.5 \pm 3.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$), i.e. an increase of $7.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ ($p < 0.04$, **Fig. 1A** and **1B**). This stimulatory effect was partially prevented by an anti- $\beta 1$ -integrin antibody (decrease of $3.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$, $p < 0.02$, not shown).

We also observed a dose-dependent reduction of fibronectin-stimulated wound-healing rates after KCa3.1 inhibition (15 and 33% inhibition in the presence of 5 and 10 μM TRAM-34 respectively, **Fig. 1B**). In a previous study [15], we demonstrated an involvement of two other types of K^+ channels, i.e. KvLQT1 and K_{ATP} , during alveolar repair which did not require fibronectin coating. We now verified that the wound healing rate on fibronectin coating ($47.0 \pm 3.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) was also significantly reduced in the presence of KvLQT1 and K_{ATP} inhibitors (i.e., clofilium (5 μM) and glibenclamide (10 μM), $32.1 \pm 5.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$, $p < 0.04$, not shown). Moreover, the combination of TRAM-34 (20 μM), with clofilium and glibenclamide, elicited an additional inhibitory effect of the repair rates on fibronectin ($24.4 \pm 4.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$, $p < 0.04$, not shown).

Our data point to an involvement of KCa3.1 channels in the regulation of ATII wound repair in the presence of a fibronectin matrix. We then undertook complementary experiments to further assess the role of KCa3.1 in two crucial processes of epithelial repair, i.e. cell proliferation and migration.

Impact of KCa3.1 inhibition on ATII cell growth

ATII cell growth was evaluated by counting the number of cells at day 3 and 4 in subconfluent primary cultures, exposed to 5, 10 and 20 μM TRAM-34 over the 24-h period (day 3 to day 4). Similar to wound-healing assays, we observed that ATII cell growth was

not affected by KCa3.1 inhibition with TRAM-34 in the absence of fibronectin coating (**Fig. 2A**). However, TRAM-34 significantly decreased the growth of ATII cells cultured on fibronectin matrix (19, 17 and 24% reduction in presence of 5, 10 and 20 μM TRAM-34 respectively, **Fig. 2B**).

Involvement of KCa3.1 in ATII cell motility

The role of KCa3.1 in ATII cell motility was assessed using two complementary approaches. Boyden-type chamber assays first showed that TRAM-34 exposure did not decrease the number of migrating cells in control conditions (absence of fibronectin matrix) (**Fig. 3A, left panel**), whereas fibronectin-stimulated cell migration was significantly reduced by TRAM-34 (12, 19 and 23% inhibition in the presence of 5, 10 and 20 μM TRAM-34 respectively, **Fig. 3A, right panel**). The involvement of KCa3.1 in 2D cell migration dynamics was then assessed by single-cell tracking in subconfluent ATII cell cultures using time-lapse video-microscopy experiments. As depicted in **Fig. 3B**, TRAM-34 did not impact ATII cell trajectories and migration rates in the absence of coating (**left panels, no coating**). On the contrary, ATII cell trajectories on fibronectin matrix were altered by TRAM-34 and the mean migration rate (37 $\mu\text{m}/\text{h}$ in absence of TRAM-34) was decreased to 31, 25 and 24 $\mu\text{m}/\text{h}$ in the presence of 5, 10 and 20 μM TRAM-34, respectively (**Fig. 3B, right panels**). These results demonstrated a crucial role of KCa3.1 channels in the control of ATII cell motility on fibronectin.

Impact of KCa3.1 silencing on wound healing, cell proliferation and migration

To confirm the role of KCa3.1, we then adopted a complementary approach with specific KCa3.1 siRNAs. After verification of siRNA efficiency (**Fig. 4A**), we showed that KCa3.1 down-regulation did not reduced alveolar repair in the absence of coating (**Fig. 4B, left**), whereas it was associated with a significant decrease in wound-healing ($28.8 \pm 2.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ in the presence of KCa3.1 siRNA), compared to ATII cells exposed to negative control siRNA ($33.9 \pm 1.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$, $P < 0.05$, **Fig. 4B, right**) on fibronectin coating. The number of ATII cells at day 3 after transfection with negative control and KCa3.1 siRNAs was similar in non-coated conditions, whereas a small, non-significant decrease in cell proliferation was noted on fibronectin coating in the presence of KCa3.1 siRNA (**Fig. 4C**). We also observed that the number of migrating cells through a Boyden

type chamber was significantly reduced after KCa3.1 silencing (siKCa3.1) in the presence of fibronectin, but not in the absence of matrix (**Fig. 4D**).

Wound healing stimulation by KCa3.1 activation

Because our data with TRAM-34 and siRNA indicated that alveolar wound repair on fibronectin matrix is, at least in part, dependent on KCa3.1 function, we next explored a potential beneficial impact of KCa3.1 activation on ATII wound-healing. As presented in **Fig. 5**, the repair rates of ATII cell monolayers grown in the absence of coating ($30 \pm 2 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$) were stimulated by increasing concentrations of 1-EBIO. This KCa activator also enhanced the fibronectin-stimulated wound repair, reaching a rate of $42 \pm 3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ in the presence of coating and 200 μM 1-EBIO.

Relationship between KCa3.1 channels and β 1-integrin

Based on our data indicating a cooperative role played by KCa3.1 and fibronectin matrix in alveolar wound repair, we then decided to further investigate a possible relationship between the KCa3.1 channel and the β 1-integrin, a receptor and signal transducer of fibronectin [12].

We first explored a possible spatial co-distribution of KCa3.1 channel and β 1-integrin. As shown in **Fig. 6A**, both KCa3.1 and β 1-integrin proteins were detected by immunofluorescence assays in ATII cells. More importantly, these two proteins were predominantly co-distributed at the plasma membrane (**Fig. 6A, top merge panel**). It should be noted that there was no, or very diffuse, signal with secondary antibodies in control experiments in the absence of respective primary antibodies (**Fig. 6A, negative controls**).

We then assessed a possible assembly of these two proteins using co-immunoprecipitation assays. Expression of β 1-integrin and KCa3.1 proteins was first confirmed by western blotting on ATII cell extracts (**Fig. 6B**, lane 1, « total lysate »), where doublets of 120-105 (mature and immature β 1-integrin proteins, IB: β 1-integrin) and 51 kDa (IB: KCa3.1) bands were detected using anti- β 1-integrin and anti-KCa3.1 antibodies, respectively. Interestingly, KCa3.1 proteins was also detected after immunoprecipitation (IP) using anti- β 1-integrin antibody (**Fig. 6B**, lane 2, « β 1-integrin IP », IB: KCa3.1). We also detected β 1-integrin proteins, after KCa3.1 immunoprecipitation (**Fig. 6B**, lane 3, «

KCa3.1 IP », IB: β -integrin). This result thus showed for the first time that KCa3.1 could form an immunoprecipitable complex with the β -1 integrin in the ATII cells.

The expression levels of KCa3.1 and β 1-integrin proteins in enriched membrane fractions of ATII cells were then compared in the presence or absence of fibronectin coating. We noted that ATII cells grown in the presence of fibronectin matrix expressed a higher level of the KCa3.1 and β 1-integrin proteins in their membrane fractions (~50% and 80% enhancement, respectively) compared to cells cultured in the absence of coating (**Fig. 6C**). This observation reinforced the hypothesis of a relationship between β 1-integrin and KCa3.1.

Involvement of calcium transport in fibronectin-stimulated ATII wound repair

The involvement of KCa3.1, which is a calcium-activated potassium channel [46], during ATII wound repair on fibronectin, suggested that changes in intracellular calcium may occur in these conditions. We first evaluated the variation in $[Ca^{2+}]_i$ using Fura-2 assays in the presence and absence of fibronectin coating. We first noted that the steady-state $[Ca^{2+}]_i$ was higher (78.8 ± 8.8 nM) in ATII cells cultured on fibronectin compared to the control condition (absence of coating, 53.8 ± 4.3 nM, **Fig. 7A**). The plasma membrane Ca^{2+} permeability of ATII cells was also estimated by replacing the saline solution bathing the cells, which contained 2 mM Ca^{2+} , by a Ca^{2+} free saline solution supplemented with 1 mM EGTA. This extracellular Ca^{2+} removal was followed by a reduction in $[Ca^{2+}]_i$ level of 30.3 ± 3.1 nM in absence of coating. Notably, the change in $[Ca^{2+}]_i$ was higher (43.8 ± 5.1 nM) in the presence of fibronectin (**Fig. 7B**).

Because calcium membrane transport mechanisms in ATII cells are not well defined, we decided to investigate the identity of Ca^{2+} channels that could be involved in the observed modifications in Ca^{2+} levels in cell grown on fibronectin. We focused on a subgroup of the large TRP channel family, the TRPC channels [47,48], because at least one member of this subfamily has already been proposed as a functional partner of KCa3.1 [49]. Using RT-PCR, we detected the mRNA expression of all seven members of the TRPC family (TRPC1 to TRPC7, **Fig. 8A**). As shown in **Fig. 8B**, a huge enhancement in TRPC4 mRNA expression was observed in ATII cells cultured on fibronectin matrix (compared to the control, non-coated condition), whereas the increase in TRPC2, 3 and 5 mRNA was non-significant. Similar to KCa3.1 and β 1-integrin proteins, we also measured an

enhancement of the relative level of the TRPC4 protein expressed in the enriched membrane fraction in ATII cells cultured on fibronectin (compared to no coating, **Fig. 8C**).

A final series of experiments was undertaken to examine the involvement of TRPC4 channels, using the specific inhibitor ML-204 [50], in fibronectin-stimulated alveolar wound repair. As previously observed after KCa3.1 inhibition with TRAM-34 (**Fig. 1B**), blocking of TRPC4 channels with ML-204 (**Fig. 8D**, ML-204) did not significantly reduce the wound-healing rates of ATII monolayers in the absence of coating, whereas ML-204 significantly decreased the rates on fibronectin matrix (fibronectin + ML-204). Finally, an additive inhibitory effect of TRAM-34 on wound-healing rates was observed, suggesting a complementary role played by KCa3.1 and TRPC4 channels during ATII epithelial repair on fibronectin (**Fig. 8D**, fibronectine + ML-204 + TRAM-34).

DISCUSSION

Our study revealed that Ca^{2+} -activated KCa3.1 channels and interactions with integrin receptor and extracellular matrix component (fibronectin) play a significant role in alveolar wound repair processes. Specifically, we highlighted a relationship between $\beta 1$ -integrin, a fibronectin receptor and signal transducer, and KCa3.1 channels. We also found that the presence of a fibronectin coating is associated with elevated steady state $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as well as $\beta 1$ -integrin, KCa3.1 and TRPC4 channel membrane expression. Finally, our data indicate complementary roles of ECM, $\beta 1$ -integrin, KCa3.1 and TRPC4 channels during alveolar repair processes (recapitulative scheme presented in **Fig. 9**).

The observed increases in ATII wound-healing (**Fig. 1**) and cell migration (**Fig. 3**) rates on fibronectin confirm importance of this extracellular matrix component in alveolar repair, in agreement with previous studies. Indeed, Kim *et al.* demonstrated using Boyden chamber assays that alveolar epithelial cell migration was increased in the presence of either soluble or coated fibronectin [12]. A role for this extracellular matrix component has also been shown in other epithelial tissues, including in the cornea [51].

One of our previous studies [15] demonstrated that K_vLQT1 and K_{ATP} channels actively participate in the control of ATII wound healing in the absence of fibronectin coating, whereas our present data (**Figs. 1 and 4B**) indicate that KCa3.1 did not affect the wound repair rates in these conditions. Interestingly, both KCa3.1 pharmacological inhibition and molecular silencing impaired fibronectin-stimulated ATII wound-repair rates (**Figs. 1, 4B**). This discrepancy could be explained by variable basal activity of K_vLQT1, K_{ATP} and KCa3.1 channels in ATII cells. Indeed, it is possible that KCa3.1 channels require a signal, through $\beta 1$ -integrin activation in presence of fibronectin, to participate in ATII wound-healing processes, whereas K_vLQT1 and K_{ATP} channels may exhibit sufficient basal activity to regulate alveolar epithelial repair even in absence of coating. In agreement with this hypothesis our data indicated an additive effect after concomitant inhibition of K_vLQT1, K_{ATP} and KCa3.1 channels on fibronectin matrix. It could also be postulated that the TRAM-34-sensitivity on fibronectin coating could be due to the observed increased expression (**Fig. 6C**) of KCa3.1/integrin proteins, which cooperate to regulate alveolar repair, migration and proliferation in this condition. A role for KCa3.1 channels in the control of both ATII cell proliferation and migration on

fibronectin (**Fig. 4**) was also confirmed by the siRNA approach. Such an involvement of KCa3.1 in cell motility [52-55] or proliferation [56,57] had previously been established in other cell types.

The observation that KCa3.1 function in alveolar repair is dependent on the presence of fibronectin suggests a potential link between KCa3.1 and extracellular matrix receptors, such as integrins. In agreement with this hypothesis, our immunofluorescence and co-immunoprecipitation experiments (**Fig. 6**) demonstrate for the first time a cellular co-distribution and a potential physical link between KCa3.1 and β 1-integrin in ATII cells. Although such observations have never been reported before in native epithelial cells, physical or functional interactions between other types of K^+ channels (e.g. BKCa, Kv1.3, hERG, $K_{ir}4.2$) and integrins have already been reported in other cell types [30-33]. Levite *et al.*, for example, reported a physical association between Kv1.3 channels and β 1-integrin, detected by co-immunoprecipitation assays, in human T cells [32]. The same approach was undertaken in a neuroblastoma cell line to identify a link between hERG1 channel and β 1-integrin, which were also co-localized [30].

In the present study, we observed a significant increase in β 1-integrin and KCa3.1 expression in the membrane fraction of ATII cells cultured on fibronectin coating (**Fig. 6C**). Although our data did not allow us to define which cellular mechanism could explain this observed up-regulation, it has been proposed in other studies that protein phosphorylation, Ca^{2+} signalling or G proteins could be responsible for the modulation of K^+ channel properties by integrins [9,58]. In agreement with our results, it has been also shown that the level of hERG channel co-immunoprecipitated with β 1-integrin is increased after β 1-integrin activation [30].

Due to the Ca^{2+} sensitivity of KCa3.1 channels, the levels of $[Ca^{2+}]_i$ in ATII cells in the absence or presence of a fibronectin matrix were also analyzed. Our data showed that $[Ca^{2+}]_i$ is significantly higher in the presence of fibronectin (**Fig. 7**). This result is in agreement with a study by Sjaastad *et al.*, [59] showing that integrin activation in MDCK cells, using microbeads coated with RGD motif, was associated with $[Ca^{2+}]_i$ increase, most probably through a Ca^{2+} influx. Our Fura-2 assays also indicated that membrane Ca^{2+} permeability in ATII cells was enhanced in the presence of fibronectin. In an attempt to define the identity of the membrane Ca^{2+} channel(s) that may be involved in that response,

we decided to focus on the TRPC family, because TRPC3 channel has already been shown to facilitate the KCa3.1 channel activation [49]. Although we detected all members of the TRPC family (TRPC1-7, [47], **Fig. 8**) in ATII cells, only TRPC4 mRNA expression was significantly enhanced in the presence of fibronectin. Moreover, analysis of protein expression in membrane fraction revealed that TRPC4 levels, similarly to KCa3.1 and β -1 integrin, were significantly enhanced in ATII cells cultured on fibronectin coating (**Fig. 8C**). The signalling pathways responsible for TRPC4 up-regulation were not elucidated in our study; however, it has previously been demonstrated that TRPC4 membrane translocation was dependent of Src phosphorylation after EGF stimulation [60]; a phosphorylation pathway also known in the regulation of ion channels by integrin [9,58]. The relative contribution of TRPC4, as well as other types of Ca^{2+} channels, including voltage-dependent and independent Ca^{2+} channels to the complex Ca^{2+} signal during wound repair or after changes in integrin and K^+ channel activation has not been evaluated in that study but would deserve further investigation.

Finally, we observed for the first time that TRPC4 channels are involved in ATII wound healing. In fact, we measured a 3-fold stronger inhibition of ATII wound repair rates with the TRPC4 inhibitor ML204 on the fibronectin matrix than in the absence of coating. This effect is in agreement with the observed increased TRPC expression on fibronectin coating. Although a function of TRPC4 channels in alveolar repair has never been reported before, other members of the TRPC family have already been described as regulators of cell migration in non-tumoural cells (TRPC1 and TRPC3 in intestinal epithelial cells or monocytes respectively [61,62]) or in lung cancer cells (TRPC1, 3, 4 and 6 [63]). Furthermore, we observed that the combination of KCa3.1 and TRPC4 inhibitors led to an additive inhibitory effect (**Fig. 8D**), suggesting that these two channels are complementary partners in the control of ATII wound healing on fibronectin.

As described above, our data using KCa3.1 inhibition or silencing demonstrated that KCa3.1 may act as a regulator of the ATII wound-healing repair *in vitro*. Interestingly, we also showed that the ATII wound-healing rates were improved in the presence of the KCa activator 1-EBIO (**Fig. 5**). Based on this evidence, it may be postulated that KCa3.1 could play an important role in the alveolar epithelial repair after injury and may thus be

identified as a potential therapeutic target for alveolar epithelial repair after acute lung injury *in vivo*. Such a strategy remains to be further investigated, however.

CONCLUSION

Our data demonstrate for the first time the complementary roles of fibronectin matrix, β -1 integrin, KCa3.1 and TRPC4 channels in the regulation of alveolar epithelial repair processes (**Fig. 9**). Moreover, our study highlights an improvement in AII wound-healing after treatment with 1-EBIO, suggesting use of KCa3.1 activators as potential therapeutic strategy to favor the resolution of acute lung injury *in vivo*.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AG, JC, AP, NTNT, EM carried out the experiments. AG, JC, AP, NTNT, EM, EB participated to data and statistical analysis. AG, RG, EB conceived and designed the study, they also interpreted that data. AG, JC, RG and EB drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (Grant MOP-111054), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant RGPIN/312177-2011), a scholarship from the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal (E. Brochiero), a fellowship from the Canadian Institutes of Health Research training program of the Respiratory Health Network and Fonds de la Recherche du Québec en Santé (A. Girault), a fellowship of the FRQ-S (A. Girault), a studentship of the Faculté de Médecine, Université de Montréal (J. Chebli). The authors acknowledge logistical assistance from the Research Support Office at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) as well as advice from Dr Lise Coderre (for data analysis).

Reference List

1. Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A: Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* 1999, 54:150-160.
2. Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000, 342:1334-1349.
3. Shimabukuro DW, Sawa T, Gropper MA: Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med* 2003, 31:S524-S531.
4. Budinger GR, Sznajder JI: The alveolar-epithelial barrier: a target for potential therapy. *Clin Chest Med* 2006, 27:655-669.
5. Crosby LM, Waters CM: Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010, 298:L715-L731.
6. Iizuka M, Konno S: Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2011, 17:2161-2171.
7. Coraux C, Roux J, Jolly T, Birembaut P: Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc Am Thorac Soc* 2008, 5:689-694.
8. Sheppard D: Epithelial integrins. *Bioessays* 1996, 18:655-660.
9. Arcangeli A, Becchetti A: Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 2006, 16:631-639.
10. Cabodi S, Di Stefano P, Leal MP, Tinnirello A, Bisaro B, Morello V, Damiano L, Aramu S, Repetto D, Tornillo G et al.: Integrins and signal transduction. *Adv Exp Med Biol* 2010, 674:43-54.

11. Herard AL, Pierrot D, Hinrasky J, Kaplan H, Sheppard D, Puchelle E, Zahm JM: Fibronectin and its alpha 5 beta 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium. *Am J Physiol* 1996, 271:L726-L733.
12. Kim HJ, Henke CA, Savik SK, Ingbar DH: Integrin mediation of alveolar epithelial cell migration on fibronectin and type I collagen. *Am J Physiol* 1997, 273:L134-L141.
13. Morales MM, Pires-Neto RC, Inforsato N, Lancas T, da Silva LF, Saldiva PH, Mauad T, Carvalho CR, Amato MB, Dolhnikoff M: Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue. *Crit Care* 2011, 15:R4.
14. Girault A, Brochiero E: Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation and repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014, 306:C307-C319.
15. Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noel J, Brochiero E: Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 293:L870-L882.
16. Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E: EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 295:L866-L880.
17. Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L: Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. *J Membr Biol* 2003, 196:41-50.
18. Schwingshackl A, Teng B, Ghosh M, West AN, Makena P, Gorantla V, Sinclair SE, Waters CM: Regulation and function of the two-pore-domain (K2P) potassium channel Trek-1 in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, 302:L93-L102.

19. Rao JN, Platoshyn O, Li L, Guo X, Golovina VA, Yuan JX, Wang JY: Activation of K(+) channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282:C885-C898.
20. Rampino T, Gregorini M, Guidetti C, Broggin M, Marchini S, Bonomi R, Maggio M, Roscini E, Soccio G, Tiboldo R et al.: KCNA1 and TRPC6 ion channels and NHE1 exchanger operate the biological outcome of HGF/scatter factor in renal tubular cells. *Growth Factors* 2007, 25:382-391.
21. Wu WK, Li GR, Wong TM, Wang JY, Yu L, Cho CH: Involvement of voltage-gated K⁺ and Na⁺ channels in gastric epithelial cell migration. *Mol Cell Biochem* 2008, 308:219-226.
22. Schwab A, Wojnowski L, Gabriel K, Oberleithner H: Oscillating activity of a Ca(2+)-sensitive K⁺ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest* 1994, 93:1631-1636.
23. Wang JY, Wang J, Golovina VA, Li L, Platoshyn O, Yuan JX: Role of K(+) channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 278:C303-C314.
24. Buchanan PJ, McNally P, Harvey BJ, Urbach V: Lipoxin A4 mediated KATP potassium channel activation results in cystic fibrosis airway epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, 305:L193-L201.
25. Potier M, Tran TA, Chantome A, Girault A, Joulin V, Bougnoux P, Vandier C, Pierre F: Altered SK3/KCa2.3-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 397:42-47.
26. Wei JF, Wei L, Zhou X, Lu ZY, Francis K, Hu XY, Liu Y, Xiong WC, Zhang X, Banik NL et al.: Formation of Kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility. *J Cell Physiol* 2008, 217:544-557.

27. Cowley EA, Linsdell P: Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* 2002, 538:747-757.
28. Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K: Modulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ secretion by basolateral K⁺ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* 2003, 53:608-618.
29. Jin M, Defoe DM, Wondergem R: Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates Ca²⁺-activated membrane K⁺ current and migration of MDCK II cells. *J Membr Biol* 2003, 191:77-86.
30. Cherubini A, Hofmann G, Pillozzi S, Guasti L, Crociani O, Cilia E, Di Stefano P, Degani S, Balzi M, Olivotto M et al.: Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell* 2005, 16:2972-2983.
31. deHart GW, Jin T, McCloskey DE, Pegg AE, Sheppard D: The alpha9beta1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:7188-7193.
32. Levite M, Cahalon L, Peretz A, Hershkoviz R, Sobko A, Ariel A, Desai R, Attali B, Lider O: Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *J Exp Med* 2000, 191:1167-1176.
33. Yang Y, Wu X, Gui P, Wu J, Sheng JZ, Ling S, Braun AP, Davis GE, Davis MJ: Alpha5beta1 integrin engagement increases large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel current and Ca²⁺ sensitivity through c-src-mediated channel phosphorylation. *J Biol Chem* 2010, 285:131-141.
34. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E: Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286:L1027-L1037.

35. Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E: Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, 291:L1207-L1219.
36. Bardou O, Prive A, Migneault F, Roy-Camille K, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E: K(+) channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1818:1682-1690.
37. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC: An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 1986, 134:141-145.
38. Brochiero E, Dagenais A, Prive A, Berthiaume Y, Grygorczyk R: Evidence of a functional CFTR Cl(-) channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 287:L382-L392.
39. Girault A, Prive A, Trinh NT, Bardou O, Ferraro P, Joubert P, Bertrand R, Brochiero E: Identification of KvLQT1 K⁺ channels as new regulators of non-small cell lung cancer cell proliferation and migration. *Int J Oncol* 2014, 44:838-848.
40. Maille E, Trinh NT, Prive A, Bilodeau C, Bissonnette E, Grandvaux N, Brochiero E: Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011, 301:L945-L955.
41. Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingée S, Ferraro P, Desrosiers M, Coraux C, Brochiero E: Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012, 40:1390-1400.
42. Bilodeau C, Bardou O, Maille E, Berthiaume Y, Brochiero E: Deleterious impact of hyperglycemia on cystic fibrosis airway ion transport and epithelial repair. *J Cyst Fibros* 2015.

43. Klein H, Garneau L, Trinh NT, Prive A, Dionne F, Goupil E, Thuringer D, Parent L, Brochiero E, Sauve R: Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, 296:C285-C295.
44. Dagenais A, Frechette R, Clermont ME, Masse C, Prive A, Brochiero E, Berthiaume Y: Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, 291:L1220-L1231.
45. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985, 260:3440-3450.
46. Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H: International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005, 57:463-472.
47. Venkatachalam K, Montell C: TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007, 76:387-417.
48. Nilius B, Szallasi A: Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 2014, 66:676-814.
49. Senadheera S, Kim Y, Grayson TH, Toemoe S, Kochukov MY, Abramowitz J, Housley GD, Bertrand RL, Chadha PS, Bertrand PP et al.: Transient receptor potential canonical type 3 channels facilitate endothelium-derived hyperpolarization-mediated resistance artery vasodilator activity. *Cardiovasc Res* 2012, 95:439-447.
50. Miller M, Shi J, Zhu Y, Kustov M, Tian JB, Stevens A, Wu M, Xu J, Long S, Yang P et al.: Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *J Biol Chem* 2011, 286:33436-33446.
51. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R: Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 1983, 97:1653-1657.

52. Cruse G, Singh SR, Duffy SM, Doe C, Saunders R, Brightling CE, Bradding P: Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human fibrocyte migration. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 128:1303-1309.
53. Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J, Dartsch PC: Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K⁺ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflugers Arch* 1999, 438:330-337.
54. Chimote AA, Hajdu P, Kucher V, Boiko N, Kuras Z, Szilagyi O, Yun YH, Conforti L: Selective inhibition of KCa3.1 channels mediates adenosine regulation of the motility of human T cells. *J Immunol* 2013, 191:6273-6280.
55. D'Alessandro G, Catalano M, Sciaccaluga M, Chece G, Cipriani R, Rosito M, Grimaldi A, Lauro C, Cantore G, Santoro A et al.: KCa3.1 channels are involved in the infiltrative behavior of glioblastoma *in vivo*. *Cell Death Dis* 2013, 4:e773.
56. Grossinger EM, Weiss L, Zierler S, Rebhandl S, Krenn PW, Hinterseer E, Schmolzer J, Asslaber D, Hainzl S, Neureiter D et al.: Targeting proliferation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through KCa3.1 blockade. *Leukemia* 2014, 28:954-958.
57. Tao R, Lau CP, Tse HF, Li GR: Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca²⁺-activated potassium and volume-sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, 295:C1409-C1416.
58. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui P, Hill MA, Wilson E: Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem Biophys* 2002, 36:41-66.
59. Sjaastad MD, Lewis RS, Nelson WJ: Mechanisms of integrin-mediated calcium signaling in MDCK cells: regulation of adhesion by IP₃- and store-independent calcium influx. *Mol Biol Cell* 1996, 7:1025-1041.

60. Odell AF, Scott JL, Van Helden DF: Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *J Biol Chem* 2005, 280:37974-37987.
61. Rao JN, Platoshyn O, Golovina VA, Liu L, Zou T, Marasa BS, Turner DJ, Yuan JX, Wang JY: TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290:G782-G792.
62. Zhao Z, Ni Y, Chen J, Zhong J, Yu H, Xu X, He H, Yan Z, Scholze A, Liu D et al.: Increased migration of monocytes in essential hypertension is associated with increased transient receptor potential channel canonical type 3 channels. *PLoS One* 2012, 7:e32628.
63. Jiang HN, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu JM, Xu SZ: Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013, 8:e67637.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Impact of KCa3.1 inhibition on fibronectin-stimulated ATII wound repair.

ATII cell monolayers, grown in the absence (no coating) or presence of fibronectin coating, were injured mechanically and wound-healing rates were measured over a 24-h period, in the presence or absence of the KCa3.1 inhibitor TRAM-34. Representative photographs (x4 magnification) at time 0 (T₀) and 24h (T₂₄) after injury in each condition are presented in **A**. The wound edge is indicated by the dotted lines. **B**. Mean wound-closure rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) are compared in control (0) and TRAM-34 (5 and 10 μM) treated monolayers, in the absence or presence of fibronectin coating (n=6). * $p < 0.05$.

Figure 2. Involvement of KCa3.1 channels in ATII cell proliferation.

Subconfluent ATII cells grown for 3 days in the absence (**A**) or presence of fibronectin coating (**B**) were exposed to increasing TRAM-34 concentrations (5, 10 or 20 μM) for 24 h. Cell proliferation was estimated at day 3 (T₀, before treatment) and day 4 (T_{24h}) in each condition. (n=8). * $p < 0.05$.

Figure 3. Impact of KCa3.1 inhibition on ATII cell motility.

ATII cell migration was evaluated using Boyden-type assays (**A**) and single cell tracking in live time-lapse videomicroscopy (**B**). The number of migrating ATII cells were measured over an 18-h period in the absence (0) or presence of 5, 10 or 20 μM TRAM-34 and compared in the absence (**A**, no fibronectin coating, left panel) or presence of fibronectin (**A**, right panel) (5 fields/insert, 3 inserts/condition, n=4-6). 2D cell migration rates (**B**) were evaluated by ATII single-cell tracking (~15 cells/field, 2 fields/condition/experiment, n=6) over a 24-h period in the absence (0) or presence of TRAM-34 (5, 10 and 20 μM). Representative trajectories of ATII cells in the absence or presence of a fibronectin matrix, in control condition and in the presence of 20 μM TRAM-34 are presented in the top panel (**B**). Colors indicate 0-h (blue) to 24-h (red) time points. * $p < 0.05$.

Figure 4. Delayed ATII wound repair and reduced cell proliferation and migration after KCa3.1 silencing in the presence of fibronectin coating.

ATII cells were transfected with negative control siRNA (siRNA control) or siRNAs directed against KCa3.1 (siKCa3.1) and then seeded in the absence or presence of

fibronectin coating. KCa3.1 silencing was verified by PCR (**A**, n=7). A representative agarose gel is presented on the left. (**B**) Wound-healing rates (in $\mu\text{m}^2/\text{h}$) were measured at 24h after injury among cells transfected with control or KCa3.1 siRNAs in the absence of coating (left) and in the presence of fibronectin matrix (right) (n=7). The number of ATII cells was counted at day 3 of culture after transfection with control or KCa3.1 siRNAs (n=14, **C**). The number of migrating ATII cells, transfected 3 days before with control or KCa3.1 siRNAs, was measured in a Boyden type chamber over an 18-h period in the absence (no coating) or presence of fibronectin (n=6, **D**). * $p < 0.05$.

Figure 5. ATII wound repair stimulation with 1-EBIO.

ATII cell monolayers grown for 3 days in the absence or presence of fibronectin coating were treated with increasing 1-EBIO concentrations (50, 100 and 200 μM) before wounding and wound-repair rates (in $\mu\text{m}^2/\text{h}$) were measured over a 24-h period (n = 7). Representative photographs (x4 magnification) at time 0 (T_0) and 24h (T_{24}) after injury in the presence or absence of 100 μM 1-EBIO are presented in the upper panel. * $p < 0.05$. Two-way Anova statistical analysis revealed that both the coating ($p = 0.01$) and 1-EBIO ($p = 0.007$) elicited a significant effect on the wound repair rates. Moreover, the values of the fibronectin group (1-EBIO (0, 50, 100, 200 μM) + fibronectin) were statistically higher than the values of the uncoated group (1-EBIO (0, 50, 100, 200 μM), no coating).

Figure 6. Cellular co-distribution, co-immunoprecipitation and membrane expression of $\beta 1$ -integrin and KCa3.1 channels

A. Representative immunofluorescence images of KCa3.1 and $\beta 1$ -integrin staining performed on ATII cells using anti-KCa3.1, anti- $\beta 1$ -integrin, anti-rabbit 633 (for KCa3.1 detection) and anti-mouse 488 (for $\beta 1$ -integrin detection) antibodies. Color superposition shows similar cellular distribution of KCa3.1 and $\beta 1$ -integrin in ATII cells (merge panel, Scale bars, 10 μm). No or diffuse signal was detected with the Alexa fluor 488 and Alexa fluor 633 coupled secondary antibodies in control experiments (negative controls). **B.** Representative immunoblots showing $\beta 1$ -integrin and KCa3.1 co-immunoprecipitations. $\beta 1$ -integrin (upper panels, IB: $\beta 1$ -integrin) and KCa3.1 (lower panels, IB: KCa3.1) proteins

were revealed with specific antibodies after β 1-integrin and KCa3.1 immunoprecipitation with anti- β 1-integrin (lane 2 « β 1-integrin IP ») or anti-KCa3.1 (lane 3 « KCa3.1 IP ») antibodies in ATII cell extracts. Endogenous expression of β 1-integrin and KCa3.1 proteins in ATII cell lysate is also shown in lane 1, « Total Lysate ». Lanes 4 and 5 are negative control assays showing an absence of band in IB (IB β 1-integrin and IB KCa3.1) after IP in the absence of lysate (lane 4, « Negative IP Control (no lysate) ») and in the absence of β -integrin and KCa3.1 antibodies (lane 5, « Negative IP control (no antibody) »). **C.** The level of β 1-integrin and KCa3.1 channel expression in membrane fractions were determined by immunoblotting using anti- β 1-integrin and anti-KCa3.1 antibodies. A representative immunoblot is shown in the left panel. The band intensities were compared in control condition (no coating, -) and in the presence of a fibronectin (+) matrix (**right panel**, n=11). * $p < 0.05$.

Figure 7. Impact of fibronectin coating on calcium signal in ATII cells

A. $[Ca^{2+}]_i$ was measured using Fura-2 in ATII cells bathed with a physiological saline solution containing 2mM Ca^{2+} and compared in the absence (-) or presence (+) of fibronectin coating. **B.** Ca^{2+} permeability through ATII cell membranes was evaluated after external calcium removal. Illustrative traces showing the decrease of $[Ca^{2+}]_i$ as a function of time in absence (no coating) or in presence of fibronectin matrix (fibronectin) after PSS 0 Ca^{2+} application are presented on top panels **B**. The mean amplitudes of $[Ca^{2+}]_i$ decrease were compared in the absence or in presence of fibronectin matrix (bottom panel, **B**). (n=10) * $p < 0.05$.

Figure 8. Expression of TRPC channels in ATII cells and complementary roles of TRPC4 and KCa3.1 in wound repair on fibronectin matrix.

Representative agarose gel showing PCR products amplified from ATII cDNA with PCR primer pairs designed from rat TRPC channels (**A**). TRPC channel relative mRNA expressions were normalized to β -actin and compared between no coating and fibronectin matrix conditions (**B**, n = 16-20). **C.** Levels of TRPC4 protein expression in membrane fractions were measured by immunoblotting using specific anti-TRPC4 channel antibody and band intensities were compared between control (no coating) and fibronectin matrix conditions (**C**, right panel, n = 11). A representative immunoblot is shown in the left panel.

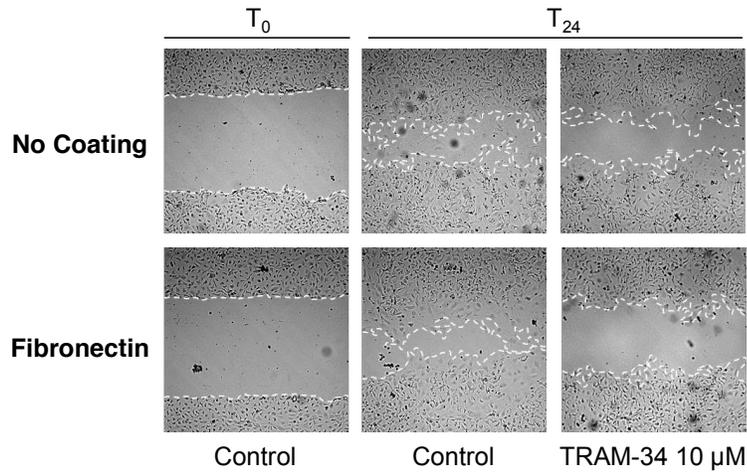
D. ATII cells, cultured in the absence (-) or presence (+) of a fibronectin coating, were injured mechanically and the wound-healing rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) over a 24-h period were then compared in control condition (-), in presence of the TRPC4 inhibitor ML-204 (100 μM , +) (n = 8) or a combination of ML-204 (100 μM) and TRAM-34 (20 μM) (**D**, n = 7). * $p < 0.05$.

Figure 9. Complementary roles of ECM, β 1-integrin, KCa3.1 and TRPC4 channels during alveolar repair process

The presence of fibronectin matrix evokes an increase in membrane expression of β 1-integrin, KCa3.1 and TRPC4, an elevation of steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and a stimulation of ATII wound healing. This stimulation is dependent, at least in part on KCa3.1 and TRPC4 channel activity. Our data also highlighted a relationship between KCa3.1 and β 1-integrin.

Figure 1

A



B

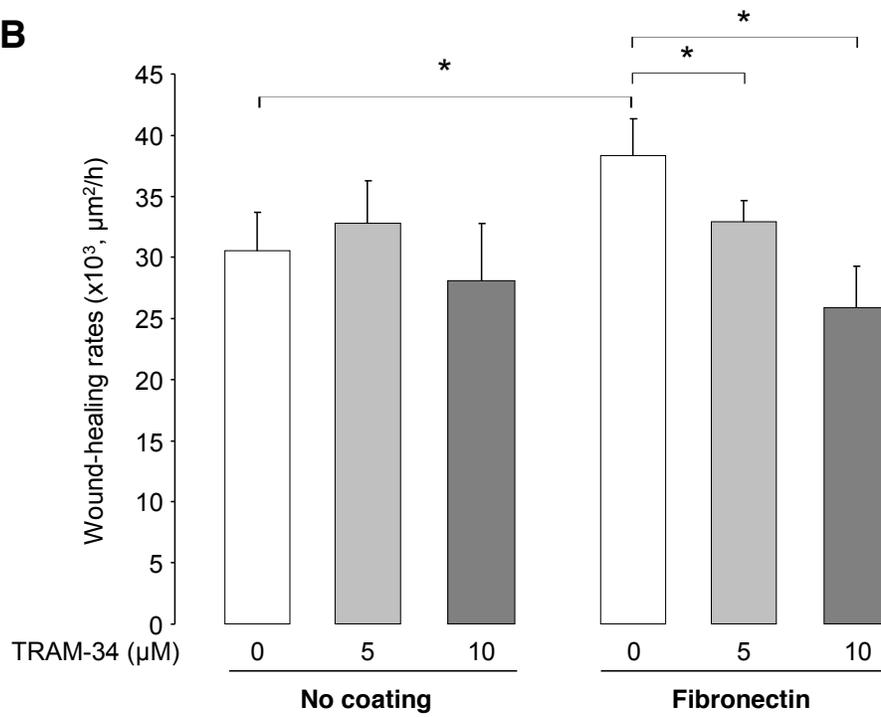


Figure 2

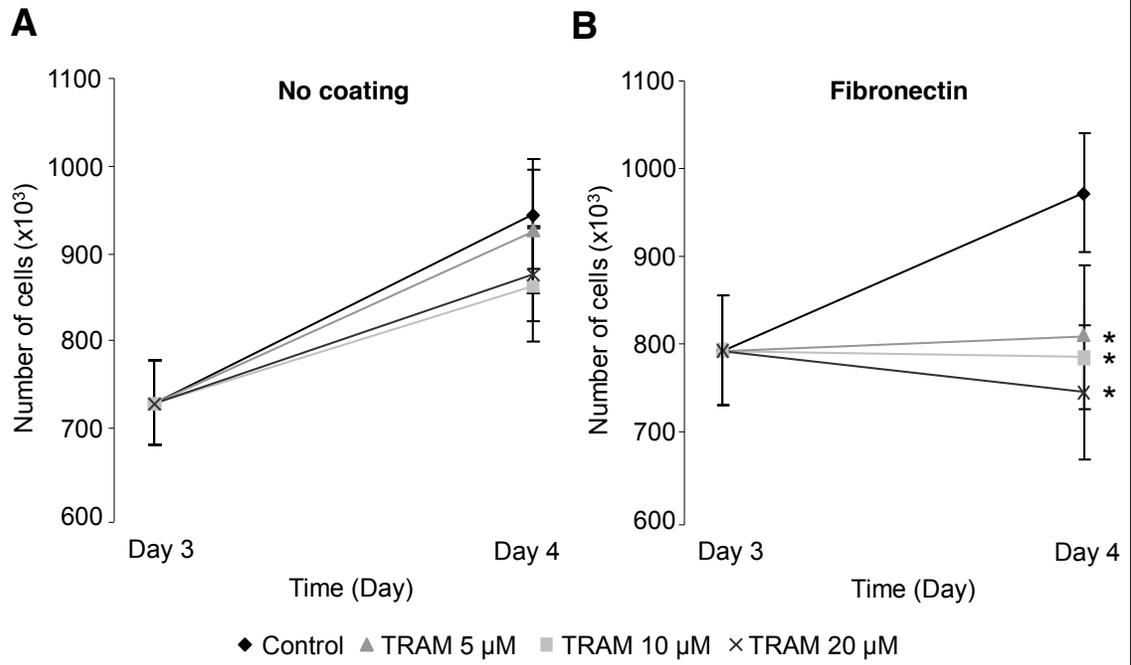


Figure 3

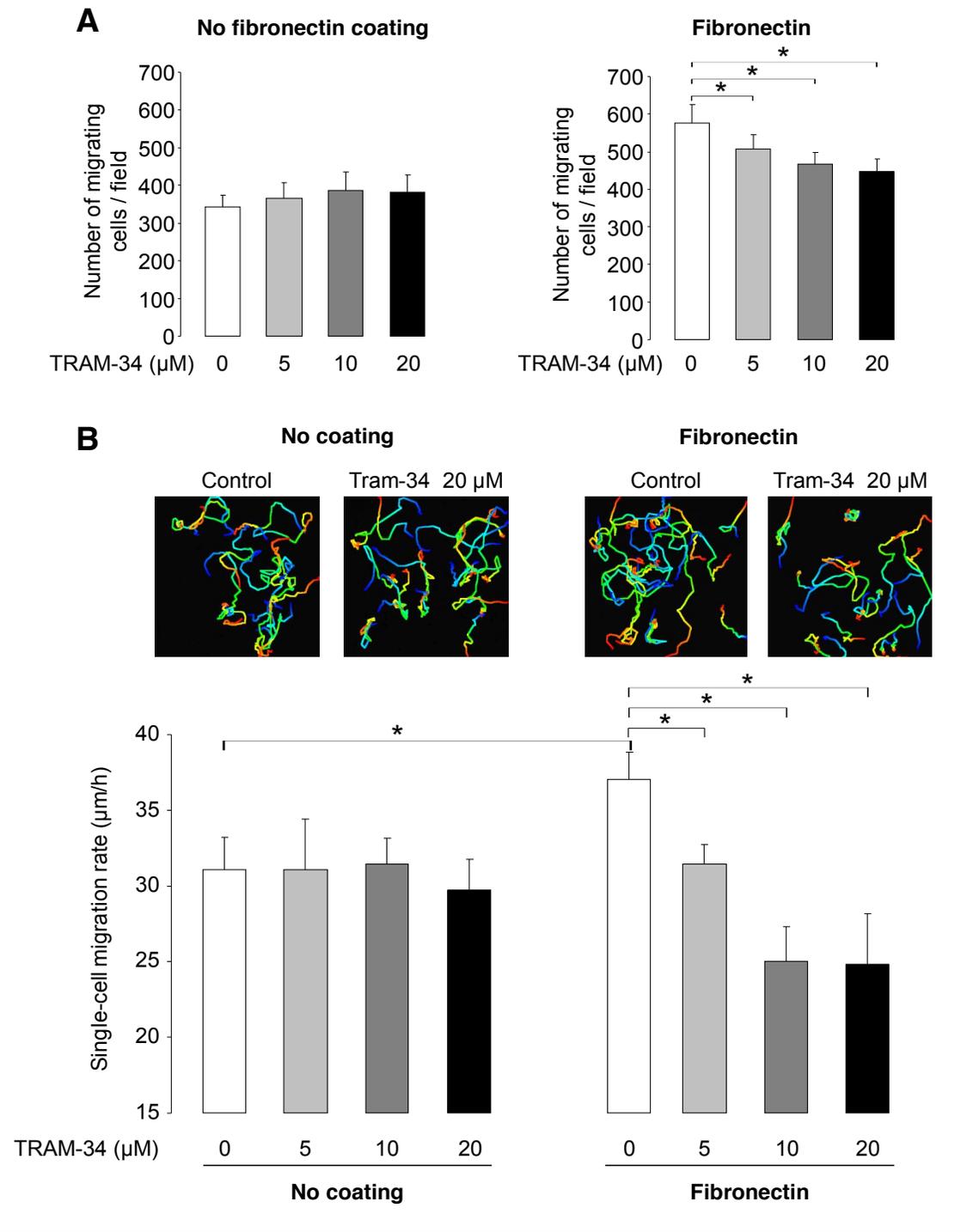


Figure 4

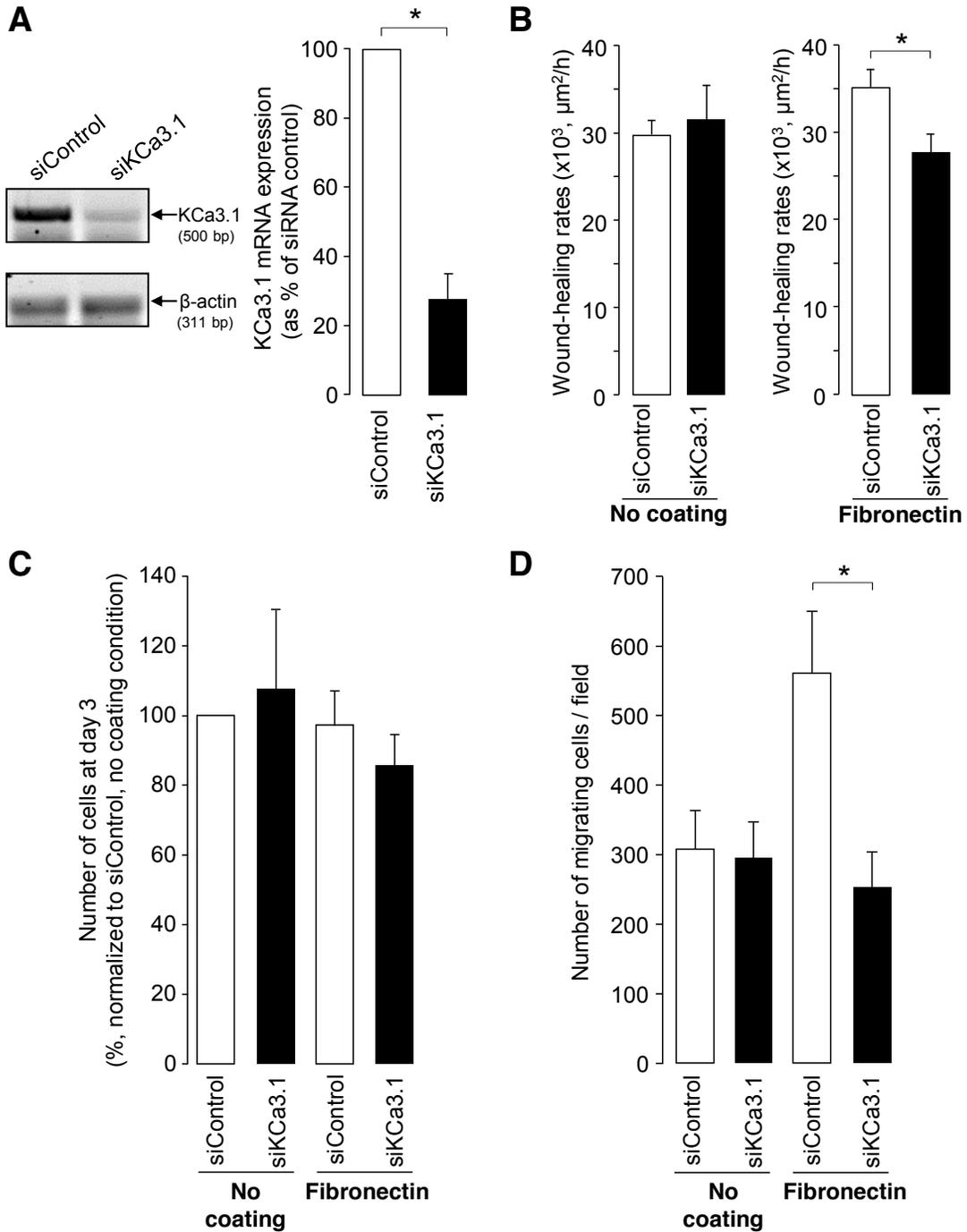


Figure 5

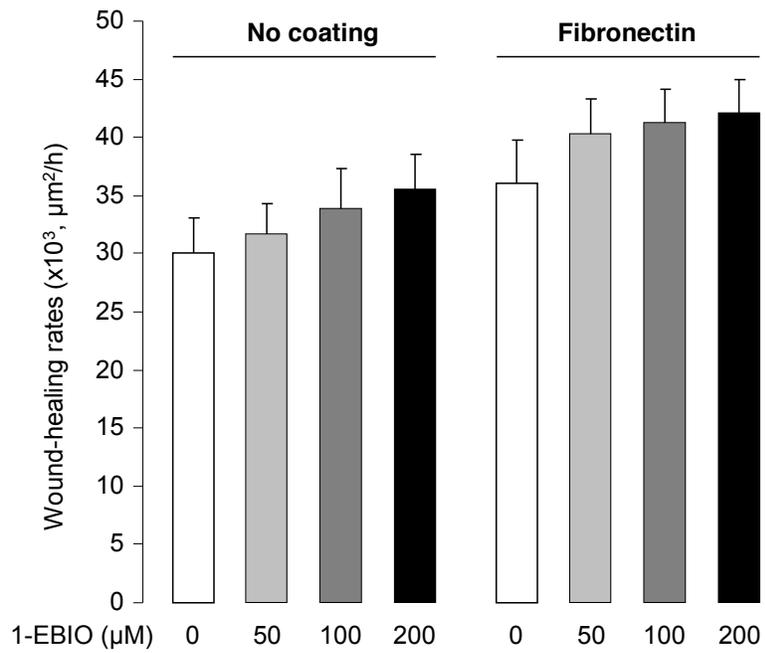
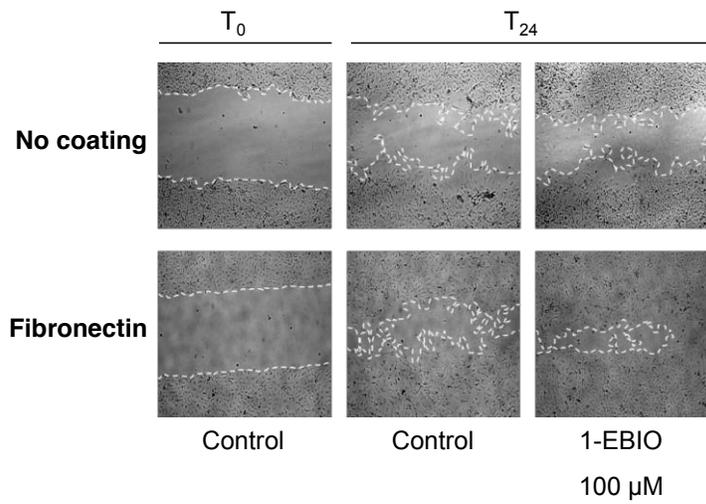
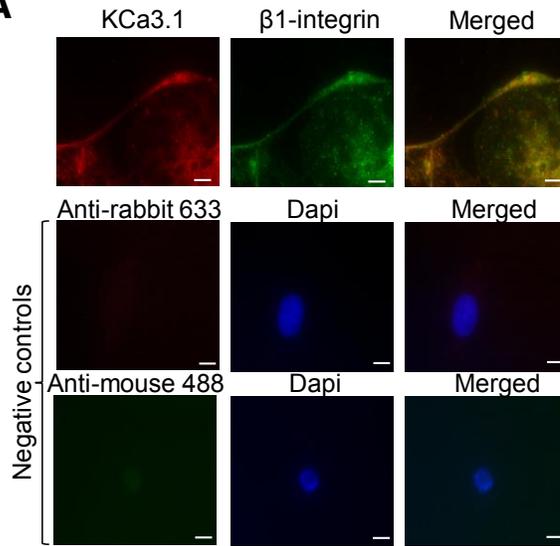
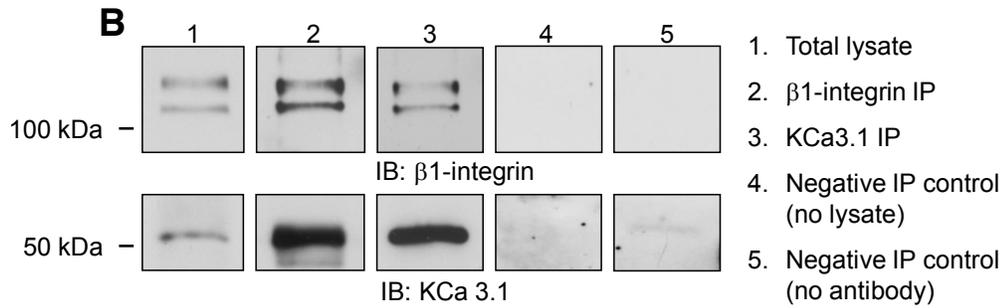


Figure 6

A



B



C

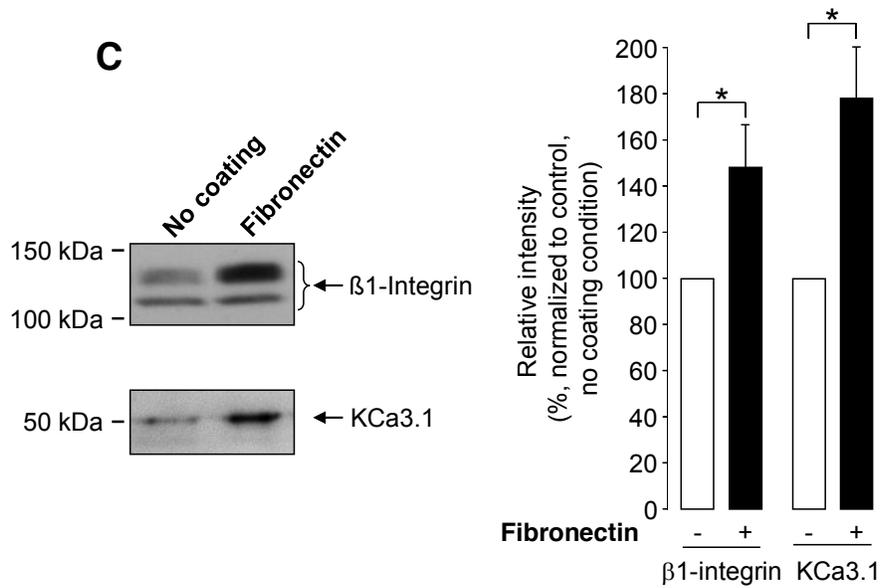


Figure 7

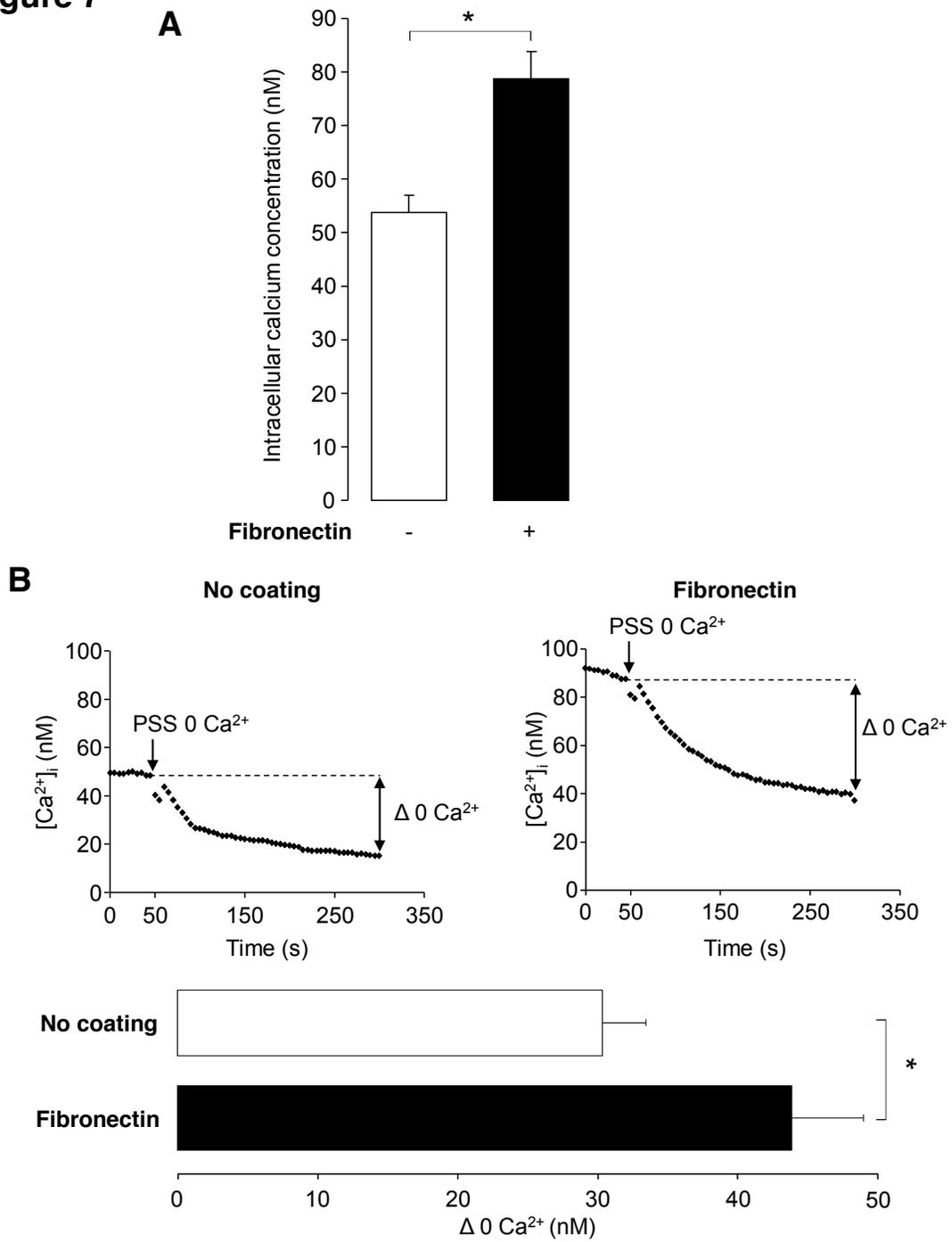


Figure 8

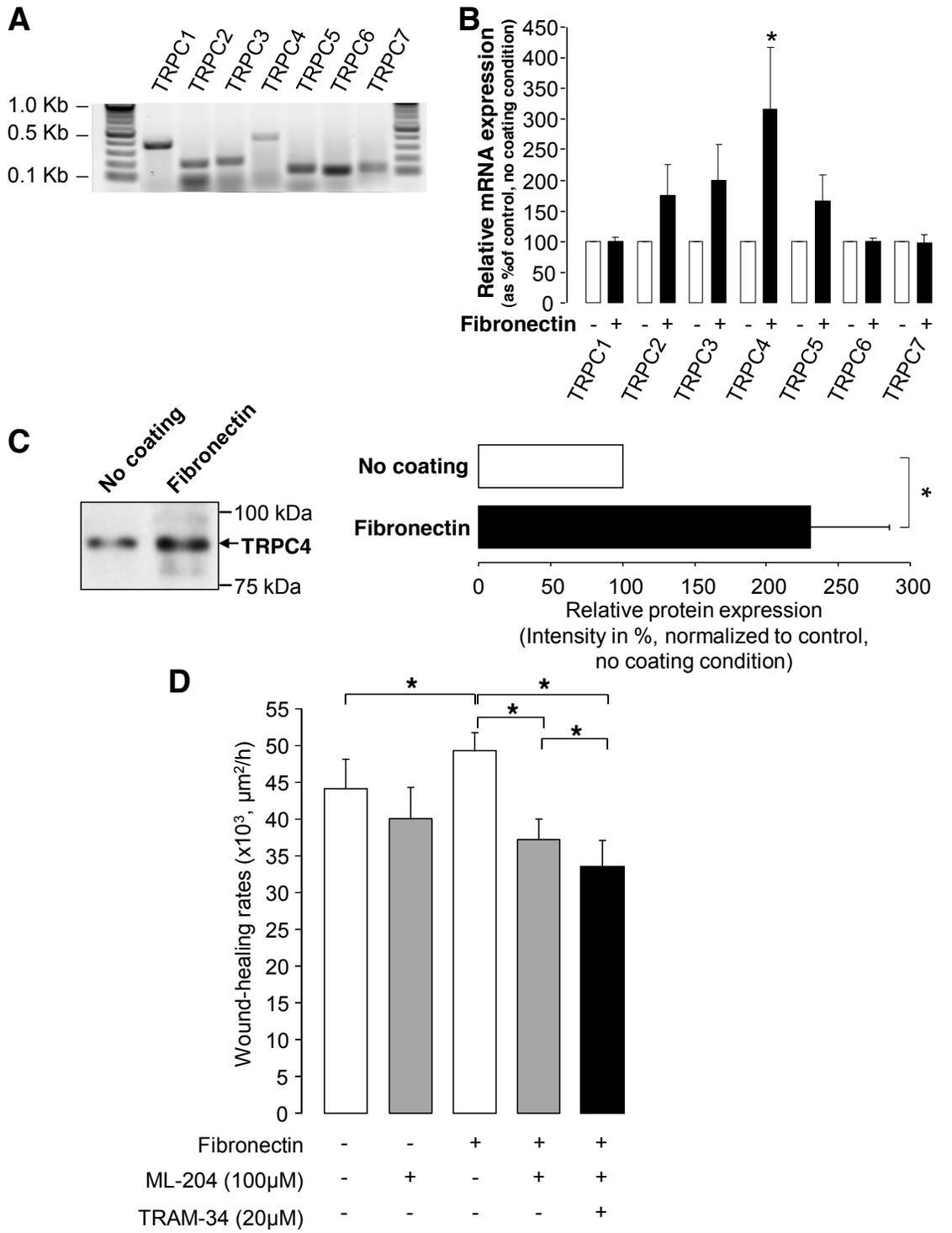


Figure 9

