

Université de Montréal

**Mécanismes modulant la stabilité de l'ARNm α ENaC des
cellules épithéliales alvéolaires dans un environnement
inflammatoire**

par
Frédéric Gagnon

Département de Médecine
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Magister Scientiae* (MSc)
en Sciences biomédicales
option Médecine expérimentale

Avril 2018

© Frédéric Gagnon, 2018

Résumé

Le canal épithélial sodique (ENaC) exprimé dans les cellules épithéliales alvéolaires joue un rôle important dans la clairance liquidienne à la naissance et lors d'un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA). Des travaux préliminaires dans le laboratoire ont montré que le TNF- α régule à la baisse l'expression de l'ARNm α ENaC en partie via une modulation post-transcriptionnelle de sa stabilité. Dans les travaux présentés dans ce mémoire, cinq séquences du 3'UTR α ENaC qui sont hautement conservées (CS) dans différentes espèces ont été étudiées pour déterminer l'impact de chacune d'elle dans la modulation de l'ARNm α ENaC en conditions basales ainsi qu'en présence de TNF- α . Pour étudier l'implication de celles-ci dans la modulation de l'ARNm α ENaC, un modèle Tet-Off a été utilisé pour inhiber l'expression du transcrit à l'aide de la doxycycline. Les niveaux de transcrit dans le temps ont été estimés par RT-qPCR. Avec cette technique, la demi-vie de l'ARNm α ENaC est de \sim 100 min. Des mutants de délétion ponctuelle du 3'UTR ont été générés en retirant spécifiquement les domaines CS1 (31pb), CS3 (22pb), CS2&3 (82pb), CS4&5 (74pb), CS1-5 (187pb) et CS3+ (165pb). Nos résultats montrent que la délétion de chacune des CS affecte leur demi-vie respective à 169 min, 172 min, 246 min, 193 min, 208 min et 237 min. La stabilité des différents mutants a ensuite été évaluée en présence de TNF- α (une cytokine retrouvée dans les poumons de patients atteints de SDRA). La courbe de dégradation de l'ARNm avec son 3'UTR complet observée est différente en présence de TNF- α de celle observée en condition basale. La courbe prend allure biphasique avec une dégradation rapide suivit d'un plateau à environ 50% de l'expression du contrôle ($t=0$). La même observation a été faite pour le mutant de délétion CS1-5. Nous concluons donc que de façon générale le 3'UTR de l'ARNm α ENaC, via les domaines conservés identifiés, est impliqué dans la déstabilisation du transcrit. Les CS ne sont pas impliquées dans le mécanisme post-transcriptionnel par lequel le TNF- α fait chuter l'expression de l'ARNm α ENaC. Il n'en demeure pas moins que d'autres séquences du 3'UTR pourraient jouer un rôle important dans la dégradation rapide de l'ARNm α ENaC durant l'inflammation ou lors d'une lésion pulmonaire.

Mots-clés : canal épithélial sodique (ENaC), ARN messenger, stabilité, région 3' non traduite (3'UTR), demi-vie, cellules épithéliales alvéolaires, inflammation, TNF- α , oedème, SDRA

Abstract

The epithelial sodium channel (ENaC) expressed in alveolar epithelial cells plays an important role in lung liquid clearance at birth and in acute respiratory distress syndrome (ARDS). Preliminary work in the laboratory has shown that TNF- α downregulates expression of α ENaC mRNA in part via post-transcriptional modulation of its stability. In the present study, five 3'UTR α ENaC sequences that are highly conserved (CS) across different species were studied to determine the impact of each of them on the modulation of α ENaC mRNA under basal conditions, as well as in the presence of TNF- α . To study the involvement of these CS on the modulation of α ENaC mRNA, a Tet-Off model was used to inhibit transcript expression using doxycycline. Transcript levels over time were estimated by RT-qPCR. With this technique, the half-life of α ENaC mRNA is \sim 100 min. Punctual deletion mutants of 3'UTR were generated by specifically removing the CS1 (31pb), CS3 (22bp), CS2&3 (82bp), CS4&5 (74bp), CS1-5 (187bp) and CS3+ (165bp) domains. Our results show that the deletion of each CS affects their respective half-lives at 169 min, 172 min, 246 min, 193 min, 208 min and 237 min. The stability of the different mutants was then evaluated in the presence of TNF- α (a cytokine found in the lungs of patients with ARDS). In the presence of the complete 3'UTR, the degradation curve of the mRNA in presence of TNF- α was different from the one observed in under basal conditions. In presence of TNF- α , the curve turns biphasic with a rapid degradation followed by a plateau at about 50% of the expression level. The same thing was observed for the deletion mutant CS1-5. We therefore conclude that in general the 3'UTR of α ENaC mRNA via the conserved domains is involved in the destabilization of the transcript. CSs studied did not contribute to the decreased expression of α ENaC mRNA in the presence of TNF- α . However, we cannot exclude the possibility that other 3'UTR sequences could play an important role in the rapid degradation of α ENaC mRNA during inflammation or lung injury.

Keywords : epithelial sodium channel (ENaC), messenger RNA, stability, 3' untranslated region (3'UTR), half-life, alveolar epithelial cells, inflammation, TNF- α , edema, ARDS

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Le système respiratoire humain.....	1
1.1.1 Voies respiratoires supérieures.....	1
1.1.2 Voies respiratoires inférieures.....	2
1.1.3 Épithélium des voies respiratoires.....	3
1.2 L'homéostasie liquidienne.....	6
1.2.1 Le canal épithélial sodique (ENaC).....	7
1.2.2 Régulation d'ENaC.....	10
1.2.3 Stabilité de l'ARNm α ENaC.....	13
1.2.4 Pathologies associées à une perturbation de l'homéostasie liquidienne.....	15
1.3 Le syndrome de détresse respiratoire.....	17
1.3.1 Histoire, définition et épidémiologie.....	17
1.3.2 Pathophysiologie.....	19
1.4 La réponse inflammatoire.....	23
1.4.1 Interleukines.....	23
1.4.2 TGF- β 1.....	24
1.4.3 miARN.....	24
1.4.4 TNF- α	26
1.5 Expression d'ENaC dans les lésions pulmonaires.....	27
Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs.....	32

2.1 Hypothèse de recherche	32
2.2 Objectifs.....	32
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	33
3.1 Modèle cellulaire	33
3.1.1 Chirurgie	33
3.1.2 Isolation des cellules épithéliales alvéolaires et culture cellulaire.....	34
3.2 Réactifs	35
3.3 Mutants de délétion(s).....	35
3.4 Transfection transitoire des cellules épithéliales alvéolaires	38
3.5 Traitement à la doxycycline.....	38
3.6 Mesure de l'expression d'ENaC	39
3.7 Méthodes statistiques	41
Chapitre 4 : Résultats	42
4.1 Description des mutants ponctuels d'ARNm α ENaC.....	42
4.2 Modulation de la stabilité des mutants ponctuels d'ARNm α ENaC	43
4.3 Modulation de la stabilité des mutants ponctuels d'ARN α ENaC en condition inflammatoire.....	46
4.4 Modulation rapide de la stabilité des mutants ponctuels d'ARN α ENaC en condition inflammatoire à 30 min.....	49
Chapitre 5 : Discussion	51
5.1 Impact des séquences conservées du 3'UTR dans la stabilité de l'ARNm α ENaC	51
5.2 Impact des séquences conservées du 3'UTR dans la stabilité de l'ARNm α ENaC en condition inflammatoire.....	55
Chapitre 6 : Conclusion	64
Bibliographie.....	i
Annexes.....	i
Annexe 1. Solutions utilisées dans le cadre de la chirurgie et de l'isolation de cellules épithéliales alvéolaires.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Troubles cliniques couramment associés au développement du SDRA	17
Tableau II.	Critère de diagnostic de la conférence de consensus américano-européenne (CCAIE), de Berlin et de Kigali pour le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)	18
Tableau III.	Oligonucléotides utilisés lors de l'étape d'amplification du « Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit » pour générer les différents mutants de délétion du 3'UTR αENaC	37
Tableau IV.	Oligonucléotides utilisés pour le RT-qPCR en temps réel.....	39
Tableau V.	Estimation de la demi-vie de l'ARNm αENaC dans différentes études	54

Liste des figures

Figure 1.	Le système respiratoire humain	1
Figure 2.	Épithélium des voies respiratoires	3
Figure 3.	Zone alvéolo-capillaire	5
Figure 4.	Principaux transports ioniques dans les cellules épithéliales alvéolaires	6
Figure 5.	Structure d'une sous-unité d'ENaC	8
Figure 6.	Structure trimérique d'ENaC.....	9
Figure 7.	L'expression génique est contrôlée à différents niveaux	10
Figure 8.	Trafic d'ENaC à la membrane	12
Figure 9.	Structure typique d'un ARNm eucaryote suite à sa maturation.....	13
Figure 10.	Modulation de la stabilité et dégradation de l'ARNm via des ARE.....	14
Figure 11.	Échelle de temps du SDRA	19
Figure 12.	Le poumon sain et la phase exsudative du SDRA	21
Figure 13.	La phase proliférative et fibrotique du SDRA	22
Figure 14.	Biogenèse d'un miARN	25
Figure 15.	Séquences conservées du 3'UTR α ENaC aux travers différentes espèces.	28
Figure 16.	Prédiction structurale de séquences conservées du 3'UTR α ENaC.....	29
Figure 17.	Structure des différentes séquences 3'UTR insérées dans le vecteur pTRE-tight	30
Figure 18.	Courbes de dégradation des différents mutants de délétion séquentiels ...	31
Figure 19.	Isolations d'ATH de rats	34
Figure 20.	Aperçu du Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit.....	37
Figure 21.	Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR).....	40
Figure 22.	Mutants de délétion ponctuels	42
Figure 23.	Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC.....	44
Figure 24.	Modulation de la stabilité des mutants ponctuels d'ARNm V5- α ENaC....	45
Figure 25.	Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec le 3'UTR complet en condition inflammatoire	47

Figure 26. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC en condition inflammatoire	48
Figure 27. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC en condition inflammatoire à 30 min – Mutant de délétion CS1-CS5	50
Figure 28. Équilibre dynamique entre les granules de stress et les « processing bodies »	58
Figure 29. Mécanisme de régulation d'ENaC par les miARNs connus.....	62

Liste des abréviations

3'UTR	séquence 3' non traduite
5'UTR	séquence 5' non traduite
Act. D	actinomycine D
ADNc	acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	protéine kinase B
ANOVA	analyse de variance (<i>analysis of variance</i>)
AQP	aquaporine
ARE	élément riche en adénine et uridine (<i>AU-rich element</i>)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASIC	canal ionique sensible à l'acide (<i>acid-sensing ion channel</i>)
ATI	cellule épithéliale alvéolaire de type I (<i>alveolar epithelial type I cell</i>)
ATII	cellule épithéliale alvéolaire de type II (<i>alveolar epithelial type II cell</i>)
BAL	lavage broncho-alvéolaire (<i>bronchoalveolar lavage</i>)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CARE	élément riche en cytosine et adénine (<i>CA-rich element</i>)
CC	protéine spécifique aux cellules clubs/clara (<i>Club/Clara Cell specific protein</i>)
CCAIE	conférence de consensus américano-européenne
CF	fibrose kystique (<i>cystic fibrosis</i>)
CFTR	régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
Cl⁻	chlore

CO₂	dioxyde de carbone
CS	séquence conservée
CUGBP	protéine liant les triplets CUG (<i>CUG triplet repeat, RNA binding protein</i>)
CURE	élément riche en cytosine et uridine (<i>CU-rich element</i>)
DHX36/RHAU	<i>DEAH-box helicase 36</i>
eIF	facteur eucaryote de démarrage de la traduction (<i>eukaryotic translation initiation factor</i>)
ENaC	canal épithélial sodique (<i>epithelial sodium channel</i>)
FISH	hybridation in situ en fluorescence (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
G4	G-quadruplexes
GRE	élément de réponse aux glucocorticoïdes (<i>glucocorticoids-response element</i>)
GURE	élément riche en guanine et uridine (<i>GU-rich element</i>)
HCO₃⁻	anion bicarbonate
hnRNP	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>)
HSC	canal hautement sélectif au sodium (<i>highly selective sodium channel</i>)
HSP	Protéine de choc thermique (<i>heat shock protein</i>)
IgG	immunoglobuline de type G
IκB	Inhibiteur du facteur nucléaire κ amplificateur de chaîne légère des cellules B activées (<i>nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells inhibitor</i>)
IL-X	interleukine
K⁺	potassium
LAP	protéine associée à la latence (<i>latency-associated protein</i>)

LPS	lipopolysaccharides
LUNG-SAFE	<i>Large Observational Study to Understand the Impact of Severe Acute Respiratory Failure</i>
MALAT1	transcrit métastatique associé à l'adénocarcinome pulmonaire (<i>metastasis associated lung adenocarcinoma transcript</i>)
MAPK	protéine kinase mitogène-activée (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
miARN	micro acide ribonucléique
mRNP	ribonucléoprotéines messagères
mTORC	complexe cible de la rapamycine de mammifère ou complexe mécanistique cible de la rapamycine (<i>mammalian/mechanistic target of rapamycin complex</i>)
Na⁺	sodium
Nedd	protéine régulé à la baisse de précurseur neural exprimé développementalement dans la cellule (<i>neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein</i>)
NF-κB	facteur nucléaire κ amplificateur de chaîne légère des cellules B activées (<i>nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells</i>)
NOS	oxyde nitrique synthase (<i>nitric oxide synthase</i>)
O₂	oxygène
PABP	protéine liant les séquences polyA (<i>poly (A)-binding protein</i>)
PAPO	pression artérielle pulmonaire d'occlusion
PB	corps processifs (<i>processing body or P-bodies</i>)
PCR	réaction d'amplification par polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	pression expiratoire positive
PIP2	phosphatidylinositol-4, 5-diphosphate
PIP3	phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKA	protéine kinase A

PTB	protéine de liaison à la polypyrimidine (<i>polypyrimidine-tract binding protein</i>)
PTEN	homologue de la phosphatase et de la tensine (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
NSC	canal cationique non sélectif (<i>non-selective cation channel</i>)
RBP	protéine liant l'ARN (<i>RNA-binding protein</i>)
RISC	complexe de silençage induit par l'ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RT-qPCR	réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (<i>Real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aiguë
SERT	transporteur de sérotonine (<i>serotonin transporter</i>)
SG	granules de stress (<i>stress granule</i>)
SGK	kinase régulée par le sérum et les glucocorticoïdes (<i>serum and glucocorticoid regulated-kinase</i>)
SOCS	suppresseur de la signalisation des cytokines (<i>suppressor of cytokine signaling</i>)
SP	protéine du surfactant (<i>surfactant protein</i>)
SVF	sérum de veau foetal
TGF	facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor</i>)
TIA1	<i>TIA1</i> cytotoxique granule associated RNA binding protein
TIAR/TIAL1	protéine liée à l'antigène intracellulaire restreinte aux lymphocytes T (<i>T-cell-restricted intracellular antigen-related protein</i>)
TIP	protéine d'induction du TNF- α (<i>TNF-α inducing protein</i>)
TNF	facteur de nécrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

*Mom, I made it.
This is for you and Luc.
I love you both.
I miss you both.*

Remerciements

Je tiens à remercier Dr Éric Lécuyer et Dr Ahmed Chraïbi d'avoir accepté de faire partie de mon jury pour l'examen de mon mémoire.

Je voudrais remercier Dr Yves Berthiaume qui m'a offert l'opportunité d'effectuer ma maîtrise au sein d'un laboratoire exceptionnel. Votre écoute, votre analyse, votre perspective des choses, mais surtout votre facilité à trouver les bons mots, à poser les bonnes questions ne cesse de m'impressionner. Merci d'être une véritable inspiration au niveau professionnel et humain.

Je ne peux suffisamment remercier André qui a été un mentor hors pair. Merci pour ton enseignement scientifique, mais surtout pour les leçons de vie, ton sens de l'humour, ta joie de vivre, tes histoires. Tu es un exemple à suivre au niveau de l'émotion et de la passion que tu as dans toutes les sphères de ta vie.

Je ne pourrais passer sous silence les nombreuses personnes avec qui j'ai travaillé. Merci pour votre humanité et merci pour votre support dans les moments difficiles. Merci à Francis qui m'a initié à la recherche. Merci à Chantal et Guillaume pour votre aide dans mon projet et pour toutes les discussions et fous rires que nous avons partagés dont le point culminant est définitivement la patate à Chicago. Antoine, mon « taouk brother », mon partenaire de voyage, merci d'avoir partagé les lundis chirurgies avec moi, mais surtout merci d'avoir partagé tes « moves » de danse avec moi ainsi que ta technique de limbo. Adèle, tu auras été une confidente, une guide, une meilleure amie avec qui j'ai vécu et partagé les hauts et les bas du début à la fin. Je ne pourrais mettre des mots sur combien je suis heureux d'avoir été assigné à l'ordinateur face à toi. Malgré le fait que tu sois « pas sortable », je t'adore.

Je veux aussi remercier tous mes amis et la famille de CrossFit Ile-Bizard de m'avoir supporté et encouragé à travers mes études.

Bien évidemment, je ne pourrais terminer sans remercier ma famille pour leur support et encouragements. Mom, Dad, Jen, Luc, vous êtes la source de ma motivation. Je vous aime.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le système respiratoire humain

Le processus de la respiration est constitué de deux fonctions essentielles : l'inhalation (inspiration) de l'oxygène atmosphérique dans les poumons et l'exhalation (expiration) dans l'atmosphère du dioxyde de carbone (1). Les organes impliqués dans la respiration composent l'appareil respiratoire qui s'étend du nez et de la bouche jusqu'aux alvéoles [Figure 1] (1). Anatomiquement, celui-ci peut être divisé en deux sections : les voies respiratoires supérieures et les voies respiratoires inférieures (1, 2).

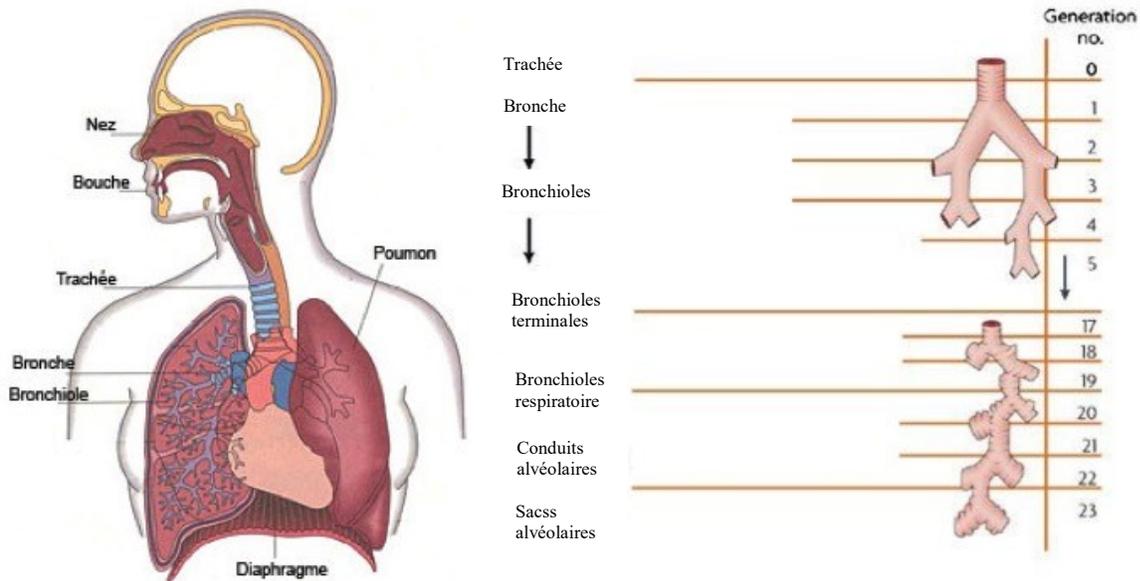


Figure 1. Le système respiratoire humain (3)

1.1.1 Voies respiratoires supérieures

Au moment de l'inhalation, l'air fait son entrée dans les voies respiratoires supérieures qui incluent tous les éléments extrathoraciques du système respiratoire; c'est-à-dire : le nez, les fosses nasales, la bouche, le pharynx et le larynx [Figure 1] (2, 4). Comme porte d'entrée de l'appareil respiratoire, les voies supérieures ont un rôle important dans le conditionnement et la filtration de l'air inspiré (5). L'air est d'abord filtré dès son entrée dans le nez par les vibrisses qui stoppent les plus grosses particules (6). La clairance mucociliaire agit à titre de deuxième

mécanisme de filtration et élimine approximativement 90% des particules inhalées (7). C'est le phénomène par lequel les cils des cellules ciliées battent transportant constamment le mucus et les particules qu'ils emprisonnent vers le pharynx où ils seront avalés, toussés ou éternués (8). Avant même d'atteindre le pharynx, l'air est réchauffé et humidifié par la muqueuse nasale de façon à assurer le fonctionnement des voies inférieures à des températures ambiantes entre – 42°C et 48°C avec des taux d'humidité relatifs de 0 à 100% (9, 10).

1.1.2 Voies respiratoires inférieures

Les voies respiratoires inférieures sont intrathoraciques et se divisent en une zone de conduction et une zone d'échange nommée parenchyme pulmonaire (11).

La première est composée de la trachée qui se divise en deux bronches primaires qui continuent leur ramification dans le poumon gauche et le poumon droit respectivement [Figure 1] (2, 12). Ce n'est qu'à partir des bronches tertiaires que l'arbre bronchique perd le support du cartilage et donne naissance à de multiples générations de bronchioles non respiratoires [Figure 1] (2, 12). Celles-ci généreront éventuellement des bronchioles terminales qui mènent au parenchyme pulmonaire [Figure 1] (2, 12). Cette zone de conduction est responsable du réchauffement, de l'humidification, du transport des gaz vers la zone d'échange et joue un grand rôle dans la défense continue des poumons contre les pathogènes et particules inhalées via la clairance mucociliaire (11).

La seconde débute là où les bronchioles terminales rejoignent les bronchioles respiratoires [Figure 1] (7, 8). Ces dernières mènent aux conduits alvéolaires qui s'ouvrent sur des sacs alvéolaires possédant plusieurs alvéoles [Figure 1] (12). Chacune des 300 à 500 millions d'alvéoles peuvent être perfusées par jusqu'à 1000 capillaires; ceci représente une surface d'échange variant de 70 à 100 m² (13-19). C'est dans cette zone alvéolo-capillaire que l'O₂ du côté alvéolaire est échangé avec les globules rouges du côté capillaire contre le CO₂ [Figure 3] (12, 20).

1.1.3 Épithélium des voies respiratoires

1.1.3.1 Zone de conduction

La zone de conduction de l'appareil respiratoire débute dans les fosses nasales et s'étend jusqu'au bronchioles terminales (21). Celle-ci est tapissée d'un épithélium pseudostratifié, essentiellement composé de cellules prismatiques (épithélium proximal) et cuboïdales (épithélium distal): les cellules ciliées et les cellules caliciformes [Figure 2] (20, 21).

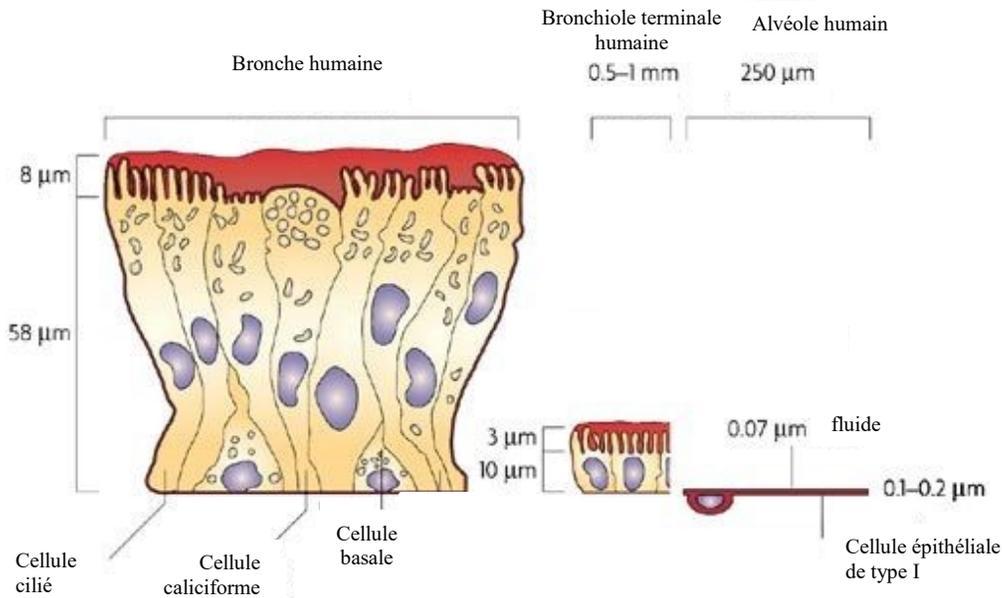


Figure 2. Épithélium des voies respiratoires (3)

Les cellules ciliées occupent 30 à 50% de l'épithélium dépendamment des régions et forment une barrière imperméable aux pathogènes, particules et aux échanges gazeux et liquides grâce à leurs jonctions serrées apicolatérales [Figure 2] (20, 22). Leur surface apicale est pourvue d'environ 250 cils et de microvillosités qui s'étendent dans les espaces intercellulaires où elles jouent un rôle important dans le mouvement transépithéliale de fluide et d'électrolytes (11, 22). Les cellules caliciformes, représentant près de 25% de l'épithélium proximal de la zone de conduction alors que leur présence est moins importante, voire absente, dans les bronchioles terminales [Figure 2] (11, 22). Leur fonction est de sécréter le mucus (mélange de glycoprotéines, de protéines et de lipides) via l'exocytose de granules sécrétoire (22, 23). Elles contiennent entre autres des mucines qui conféreront au mucus ses propriétés élastiques

permettant la clairance mucociliaire (22, 23). Les cellules basales sont de petites cellules triangulaires multipotentes capables de restaurer l'épithélium et occupent jusqu'à 95% de la surface de contact avec la membrane basale même si elles ne représentent que 7 à 10% de la population de cellules [Figure 2] (20, 22, 24). Elles sont donc impliquées dans l'attachement des cellules prismatiques à cette même membrane (11, 22). Les cellules Club (anciennement cellules de Clara) apparaissent au niveau des bronchioles, ce sont des cellules non ciliées au cytoplasme granuleux; leurs granules sécrétoires contiennent des lipides et des protéines, dont la *Club cell-specific protein* (CC10, CC16, Protein 1) qui a démontré des fonctions anti-inflammatoires et immunomodulatoires, ainsi que des apoprotéines du surfactant et un inhibiteur de protéase de leucocytes (8, 11, 20, 22, 23, 25). En plus de sa fonction sécrétoire, elle agit à titre de cellule progénitrice de l'épithélium bronchiolaire, se distingue par son abilité à métaboliser les xénobiotiques et joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie de l'eau (26-28). Les cellules neuroendocrines représentent possiblement le premier type de cellules épithéliales spécialisées à apparaître dans les poumons, par conséquent il fut suggéré qu'elles jouent un rôle dans le développement des poumons (11, 29, 30). Leurs fonctions principales sont liées aux effets des peptides (hormones/neurotransmetteurs) qu'elles libèrent (11). Des cellules de Langerhans, dendritiques, des mastocytes et des lymphocytes (cellules T en particulier) sont aussi retrouvés au travers la zone de conduction et ont pour fonction le traitement, la présentation et la réaction aux antigènes inhalés (11).

1.1.3.2 Zone d'échange

La zone d'échange débute là où les bronchioles terminales rejoignent les bronchioles respiratoires et s'étend jusqu'aux alvéoles [Figure 1] (7, 8, 12). Elle est formée d'un épithélium pavimenteux simple dont 95% de la surface est occupée par des pneumocytes de type I (ATI), des cellules aplaties reliées entre elles par des jonctions serrées, ayant un petit noyau et peu d'organelles [Figure 2] (31-33). Leurs principales fonctions sont les échanges gazeux, le transport ionique et liquidien, de plus, elles pourraient potentiellement avoir un rôle de protection contre des lésions oxydatives (31-33). Avec un ratio d'environ 2 pneumocytes de type II (ATII) pour chaque ATI, les ATII sont plus nombreux que les ATI; cependant, ils occupent moins de surface (environ 5%) (34, 35). Ils ont une structure cuboïde et une

morphologie caractérisée par la présence de microvillosités apicales et de corps lamellaires qui contiennent le surfactant (35-38).

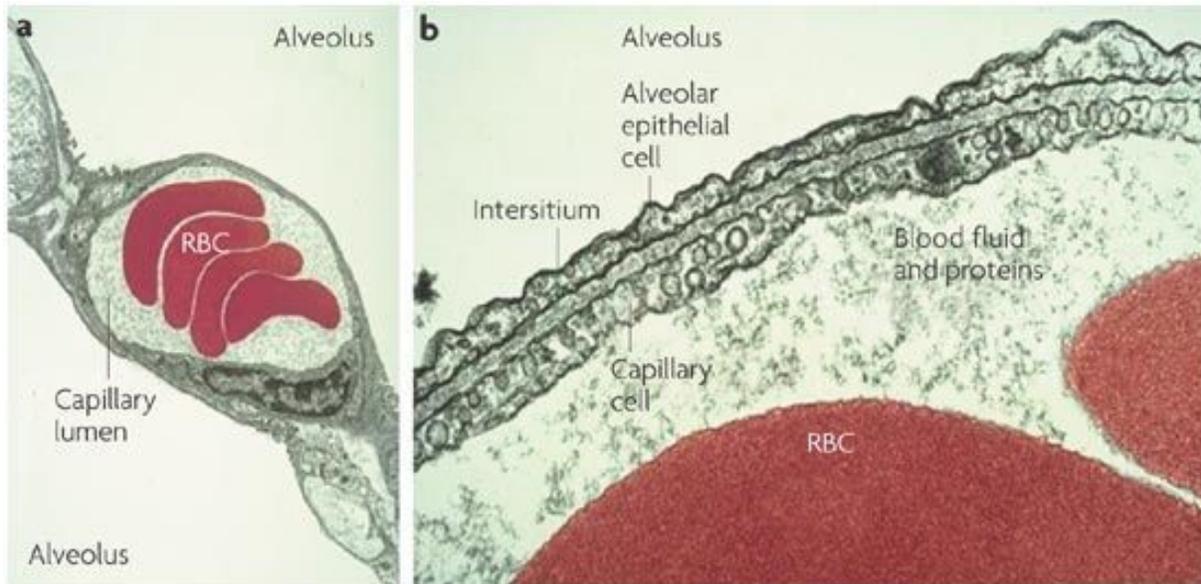


Figure 3. Zone alvéolo-capillaire (3)

Photographies de microscopie électronique en transmission d'alvéole humaine à faible (A) et fort (B) grossissement. *Alveolus* : alvéole. *Alveolar epithelial cell* : cellule épithéliale alvéolaire. *Blood fluid and proteins* : fluide sanguin et protéines. *Capillary cell* : cellule capillaire. *Capillary lumen* : lumière du capilaire. *RBC* : globule rouge.

Le surfactant (un complexe de lipides et de protéines p. ex. SP-A/B/C/D) a démontré des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes, mais permet surtout d'éviter le collapsus des alvéoles à l'expiration en réduisant la tension de surface (35-39). Les ATII ont aussi la capacité de se différencier, multiplier et différencier en cellules ATI et ATII en plus d'être des acteurs de la réponse immunitaire (p. ex. chimiokines, chimioattractants pour les macrophages) et du transport ionique et liquidien (40-42). Les ATII sont des cellules progénitrices qui permettent la régénération de l'épithélium alvéolaire en cas de lésions (40-42). Des macrophages sont aussi présents dans la zone d'échange pour phagocyter toutes les impuretés ayant trouvées le moyen de se rendre dans les alvéoles ainsi que le surfactant (11).

1.2 L'homéostasie liquidienne

Dans les voies aériennes, le transport ionique module la viscosité du mucus et est crucial dans le maintien d'un volume de liquide péricilliaire adéquat pour permettre le battement coordonné des cils pour l'expulsion de pathogènes, poussières, etc via la clairance mucociliaire (41, 43). Dans les alvéoles, son rôle est similaire; il maintient un niveau de liquide optimal, de pair avec le surfactant, pour éviter le collapsus des alvéoles (41, 43).

Le mouvement vectoriel d'ions via les différents canaux, transporteurs et pompes situés à la surface des ATI et ATII produit un gradient osmotique qui permet la réabsorption du liquide par l'épithélium pulmonaire via les voies paracellulaires ou les aquaporines [Figure 4] (41, 43-45). D'ailleurs, malgré les jonctions serrées joignant les ATI et ATII, les voies paracellulaires permettent aussi la diffusion passive d'ions Cl^- et K^+ de l'espace alvéolaire à l'espace interstitiel [Figure 4] (43, 46).

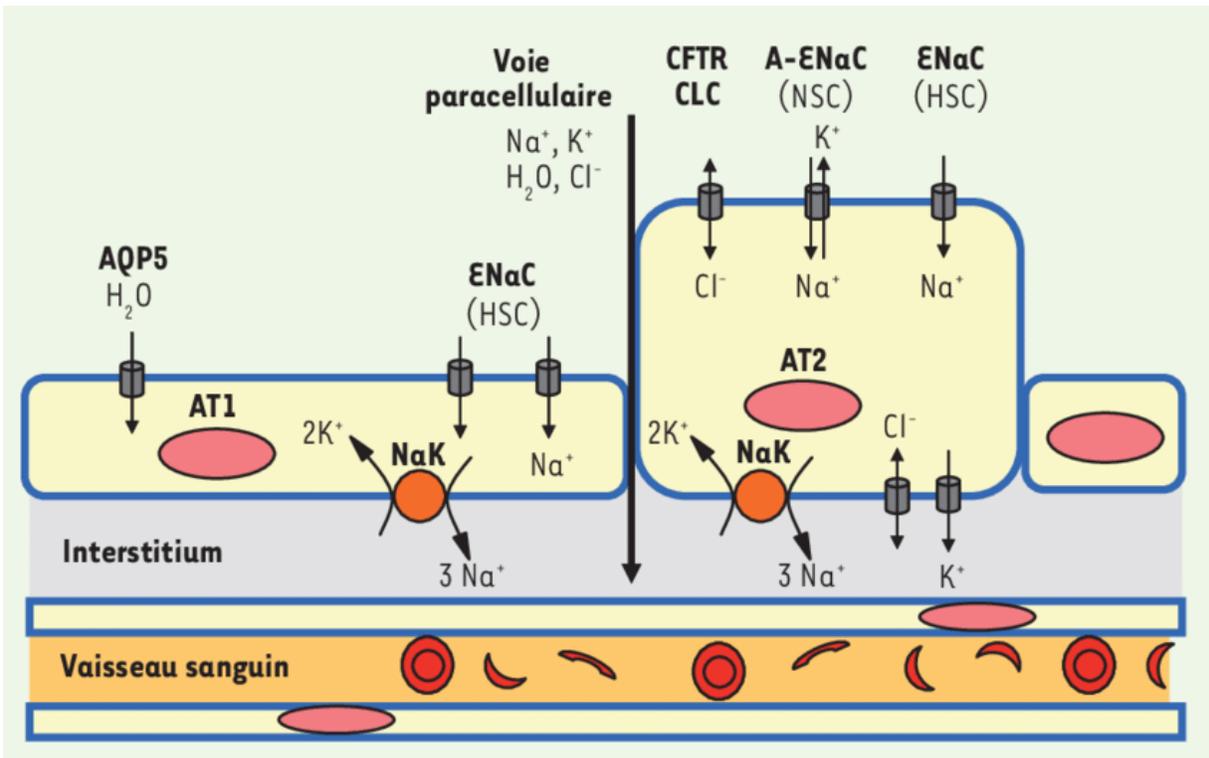


Figure 4. Principaux transports ioniques dans les cellules épithéliales alvéolaires (43)

C'est l'absorption de Na^+ par les cellules épithéliales qui régule la réabsorption de liquide au niveau du système respiratoire [Figure 4] (41, 43, 45, 47). Tout débute avec la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ située en basolatérale [Figure 4] (41, 43, 45-48). C'est une protéine membranaire hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique α , possédant un site pour l'hydrolyse de l'ATP et les cations, et d'une sous-unité β qui serait responsable d'incorporer la pompe dans la membrane plasmique [Figure 4] (47-49). Celle-ci expulse trois ions Na^+ à l'extérieur de la cellule, alors que deux ions K^+ sont transportés dans la cellule [Figure 4] (43, 45-48). Le déséquilibre entre la sécrétion de Na^+ et l'absorption de K^+ par l'activité de la pompe crée une différence de potentiel membranaire, le cytoplasme étant négatif par rapport à l'extérieur de la cellule (41, 43, 45-48). Cette différence de potentiel favorise l'entrée de Na^+ à la surface apicale par le canal épithélial sodique (ENaC) [Figure 4] (41, 43, 45-48). Le Cl^- se déplace passivement par les jonctions paracellulaire ou transcellulairement pour maintenir l'électroneutralité [Figure 4] (43, 46). L'accumulation des ions du côté basolatéral produit un gradient osmotique qui induit un déplacement du liquide alvéolaire vers l'interstisium (43, 46).

1.2.1 Le canal épithélial sodique (ENaC)

La première manifestation de ce phénomène de réabsorption liquidienne a lieu quelque peu avant la naissance alors qu'une augmentation de l'expression d'ENaC est observée résultant en l'augmentation du transport de Na^+ (41, 43, 50-53). Cette réabsorption de Na^+ permet la résorption du liquide pulmonaire fœtal dans le sang et le système lymphatique, initiant le début des échanges gazeux dans les poumons du nouveau-né (50, 54). L'importance d'ENaC dans ce processus est d'ailleurs mise de l'avant par les travaux d'Hummler où les souris « knock-out » pour αENaC meurent à la naissance, incapable de retirer l'eau contenue dans les alvéoles (55). De plus, chez les bébés nés avant la 29 semaine de gestation, le risque de développer un SDRA est de 60% (56). Ce risque augmente en fonction de la prématurité et s'explique pas l'immaturation des poumons et l'absence d'expression d'ENaC (56, 57). Ce même processus de réabsorption est aussi crucial pour la réabsorption d'œdème alvéolaire chez l'adulte.

ENaC est constitué de trois sous-unités distinctes : α , β et γ issues des gènes *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G* respectivement [Figure 6] (58, 59). Aussi, chez l'humain il existe une sous-unité δ (*SCNN1D*) similaire à αENaC moindrement exprimée dans les poumons (58-61). Les

quatre sous-unités ont une structure similaire composée de deux segments transmembranaires (M1 et M2), deux courts domaines amino- et carboxy- terminaux cytoplasmique et un grand domaine extracellulaire [Figure 5] (58, 62, 63). ENaC est un canal sensible à l'amiloride, un diurétique qui inhibe la réabsorption de Na⁺ en bloquant le pore permettant le mouvement de Na⁺ à travers la membrane cytoplasmique [Figure 5] (59).

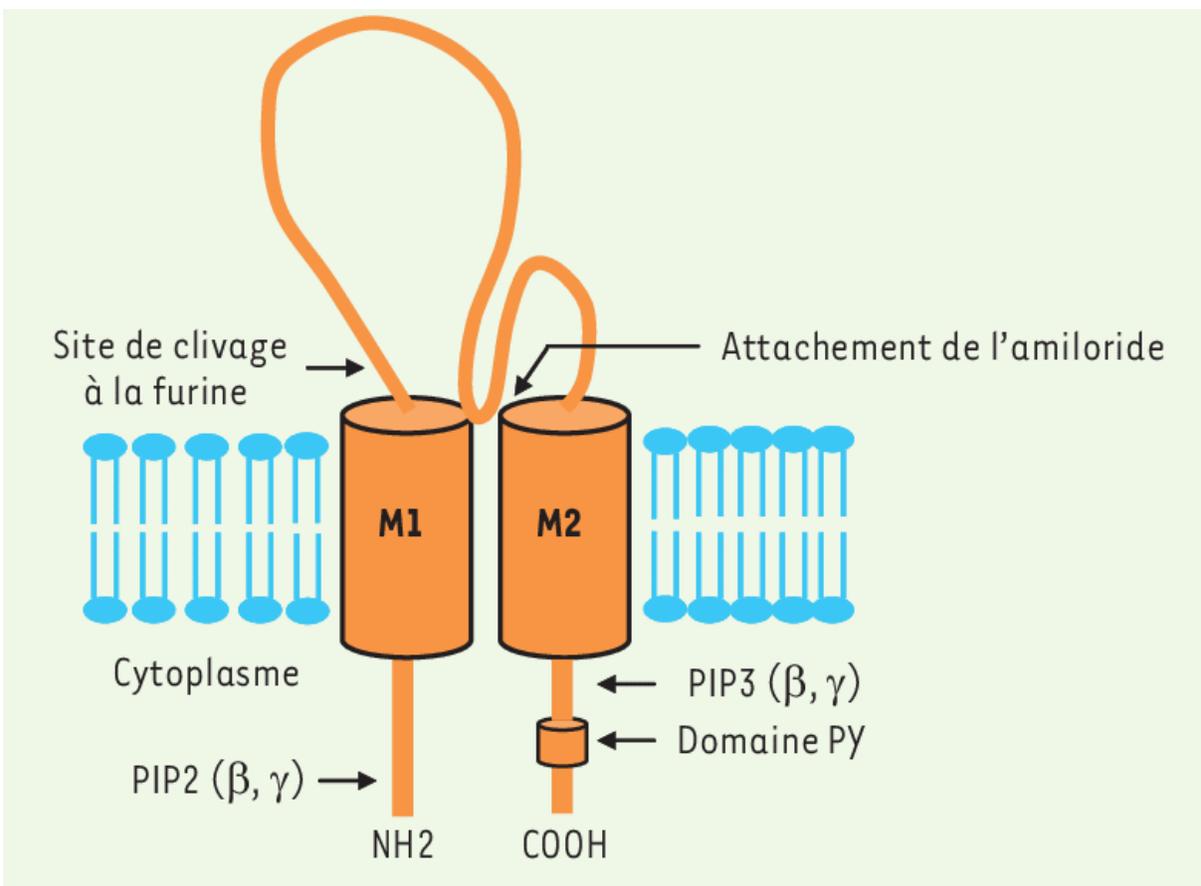


Figure 5. Structure d'une sous-unité d'ENaC (43)

1.2.1.1 Forme hautement sélective (HSC) et non sélective (NSC)

La sous-unité α joue un rôle essentiel dans le fonctionnement d'ENaC au niveau de la réabsorption liquidienne (55). D'ailleurs son importance est soulignée par l'incapacité des souriceaux knockout pour cette sous-unité à résorber le liquide pulmonaire à la naissance, entraînant rapidement leur mort (55). Pour une expression et activité maximale, les sous-unités β et γ sont nécessaires (64, 65). Dans les poumons, ENaC est retrouvé à la surface apicale des cellules épithéliales des voies aériennes (p. ex. bronches) jusqu'aux alvéoles (ATI et ATII) soit

sous sa forme hautement sélective aux ions sodium (HSC) ou sous la forme d'un canal cationique non sélectif (NSC) (55, 64-68).

La première est composée des trois sous-unités, cependant la stoechiométrie des sous-unités est plutôt controversée (63-65, 69). Certains proposent un assemblage à quatre sous-unités ($2\alpha : \beta : \gamma$) (70-73), alors que d'autres proposent une structure octomérique ou nonamérique (63, 74, 75). Pour ajouter au débat, la cristallisation du canal sensible à l'acide (ASIC), un canal faisant aussi partit de la famille des dégénérines et possédant des caractéristiques similaires à celles d'ENaC, a démontré une structure trimérique suggérant qu'ENaC pourrait aussi avoir un assemblage à trois sous-unités [Figure 6] (63, 76-78).

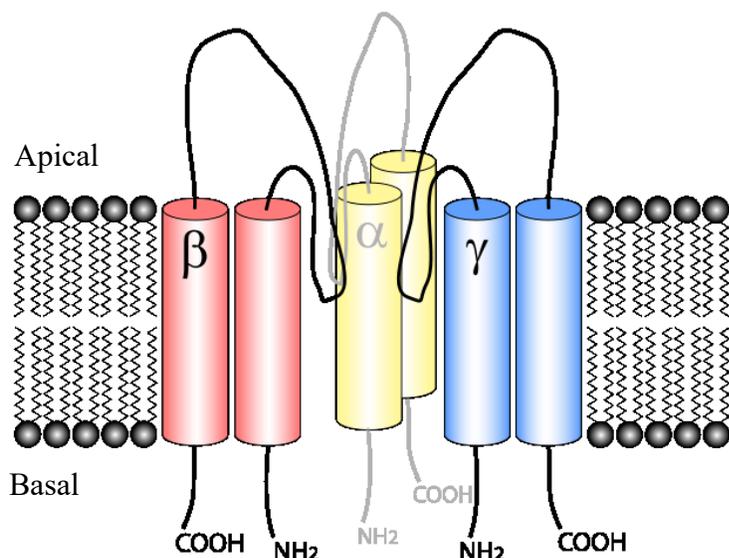


Figure 6. Structure trimérique d'ENaC (By NEUROtiker - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1285038>)

La forme NSC d'ENaC a longtemps été vue comme un canal formé uniquement de la sous-unité α ayant une sélectivité semblable pour le Na⁺ et le K⁺ (43, 79). Cependant, l'expression d' α ENaC seul dans un système hétérologue connu pour ne contenir aucune expression endogène de la sous-unité, génère peu ou pas de courant et aucun canal NSC (67, 80). Une étude récente a montré que les NSC seraient plutôt un jumelage ASIC1a et α ENaC expliquant pourquoi l'expression seule d' α ENaC ne générerait pas de canaux NSC (67, 80).

1.2.2 Régulation d'ENaC

La fonction d'ENaC peut être régulée de deux façons : en modulant l'expression du canal ou en modulant l'activité du canal (66, 81-83). Le premier type de modulation assure généralement un changement du courant ENaC sur un plus long laps de temps, alors que le second type de modulation entraîne des changements plus immédiats (66, 83).

1.2.2.1 Modulation de l'expression d'ENaC

Comme tout gène, la régulation de l'expression du canal ENaC passe par différents mécanismes : modulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle [Figure 7] (81, 82).

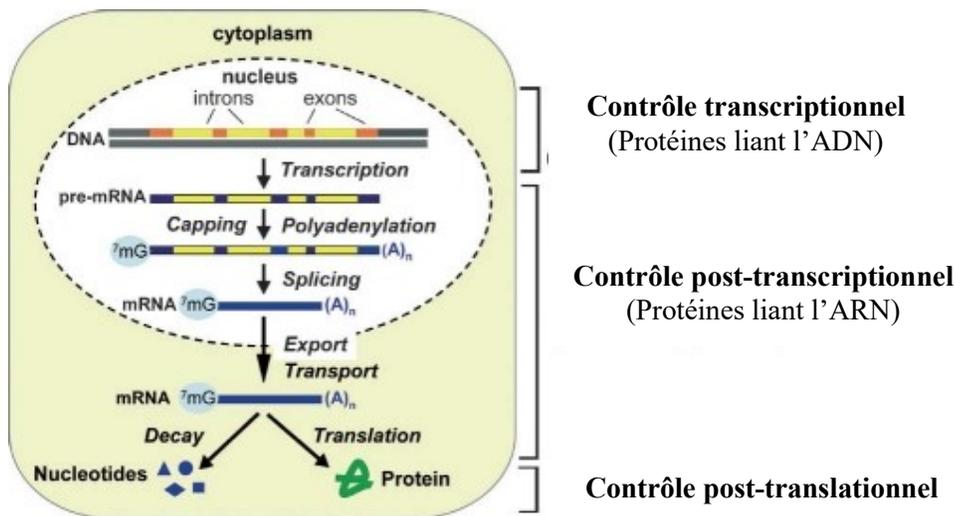


Figure 7. L'expression génique est contrôlée à différents niveaux (81)

Cytoplasm : cytoplasme. *Nucleus* : noyau. *Capping* : Ajout de la coiffe. *Splicing* : épissage. *Decay* : dégradation. *Translation* : traduction. *Protein* : protéine.

Deux hormones sont principalement responsables de la modulation transcriptionnelle d'ENaC dans les poumons, les glucocorticoïdes et les catécholamines [Figure 7] (42, 84). Par exemple, les glucocorticoïdes favorisent la maturation du poumon fœtal via l'augmentation d'ARNm α ENaC (85). Ils y parviennent en se liant à un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) situé en 5' du gène d'ENaC (85).

La modulation post-transcriptionnelle débute une fois l'ARN prémessager synthétisé [Figure 7] (81, 82). Chez les eucaryotes, la maturation de l'ARN entraînera différentes modifications au transcrit primaire, lui permettant de transporter l'information génétique du noyau vers le cytoplasme, mais aussi de le préparer à la traduction tout en le protégeant d'une dégradation prématurée (81, 82). Les mécanismes affectant le transcrit suite à sa transcription incluent : l'ajout d'une coiffe en 5' (*capping*) constituée d'une 7-méthylguanosine, l'ajout de 50 à 250 nucléotides d'adénine à la suite du signal de polyadénylation AAUAAA en 3' (*polyadenylation*) qu'on surnomme la queue poly-A et un épissage alternatif ou non (*splicing*) [Figure 7 et 9] (81, 82). L'épissage alternatif est un mécanisme de régulation d' α ENaC qui a été observé chez l'humain, la souris et le poulet (51, 86-88). Seules deux formes d'épissage alternatif ont été publiées chez le rat (89-91). Toutes deux produisent une protéine non fonctionnelle à laquelle il manque le second domaine transmembranaire dû à un codon-stop (89-91). La stabilité de l'ARNm sera discutée plus en détail un peu plus loin.

Au niveau post-traductionnelle, la fonction d'ENaC est contrôlée par le trafic de la protéine à la membrane ainsi que par sa dégradation [Figure 7 et 8] (42, 84). Les glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes (p ex. aldostérone) auraient un effet à court terme en induisant une hausse de canaux ENaC à la membrane apicale et en favorisant sa rétention à celle-ci via la kinase régulée par le sérum et les glucocorticoïdes (SGK) et la protéine kinase A (PKA) respectivement [Figure 8] (85, 92, 93). SGK, comme la PKA, maintient ENaC à la surface en phosphorylant Nedd4-2 favorisant son interaction avec les protéines 14-3-3 [Figure 8] (92, 93). Sans quoi, Nedd4-2 se lierait au motif PY [Figure 5] des sous-unités β et γ ENaC entraînant l'ubiquitination du canal qui mène à son endocytose suivi d'une dégradation via les lysosomes ou le protéasome [Figure 8] (62, 93). L'endocytose ou la dégradation peut toutefois être évitée grâce à des désubiquitineuses telles que USP8, UCH-L3 ou USP2-45 (62, 94, 95). Certaines évidences suggèrent que le phosphatidylinositol bis phosphate (PIP2) jouerait un rôle dans l'insertion et le maintien de canaux ENaC à la membrane, le résultat d'une réorganisation du cytosquelette et du contrôle du mouvement des vésicules (96).

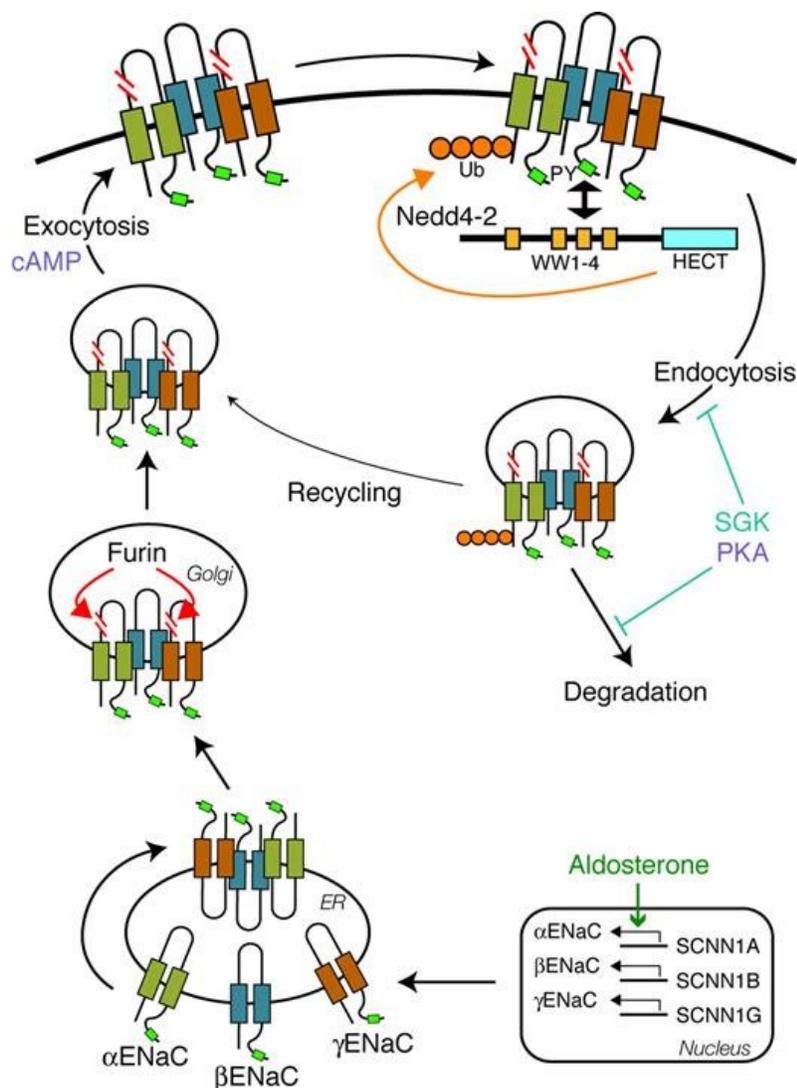


Figure 8. Trafic d'ENaC à la membrane (93)

Exocytosis : exocytose. *Endocytosis* : endocytose. *Degradation* : dégradation. *Recycling* : recyclage. *ER* : réticulum endoplasmique. *Nucleus* : noyau.

1.2.2.2 Modulation de l'activité d'ENaC

La modulation de l'activité d'ENaC peut se faire via l'activation du canal, sa probabilité d'ouverture et sa conductance. Le domaine extracellulaire possède un site de clivage par la furine qui permet l'activation du canal et donc augmente sa probabilité d'ouverture [Figure 5] (43, 93). Les sites d'attachements de PIP2 et PIP3 [Figure 8] permettent l'activation directe du canal par l'attachement de PIP2 et PIP3 aux résidus chargés positivement (lysine/arginine) sur le domaine 3' cytoplasmique sur les sous-unités β et γ (43, 96, 97). L'adénosine monophosphate

cyclique (cAMP) seraient aussi capable de moduler ENaC en augmentant sa probabilité d'ouverture [Figure 8] (98).

1.2.3 Stabilité de l'ARNm α ENaC

Comme discuté précédemment, une fois la transcription achevée, le transcrit primaire subit une maturation qui augmente sa stabilité en le protégeant de part et d'autre (coiffe en 5' et la queue poly-A en 3') d'une dégradation précoce par des ribonucléases [Figure 7 et 9] (81, 82). Suivant la coiffe et précédant la queue poly-A, on retrouve respectivement les séquences 5' et 3' non traduites (UTR) [Figure 9]. Malgré le fait que ces séquences ne soient pas codantes et ne contribuent pas directement à la synthèse de la protéine, ces segments ont un rôle important dans la traduction et la stabilité de l'ARNm (99, 100).

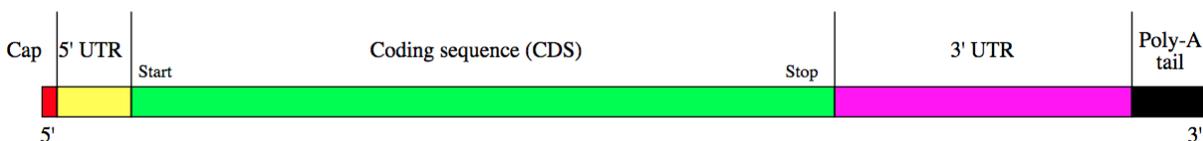


Figure 9. Structure typique d'un ARNm eucaryote suite à sa maturation
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/MRNA_structure.svg)

La longueur du 3'UTR, contrairement au 5'UTR, est corrélée à la complexité morphologique due à une sélection naturelle favorisant une modulation post-transcriptionnelle plus fine au fil de l'évolution (101). Du coup, le 3'UTR d' α ENaC fait 900 nucléotides de longueur soit presque le double de la longueur moyenne des 3'UTR de rat et représente plus du tiers du messager (101). Le rôle du 3'UTR est bien établi dans la modulation de la stabilité de l'ARNm par des interactions entre les éléments *cis* et les protéines liant l'ARN (RBP) ainsi qu'avec les miARNs [Figure 10] (101, 102).

1.2.3.1 RBP

La stabilité de l'ARNm est, entre autres, dépendante d'une variété de RBP se liant à différents éléments *cis* retrouvés dans le 3'UTR; les mieux caractérisés étant les éléments AU-riches (ARE) [Figure 10] (100, 103). Ce sont des séquences riches en adénosine et uridine variant entre 50 et 150 nucléotides de longueur et divisés en trois classes (100, 103, 104). La première classe est caractérisée par la présence d'une ou de plusieurs copies du pentamère AUUUA près d'une séquence U-riche (100, 103, 104). La seconde classe d'ARE est caractérisée par la présence de nonamères UUAUUUAU également situés à proximité d'une séquence U-riche (100, 103, 104). La troisième classe ne possède pas de pentamères ou nonamères, elle est simplement caractérisée par une région U-riche (100, 103, 104). Ces trois classes d'AREs contrôlent la déadénylation cytoplasmique de la queue polyA selon des cinétiques différentes, mais mènent toutes à la dégradation du message (100, 103, 104).

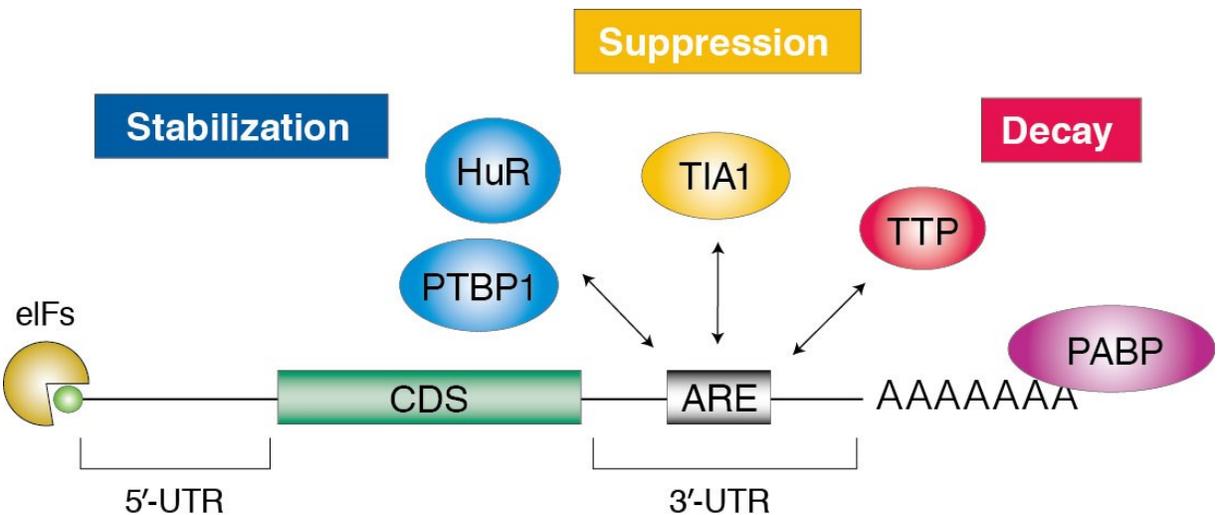


Figure 10. Modulation de la stabilité et dégradation de l'ARNm via des ARE (<http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/product/epigenetics/RNAworld.html>)

Il existe également des éléments riches en guanine et uridine (GURE) qui sont similaires aux ARE par leur séquence de base en pentamère GUUUG (99, 105). Ils sont généralement composés d'un arrangement de deux à cinq pentamères se chevauchant (99, 105). Les GURE sont également retrouvés dans le 3'UTR et de pair avec les RBP auxquelles ils s'associent, ils contribuent à la stabilité de l'ARNm via la déadénylation, la dégradation et l'épissage de pré-ARNm (99, 105, 106). Deux protéines avec des rôles opposés ont été identifiées avec la

reconnaissance de GURE; leur conservation au travers l'évolution montre que le mécanisme de modulation post-transcriptionnel associé a aussi été conservé (105). La première, la CUG triplet repeat, binding protein (CUGBP1) a un effet déstabilisateur sur l'ARNm suivi d'une augmentation de l'efficacité de traduction alors que la protéine CUGBP2 stabilise l'ARNm et son effet est suivi d'une diminution de l'efficacité de la traduction (99, 107).

Les éléments CU-riches (CURE) font aussi partie de la gamme de séquence liant des RBP menant à une modulation du messenger (99). Une des RBP la plus extensivement étudiée par rapport au CURE est la *polypyrimidine-tract binding protein* (PTB). Celle-ci peut se lier à des sites distants sur un même ARNm créant ainsi de grandes loupes d'ARN permettant le recrutement de ribosomes et modulant le recrutement de facteurs d'épissage. Elle peut aussi moduler la polyadénylation, la traduction et la stabilité de l'ARNm (99, 108).

Les éléments CA-riches (CARE), sont les dinucléotides les plus répétés dans le génome humain (99, 109, 110). Retrouvées dans les séquences codantes et non codantes, elles exercent un effet stabilisateur sur l'ARNm via la *heterogenous nuclear ribonucleoprotein L* (hnRNP L) qui modifie probablement la susceptibilité de l'ARNm à être dégradé par les endo- ou exonucléases (99, 109, 110).

1.2.4 Pathologies associées à une perturbation de l'homéostasie liquidienne

Plusieurs pathologies connues sont associées à la perturbation de l'homéostasie liquidienne (41, 111-113). Certaines sont associées à un problème au niveau du transport d'anions et donc un problème de sécrétion de fluides (41). Par exemple, la fibrose kystique (CF) est une maladie autosomique récessive causée par des mutations du gène *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (114, 115). CFTR est retrouvé à la membrane apicale des cellules épithéliales de plusieurs systèmes, dont les poumons, où sa fonction principale est le transport au travers la membrane de Cl⁻, mais aussi (de façon moins importante) d'ions bicarbonates (HCO₃⁻) (116, 117). CFTR régule aussi d'autres protéines de transport, en particulier ENaC, mais aussi des canaux K⁺, des échangeurs d'anions, des transporteurs de HCO₃⁻ et des aquaporines (116, 118, 119). Les effets cliniques d'une déficience de CFTR chez les individus atteints de CF sont expliqués par la *low volume hypothesis* (118, 120). Celle-ci propose que la perte de fonction ou l'absence de CFTR se traduise par une baisse/perte de

sécrétion de Cl^- qui mène à un déséquilibre Cl^-/Na^+ et donc une perte de la force osmotique permettant le transport d'eau vers la lumière (120, 121). Il en résulte une déshydratation du liquide périciliaire ainsi que du mucus qui devient alors plus viscoélastique et adhésif (122-124). La réduction du volume de liquide périciliaire altère l'action des cils et favorise le contact entre la couche de mucus plus adhésif et l'épithélium (122-124). Avec la perturbation de la clairance mucociliaire, l'élimination de contaminants devient moins efficace et les infections à *P.aeruginosa* se font de plus en plus fréquemment (113, 120, 122, 125). Elle colonise éventuellement les voies respiratoires de tous les patients (113, 120, 122, 125). Les manifestations pulmonaires sont les principales responsables de la morbidité et mortalité dans la CF, caractérisée principalement par une bronchectasie progressive et irréversible ainsi qu'une insuffisance respiratoire (118, 126).

D'autres pathologies causées par une perturbation de l'homéostasie liquidienne sont plutôt associées à des défauts de transport de cations, par exemple l'œdème pulmonaire cardiogénique ou le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (111, 112, 127-131). D'ailleurs chez les patients atteints du SDRA, ceux qui conserve leur capacité de clairance liquidienne, la morbidité et mortalité sont moins élevées que ceux dont la capacité de clairance est altérée (127-131). Le SDRA est revu plus en détail dans la section suivante puisqu'il fait l'objet des travaux présentés dans ce mémoire.

1.3 Le syndrome de détresse respiratoire

1.3.1 Histoire, définition et épidémiologie

Le SDRA est un processus inflammatoire des poumons issu d'une atteinte à la membrane alvéolo-capillaire induisant un œdème lésionnel (132-135). Celui-ci peut avoir une origine pulmonaire/directe ou extra pulmonaire/indirecte (132, 135) [Tableau I].

Tableau I. Troubles cliniques couramment associés au développement du SDRA (135)

Direct Lung Injury	Indirect Lung Injury
Common Causes	Common Causes
Pneumonia	Sepsis
Aspiration of gastric contents	Multiple trauma
Less common causes	Less common causes
Pulmonary contusion	Acute pancreatitis
Near-drowning	Drug overdose
Inhalation injury	Cardiopulmonary bypass
Fat emboli	Transfusion of blood products
Reperfusion pulmonary edema	

En 1967, le SDRA est décrit pour la première fois dans un article publié du *Lancet* comme étant une « détresse respiratoire aiguë chez l'adulte » (136). Ce n'est qu'en 1994, lors de la conférence de consensus américano-européenne (CCAÉ) que le terme « adulte » est remplacé par « aiguë » pour mieux refléter le fait que le syndrome se produit chez l'adulte ainsi que chez l'enfant (132, 137-142). C'est aussi au cours de la CCAÉ que le diagnostic de SDRA est simplifié et uniformisé avec une définition comprenant quatre éléments : une atteinte pulmonaire à début aigu, des infiltrats pulmonaires bilatéraux diffus à la radiographie thoracique, une absence d'évidence d'hypertension auriculaire gauche (pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) ≤ 18 mmHg), une mesure du rapport PaO₂/FiO₂ avec deux niveaux de sévérité (≤ 300 mm Hg pour une lésion pulmonaire aiguë et ≤ 200 mm Hg pour un SDRA) (132, 133, 137, 139, 141-143) [Tableau II]. En 2011, une initiative de la *European Society of Intensive Care Medicine* endossée par la *American Thoracic Society* et la *Society of Critical Care Medicine* a mené une mise à jour de la définition du SDRA, la définition de Berlin

(144) [Tableau II]. Celle-ci introduit un système de catégorisation du SDRA à trois niveaux : une forme légère, modérée et sévère qui sont basées sur le degré d'hypoxémie évalué avec un minimum de pression expiratoire positive (PEP) (127, 141-147) [Tableau II]. Cependant, certains milieux n'ont pas accès aux données sur les gaz du sang artériel, à une radiographie pulmonaire et à une ventilation mécanique (148-150). Par conséquent, peu d'information existe à propos de l'épidémiologie du SDRA dans les pays sous-développés ou en voie de développement (134, 149, 151). C'est pour cette raison, entre autres, que Riviello *et coll.* ont développé les modifications de Kigali, une version allégée de la définition de Berlin. Ils ont retiré l'exigence minimale de PEP, accepte l'observation d'opacité bilatérale par ultrason et l'hypoxie est déterminée par une $SpO_2/FiO_2 \leq 315$ (146, 148, 151) [Tableau II].

Tableau II. Critère de diagnostic de la conférence de consensus américano-européenne (CCAE), de Berlin et de Kigali pour le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (146)

	AECC definition	Berlin criteria	Kigali modification of Berlin criteria
Timing	Acute onset	Within 1 week of a known clinical insult or new or worsening respiratory symptoms	Within 1 week of a known clinical insult or new or worsening respiratory symptoms
Oxygenation	$P_{aO_2}/F_{iO_2} \leq 200$ mmHg (defined as acute lung injury if ≤ 300 mmHg)	Mild: $P_{aO_2}/F_{iO_2} > 200$ mmHg but ≤ 300 mmHg Moderate: $P_{aO_2}/F_{iO_2} > 100$ mmHg but ≤ 200 mmHg Severe: $P_{aO_2}/F_{iO_2} \leq 100$ mmHg	$SpO_2/F_{iO_2} \leq 315$
PEEP requirement	None	Minimum 5 cmH ₂ O PEEP required by invasive mechanical ventilation (noninvasive acceptable for mild ARDS)	No PEEP requirement, consistent with AECC definition
Chest imaging	Bilateral infiltrates seen on frontal chest radiograph	Bilateral opacities not fully explained by effusions, lobar/lung collapse or nodules by chest radiograph or CT	Bilateral opacities not fully explained by effusions, lobar/lung collapse or nodules by chest radiograph or ultrasound
Origin of oedema	Pulmonary artery wedge pressure <18 mmHg when measured or no evidence of left atrial hypertension	Respiratory failure not fully explained by cardiac failure or fluid overload (need objective assessment, such as echocardiography, to exclude hydrostatic oedema if no risk factor present)	Respiratory failure not fully explained by cardiac failure or fluid overload (need objective assessment, such as echocardiography, to exclude hydrostatic oedema if no risk factor present)

PEEP: positive end-expiratory pressure; P_{aO_2} : arterial oxygen tension; F_{iO_2} : inspiratory oxygen fraction; SpO_2 : arterial oxygen saturation measured by pulse oximetry; CT: computed tomography.

L'incidence du SDRA fluctue beaucoup selon l'étude, ainsi que d'une région à l'autre allant de 3.65 (Islande) à 81.0 (États-Unis) cas par 100 000 personnes par années (152-166). Dans une étude épidémiologique récente, nommée LUNG-SAFE (Large Observational Study to Understand the Impact of Severe Acute Respiratory Failure), faite dans 459 unités de soins intensifs répartis dans 50 pays sur cinq continents, on note que parmi les 29 144 admissions aux soins intensifs, un SDRA (selon les critères de Berlin) est survenu chez 10.4% d'entre eux et chez 23.4% des patients nécessitant une ventilation mécanique (146, 151, 167). Cette étude démontre aussi une incidence plus élevée en Amérique du Nord, en Europe et en Océanie qu'en Asie, Afrique et en Amérique du Sud (146, 151, 167). Elle évalue aussi le taux de mortalité entre 35 et 46% dépendamment de la catégorie de sévérité initiale (146, 151, 167).

1.3.2 Pathophysiologie

La pathophysiologie du SDRA se décrit en trois phases qui se chevauchent dans le temps : une phase aiguë, une phase proliférative et une phase fibrotique [Figure 11] (128-130, 168).

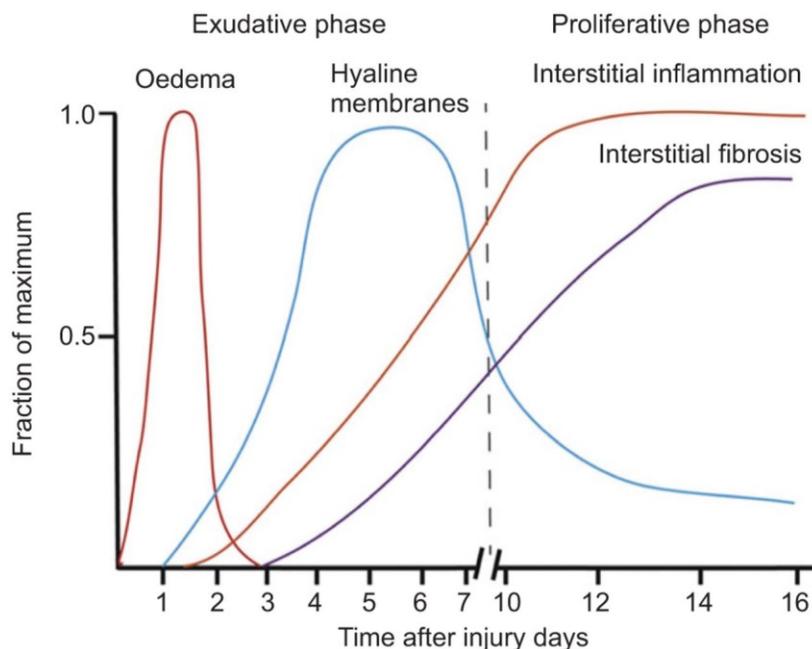


Figure 11. Échelle de temps du SDRA (168)

La lésion est initiée par une insulte directe (p. ex. pneumonie, aspiration de contenu gastrique, etc.) ou indirecte (p. ex. septicémie, trauma sévère, etc.) à la structure alvéolaire et à la microvasculature associée (132-135). La phase aiguë ou exsudative correspond aux premiers jours (<7 jours) suivant la lésion [Figure 11 et 12] (127-130, 168). Les macrophages résidant dans les alvéoles sont activés en réponse à la blessure et libèrent des médiateurs pro-inflammatoires puissants et des chimiokines qui recruteront des neutrophiles et des monocytes de la circulation (127-130, 168). Les neutrophiles activés libèrent alors des médiateurs toxiques qui accentuent la blessure en entraînant une perte de fonction de la barrière épithéliale ainsi que la présence d'un œdème alvéolaire riche en protéines et en fibrine (127-130, 168). Vers la fin de cette phase, des facteurs tissulaires favorisent l'agrégation de plaquettes, la formation de microthrombus, la coagulation intra alvéolaire en plus de la formation de membranes hyalines (débris cellulaires, protéines, fibrines) qui empêchent les échanges gazeux adéquats (127-130, 145, 168).

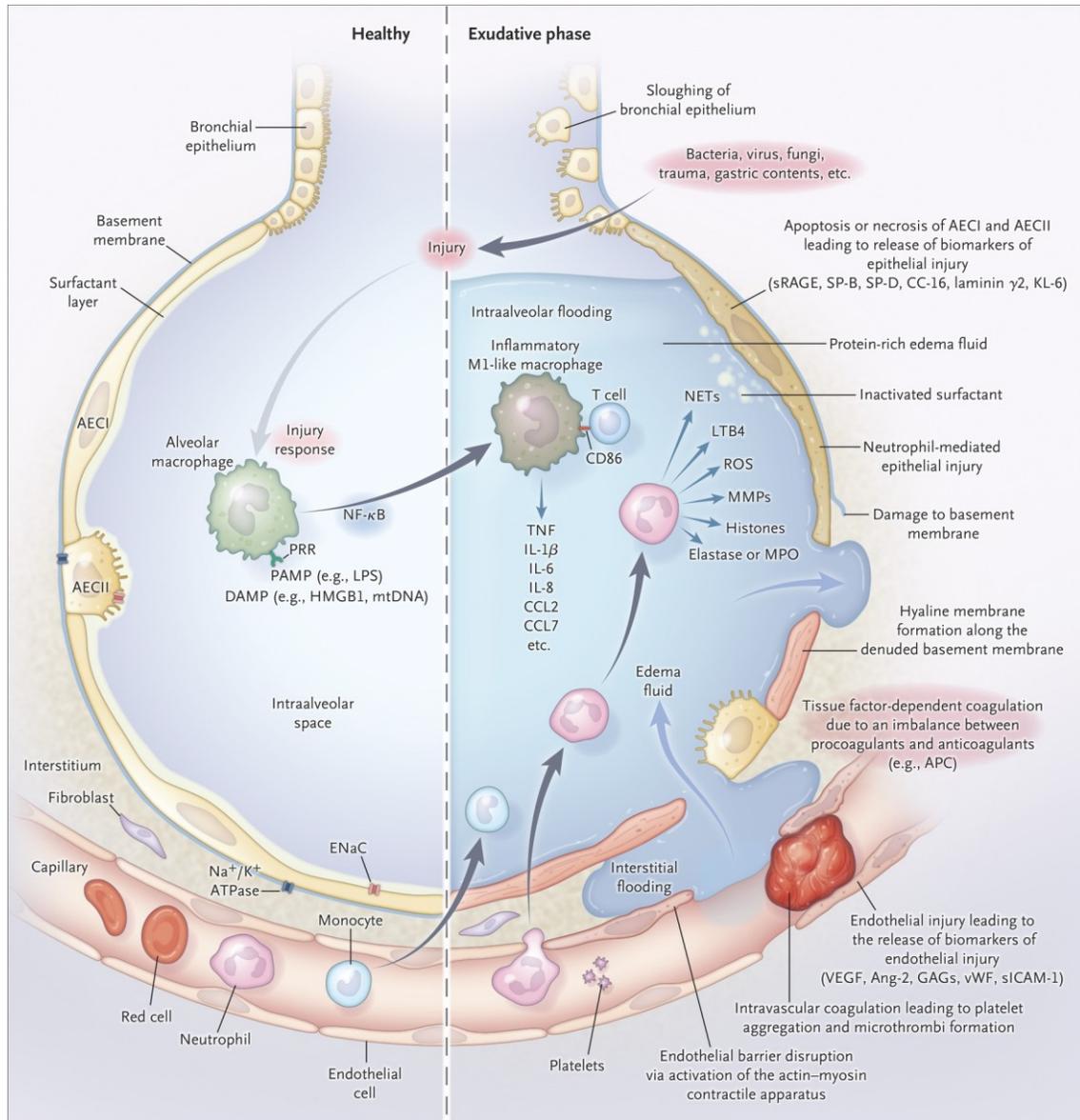


Figure 12. Le poumon sain et la phase exsudative du SDRA (127)

La phase proliférative a lieu entre les jours 3 et 7 suivant la lésion et vise à rétablir l'homéostasie tissulaire [Figure 11 et 13] (127, 129). Elle est caractérisée par une hyperplasie et une prolifération des ATII (127-131). Une prolifération des fibroblastes et cellules endothéliales entraîne la formation d'une matrice provisoire sur laquelle les cellules épithéliales peuvent migrer et restaurer l'architecture et la fonction alvéolaire (127-131). Cette phase du SDRA présente une plus grande variabilité d'un patient à l'autre. En effet, chez certains le rétablissement de l'intégrité de la barrière épithéliale, la réabsorption de l'œdème alvéolaire se fait rapidement et entraîne un retour à la normale (127-131). Chez d'autres, une phase fibrotique

se développe lorsque le stimulus de l'injure persiste, que le processus de réparation est dérégulé ou que l'injure est importante [Figure 13] (127-131). Elle se caractérise par un dépôt excessif de matrice extracellulaire et de collagène (127-131). Ceci mène au développement d'une fibrose interstitielle et intraalvéolaire qui nuit aux échanges gazeux (127-131). Cette phase est souvent associée à un taux de mortalité plus élevée (127-131).

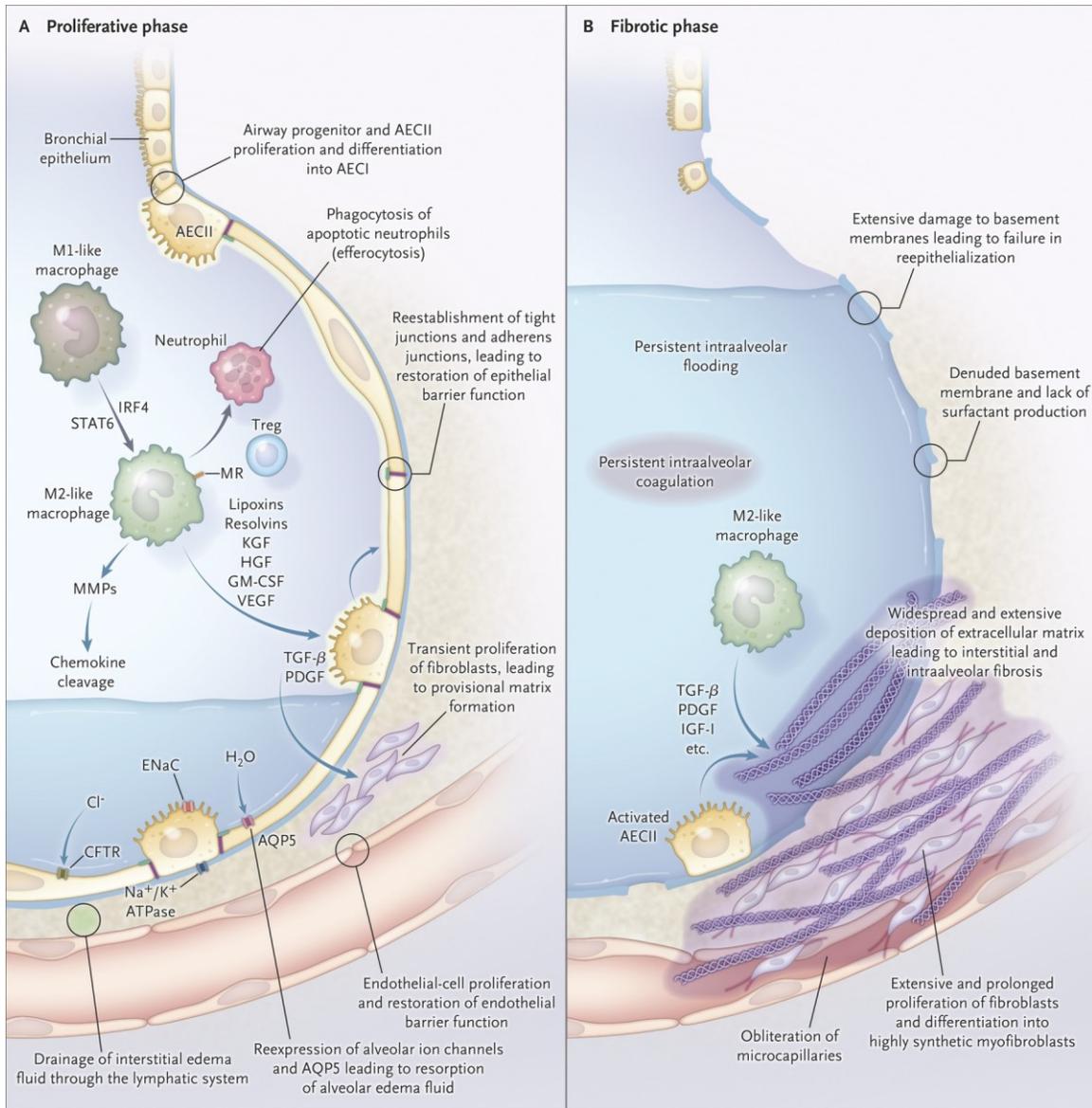


Figure 13. La phase proliférative et fibrotique du SDRA (127)

1.4 La réponse inflammatoire

Dans le SDRA, une forte réponse inflammatoire soutenue est corrélée à la sévérité de la condition (169). Les hauts niveaux de cytokines entraînent une accumulation de liquide alvéolaire, d'œdème et finalement une détresse respiratoire (127, 169). Les médiateurs inflammatoires contribuent entre autres à la sévérité du SDRA via la diminution du transport de Na⁺ dans les poumons (127, 169). Pourtant, ce transport ionique est nécessaire pour la résorption de l'œdème pulmonaire qui est une étape importante dans la résolution du SDRA.

1.4.1 Interleukines

Dans le SDRA, l'interleukine 1 β (IL-1 β) est fortement exprimée dans les lavages broncho alvéolaires (BAL) de patients (170, 171). Celle-ci serait significativement responsable de la perméabilité endothéliale puisqu'un traitement *in vitro* ou même intra trachéale de celle-ci augmenterait la perméabilité microvasculaire (172-175). L'IL-1 β serait aussi partiellement responsable de la perturbation de l'homéostasie liquidienne des poumons, puisqu'elle induirait une diminution de l'expression de l'ARNm et protéique d'ENaC potentiellement via l'inhibition du promoteur ainsi que via un mécanisme p38 MAPK-dépendant (176). De plus, elle serait responsable d'une diminution de la présence apicale de la protéine ENaC et du courant transépithélial amiloride-sensible et du flux de sodium (176). La suppression d'IL-1 β par la « suppressor of cytokine signaling-1 » (SOCS1) va dans le même sens et rétablit l'expression d'ENaC (177).

Étudiées dans un contexte d'allergie, les IL-4 et IL-13 ont montré une capacité à altérer le transport ionique dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (178). Ces deux cytokines ont entraîné une diminution du courant amiloride-sensible dans une chambre d'Ussing, alors qu'un antagoniste du récepteur IL-4 a rétabli le courant (178). L'IL-4 a significativement diminué l'expression des sous-unités β et γ ENaC, mais pas de la sous-unité α (178). L'impact de ces cytokines sur le débalancement de l'homéostasie liquidienne pourrait potentiellement être le même dans d'autres conditions inflammatoires comme celles du SDRA dans lequel elles sont aussi retrouvées (178).

1.4.2 TGF- β 1

Le TGF- β 1 est localement retrouvé dans un état latent où il est attaché à la protéine associée à la latence (LAP) (179). Suite à une injure, l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ est significativement augmentée et coopère avec la *protease-activated receptor 1* pour lier la LAP permettant l'activation du TGF- β 1 (179, 180). Cette cytokine est un médiateur clé du SDRA au cours duquel son expression augmente chez les patients (179, 180). Elle contribue à la hausse de la perméabilité épithéliale et endothéliale et favorise la présence de liquide dans l'espace alvéolaire (179, 180). De plus, le TGF- β 1 réduit le courant Na⁺ amiloride sensible dans les cellules épithéliales pulmonaires, diminue l'expression des transcrits et diminue l'expression protéique d' α ENaC promouvant l'œdème alvéolaire (180, 181). L'interaction entre le TGF- β 1 et β ENaC a été associée à une régulation aiguë d'ENaC dans le poumon en induisant l'internalisation du canal de la surface apicale (179, 180).

1.4.3 miARN

Les miARNs sont de petits ARNs simples brins composés d'environ 22 nucléotides générés à partir de transcrits formant des structures tige-boucle [Figure 14] (182, 183). Ce sont des molécules agissant à titre de guide dans l'extinction génique post-transcriptionnelle via un appariement au 5'UTR, à la région codante ou préférentiellement au 3'UTR (103, 182, 183). Ceci témoigne de l'importance du 3'UTR dans la modulation post-transcriptionnelle des ARNm (103, 182, 183). Les miARNs fonctionnent généralement via un appariement partiellement complémentaire à une séquence de l'ARNm cible; Argonaut. Une protéine faisant partie du complexe RISC auquel le miARN est couplé, est recrutée pour inhiber la traduction du messager (103, 184). Dans certains cas les miARNs induisent le clivage de l'ARNm menant à sa dégradation via une association parfaite ou partielle (185-188). Certains miARNs ont même montré une capacité à réguler à la hausse l'expression d'un gène (189, 190).

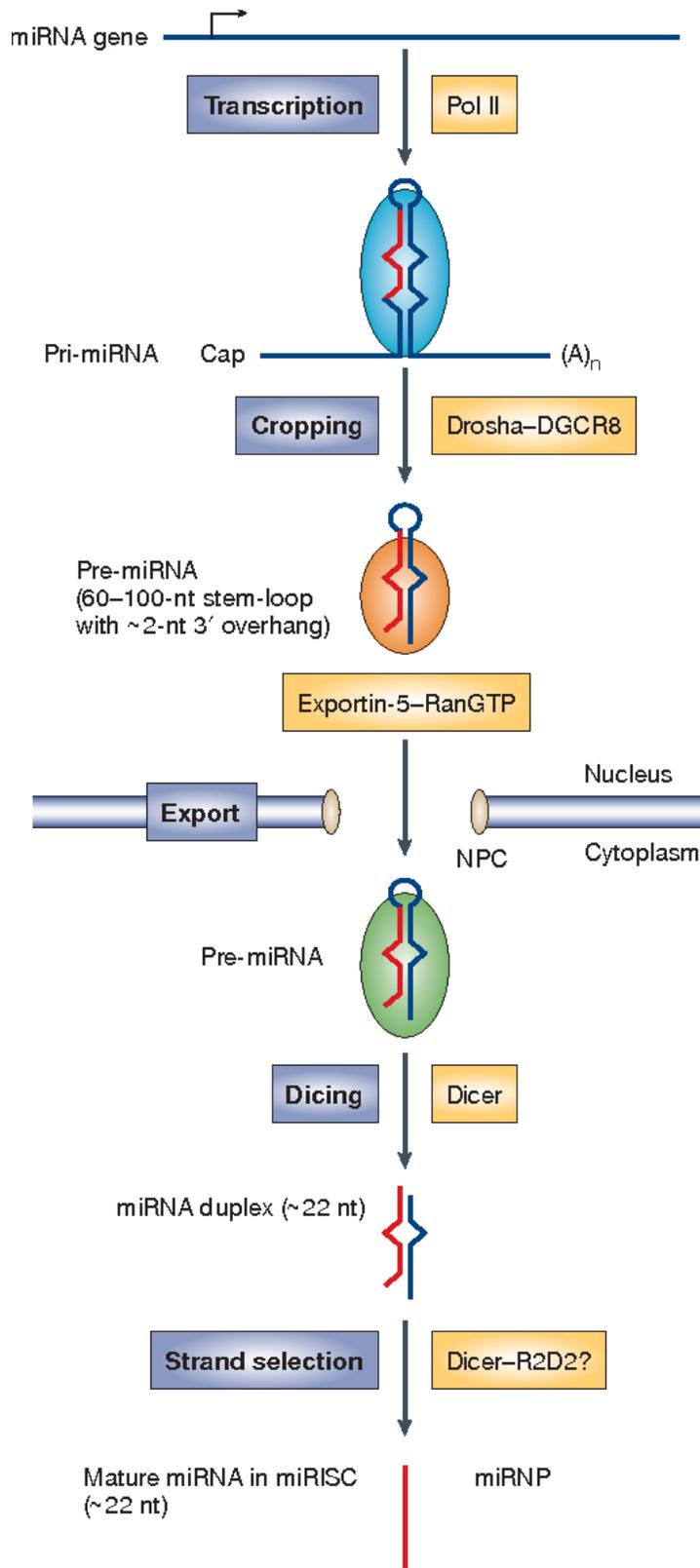


Figure 14. Biogenèse d'un miARN (182)

1.4.4 TNF- α

La cytokine TNF- α est la mieux étudiée dans le SDRA, elle est importante dans l'activation des défenses de l'hôte puisqu'elle permet la production de plusieurs autres cytokines et chimiokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, etc. (169, 191). Elle est retrouvée en grandes quantités dans les BAL de patients SDRA (191, 192). Elle joue un rôle dans l'activation endothéliale et la perturbation des jonctions serrées de l'épithélium pulmonaire participant du coup à la perméabilité de la barrière endothéliale-épithéliale (169, 191). Le TNF- α contribue également à la formation d'œdème pulmonaire en affectant le transport sodique (169, 191). Il a été rapporté que dans les ATII, le TNF- α réduit la quantité de transcrits α , β et γ ENaC ainsi que les niveaux de protéines. Toutefois il n'affecte pas les niveaux d'ARNm de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase (193, 194). Le TNF- α diminue aussi le courant sensible à l'amiloride d'une façon dose-dépendante (193). Poursuivant l'investigation, Dagenais et coll. ont vérifié le rôle potentiel du TNF- α sur l'activité du promoteur d'ENaC dans des cellules épithéliales alvéolaires A549 (195). De l'expression du promoteur, cependant, ils ont aussi montrés qu'une bonne proportion de la diminution des niveaux d'ARN provenait d'une modulation post transcriptionnelle (195).

Le TNF- α n'est cependant pas limité à des effets délétères sur l'œdème pulmonaire mais pourrait également avoir un effet protecteur sur celui-ci (169, 191). Ceci s'expliquerait par le fait que la cytokine ne possède pas uniquement un domaine de liaison à son récepteur mais aussi un domaine lectine appelé domaine TIP (169, 191, 196). À de hautes concentrations, celui-ci se lie à certains oligosaccharides et favorise le transport de Na⁺ dans les ATII (169, 196). Czikora et coll. ont aussi montré que le domaine TIP se lie directement à ENaC et active le canal (197).

Dans les cellules épithéliales alvéolaires, le TNF- α inhibe de 70% l'expression de l'ARNm α ENaC (193). Cependant, seulement 25% de cette diminution est liée à l'activité transcriptionnelle du promoteur (193). Du coup, la demi-vie du messager passe de 15h à 10h, indiquant que le TNF- α module l'expression du transcrit en agissant de façon importante sur sa stabilité (193). Des travaux plus récents ont d'ailleurs montré que le 3'UTR pourrait être impliqué dans ce processus (198).

1.5 Expression d'ENaC dans les lésions pulmonaires

Lors d'une lésion pulmonaire, l'expression de l'ARNm et l'expression protéique d'ENaC diminuent (127-131). Des travaux sur le TNF- α ont montré que cette diminution serait due à l'activité du promoteur et à la modulation de sa stabilité (193).

Plusieurs études ont évalué la stabilité de l'ARNm α ENaC (193, 199-203). Pour y parvenir, elles ont toutes utilisé le même inhibiteur de transcription: l'actinomycine D (Act. D) (193, 199-203). Toutefois, les temps de demi-vie mesurés s'étalent de 8 à 22 heures (193, 199-203). De plus l'Act. D est connu pour altérer le métabolisme cellulaire (204). Cependant, les demi-vies répertoriées avec ce produit ne semblent pas concorder avec ce qui est observé dans un modèle canin d'ischémie où l'ARNm α ENaC diminue de 75% en 4h suite à la reperfusion (205). Cette baisse rapide du transcrit est aussi observée *in vitro* alors qu'on soumet les cellules épithéliales alvéolaires à des conditions pro-inflammatoires (176, 194, 198, 206). Il se pourrait donc que l'Act. D, via son inhibition de la transcription de plusieurs gènes, affecte la stabilité de l'ARNm α ENaC (207).

Dans les travaux de Migneault, un système Tet-Off a été développé pour être en mesure d'étudier la demi-vie du transcrit α ENaC sans affecter le reste du génome (207). Ce système consiste à insérer le gène codant pour α ENaC dans un vecteur pTRE-tight permettant l'expression d'un messager exogène; la transcription de celui-ci est toutefois sous le contrôle de la protéine tTA-Adv qui s'associe au promoteur P_{Tight}. (207). On peut alors inhiber spécifiquement la transcription de celui-ci par l'ajout de doxycycline qui lie la protéine et la dissocie du promoteur (207). Lors du design de la construction TetOff, une séquence codant pour l'épitope V5 a été ajouté en amont de la séquence codante α ENaC pour permettre l'amplification spécifique de la séquence par rapport à l'ARN endogène [Figure 17] (207). Avec le système Tet-Off la demi-vie du messager a été évaluée à 99 ± 15 minutes [Figure 18] (207).

Tel que mentionné précédemment, le rôle du 3'UTR dans la modulation de la stabilité de l'ARNm est bien établi (101, 102). Bien que la pression sélective de l'évolution soit moins grande dans la région non-codante, on peut s'attendre à ce que certaines régions du 3'UTR d' α ENaC, importantes dans la modulation de l'expression des ARNm, soient conservés entre différentes espèces (208, 209). En utilisant une approche bio-informatique : *phastCons*. il a été

possible pour Migneault et coll. d'aligner le 3'UTR d' α ENaC de six différentes espèces : *cavia*, *rattus*, *homo*, *mus*, *bos* et *canis* [Figure 15] (207). Cinq séquences conservées (CS) aux travers les espèces ont été identifiées [Figure 15]. Conservées dans une région qui ne code pas pour une protéine, le fait que ces séquences sont conservées suggèrent qu'elles sont le fruit d'une sélection et qu'elles pourraient jouer un rôle important dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC [Figure 15] (207). D'ailleurs, ces séquences se trouvent à former des structures d'ARN tige-boucle [Figure 16], des structures qui favorisent l'attachement de certains facteurs *trans* (p.ex. RBP) (207).

A

Séquence conservée 1

Cavia	TCAGAACCCCTGCTCAGA--CACCACTACTTC
Homo	TTAGAACCCTGCTC--AGACACCATTACTTT
Mus	-----CCTGCTCAAAGGCACCTTTGCTTT
Bos	TGAGAACCCCTGCTC--GGATACCATTACTTC
Rattus	TTAGAACCCTGCCAAAGGCACCACTTCTTT
Canis	TTAGGACCCTGCTC--AGACACCCTACTTTC

Séquence conservée 2

Cavia	TAGTTCCTGGGAATTCCCCTTCCCTGACTCCTCAGGGCTGCGGCTGGA
Homo	TGTACTTAGGCAATTCCTTCCCTGACTCCCAGGGCTAGGGCTAGA
Mus	TTAGCTCTTGGCAATTCCCTTCCCTGACTCCTCAGGGTGGGGCTAGA
Bos	TAGTTGCTAGGGGACTCTGTTTGCCTGACTCCCAGGGCAGGAAGTGGGG
Rattus	TAGTTCCTTGGCAATTCCTTCCCTTCCCTGACTCCTCAGGGTGGGACTAGA
Canis	TAGTACTTGGGAATTCCTTCCCTGAGGGCCTGGAGCAGACCAG

Séquence conservée 3

Cavia	TTGGGCGGGGTCCCCACCCAA
Homo	TTGGGTGGAAACCCACCCAA
Mus	TTGGGTGGGGTCCCCACCCAA
Bos	TGGGGTGGGGTCCCCACCCAA
Rattus	TTGGGTGGGGTCCCCACCCAA
Canis	TTGAGTGGGAACCCACCCAA

Séquence conservée 4

Cavia	GGCAAGTGGC-TGTGT-GAGGGCAGTGGAG
Homo	GGGAAGCAAGATGGTAAGGG-CTCAGGAA
Mus	GGAGGAACAGGCTAAGCAAGGGGCCACGGAA
Bos	GATGAAGCAGCATGGATAAGGGCTGTGGAA
Rattus	GAGGGAACAGGCTGAGTAAGGGGCCACGGAA
Canis	GG-GAGGCAGGATGGATAAGGGGCTGCAGAA

Séquence conservée 5

Cavia	CCTCCT----GAGTGGCCAT-GTG----CCTGTGGTGGC
Homo	CTTCCTCTCAGAGCCGCCAACTG----CCGTTGATGTG
Mus	CTTCCAC----AGTGCCTCAG-CTG----TCTTTGGTGTG
Bos	CTTCCTGTACAGAGCTGCCAG-CTG----CCCCTGGTGTG
Rattus	CTTCCC----AGCGGCCCG-CCGAGCCCTCTGTGGTGTG
Canis	CTTCCTCTCAGAGCTGCCAA-CTG----CCTTTGGTGTG

B



Figure 15. Séquences conservées du 3'UTR α ENaC aux travers différentes espèces (207)

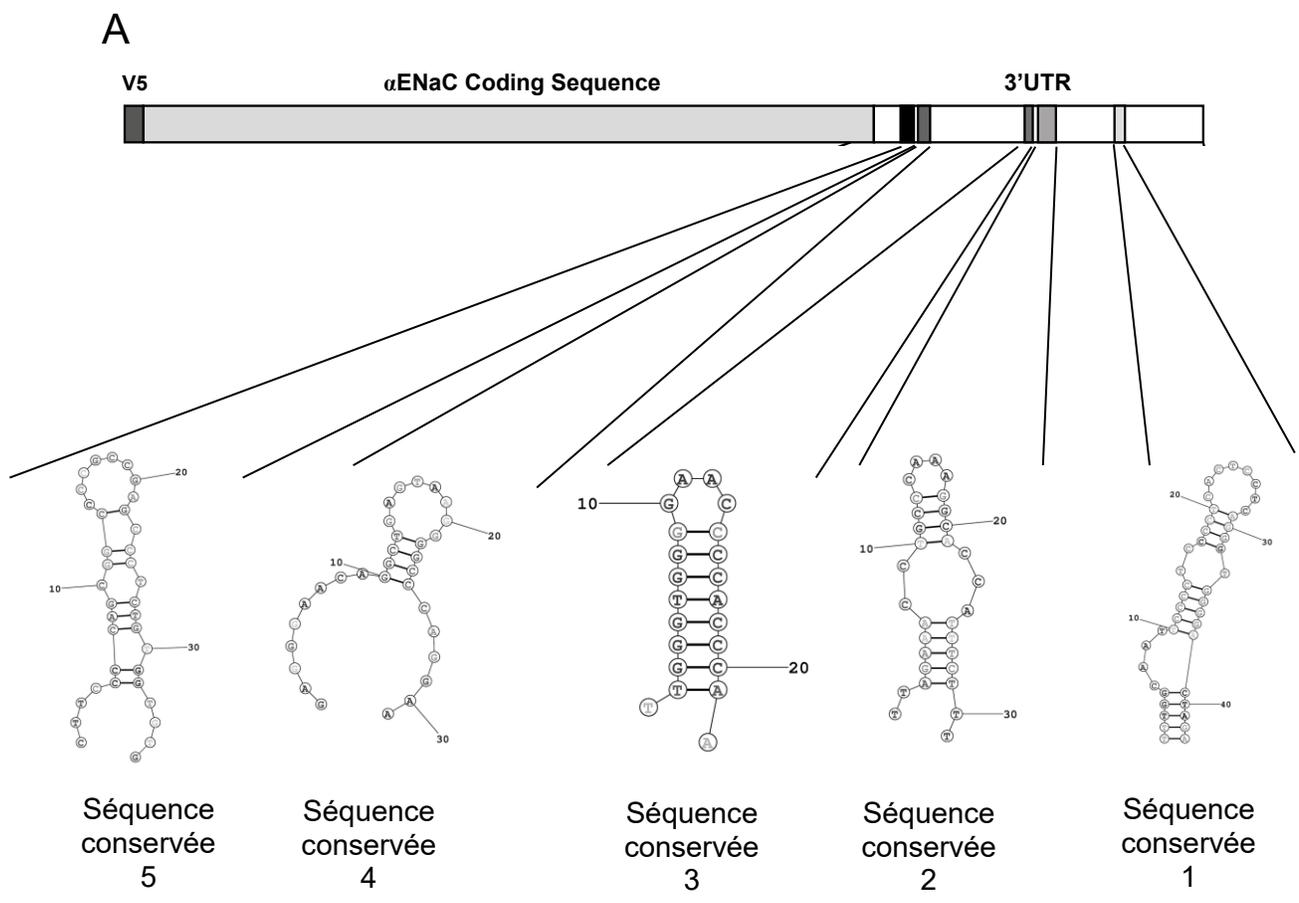


Figure 16. Prédiction structurale de séquences conservées du 3'UTR α ENaC

Ces mutants de délétion ont tous montré des changements significatifs dans leur stabilité par rapport au messager avec le 3'UTR complet [Figure 18] (207). Les mutants 1, 2 et 4 ont tous montré une hausse du temps de demi-vie avec des temps respectifs de 203, 300 et 375 min [Figure 18] (207). Seul le mutant 3 a montré une déstabilisation par rapport au 3'UTR complet avec 47 min [Figure 18] (207). Ces résultats suggèrent d'abord que le 3'UTR de l'ARNm α ENaC a un rôle déstabilisateur en général puisque le mutant 4 est fortement stabilisé par le retrait total du 3'UTR [Figure 18] (207). En ce qui concerne les séquences conservées, elles sont majoritairement déstabilisatrices pour le messager à l'exception de la séquence conservée 3 qui aurait plutôt un rôle stabilisateur [Figure 18] (207). Cependant la délétion séquentielle de ces mutants ne permet pas d'attribuer la stabilisation/déstabilisation observée directement aux séquences conservées puisque de grandes portions du 3'UTR font partis de la délétion.

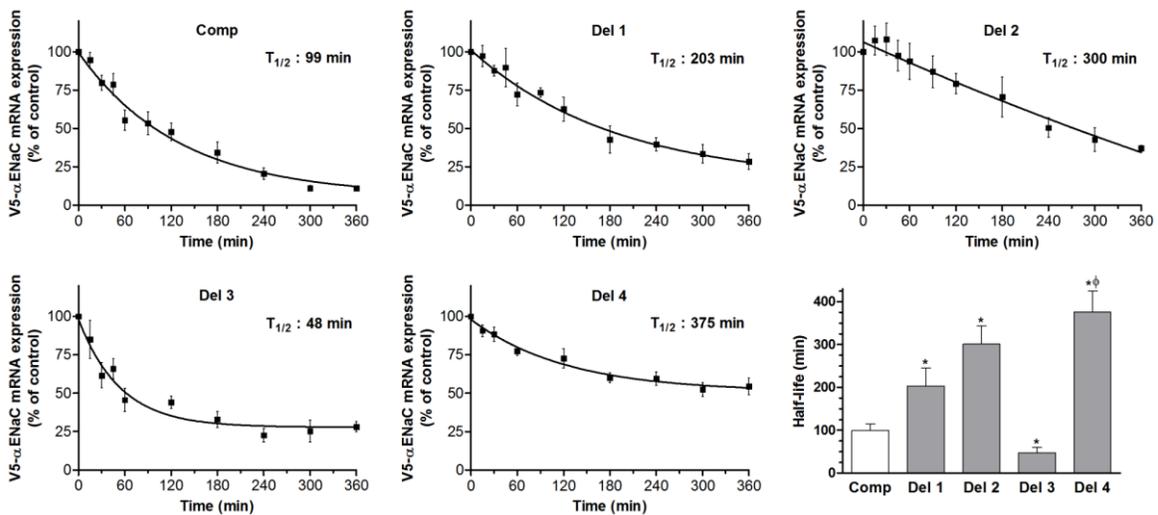


Figure 18. Courbes de dégradation des différents mutants de délétion séquentiels (207)

Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs

2.1 Hypothèse de recherche

Nous postulons que la portion 3'UTR de l'ARNm d' α ENaC joue un rôle important dans la modulation de la stabilité de l'ARNm en réponse au TNF- α .

2.2 Objectifs

Le premier objectif est de déterminer l'impact de chacune des CS identifiées du 3'UTR α ENaC spécifiquement dans la modulation de l'ARNm.

Le second objectif sera d'investiguer l'impact de ces CS du 3'UTR α ENaC identifiées dans la modulation de l'ARNm en présence de TNF- α .

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1 Modèle cellulaire

La perte de réabsorption liquidienne dans le SDRA se produit principalement dans les alvéoles, donc les ATII ont été utilisés comme modèle cellulaire dans le cadre de ce mémoire. Nous avons utilisé notre modèle de culture de cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire, un modèle bien établi dans le laboratoire pour tester les mutants 3'UTR ENaC.

3.1.1 Chirurgie

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant entre 175 et 300g sont d'abord anesthésiés à l'isoflurane et ensuite par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (100mg/mL) et xylazine (100mg/mL). Par la suite, ceux-ci sont rasés de l'abdomen au cou avant d'être désinfectés une fois à la chlorexidine puis par trois passages successifs d'éthanol 70% et de povidone-iode 10%. L'épiderme du rat est alors coupé et retiré de l'abdomen au cou, puis une incision est effectuée de l'appendice xiphoïde au cou avant de retirer les côtes. Le thymus est enlevé à l'aide d'une paire de pinces. Une trachéotomie est pratiquée afin d'insérer une aiguille 18G1 tronquée, recouverte à son extrémité d'un tube en polyéthylène, et liée à un robinet à trois voies; le tout est maintenu dans la trachée par deux fils de chirurgie 2-0 liés par trois nœuds simples. Une exsanguination de l'animal est ensuite effectuée en sectionnant la veine cave inférieure et l'aorte abdominale. Le plafond des oreillettes est aussi retiré pour permettre une meilleure perfusion des poumons. Une incision au niveau du ventricule droit permet l'insertion d'un cathéter dans l'artère pulmonaire. Celui-ci permettra, à l'aide d'une ventilation des poumons via la trachée, la perfusion des poumons avec la solution II (voir Annexe 1) par gravité. Une fois la perfusion terminée, le bloc cœur-poumons et la trachée sont prélevés [Figure 19]. La solution I (voir Annexe 1) est alors utilisée pour enlever le surplus de sang et de caillots ainsi que pour effectuer un lavage broncho-alvéolaire à dix reprises via la trachée dans le but d'éliminer un maximum de macrophages alvéolaires [Figure 19]. Le tissu pulmonaire est ensuite digéré par une solution d'élastase (10mL à 4U/mL) qui est injectée via la trachée à quatre reprises (1 x 1min suivi de 3 x 10min) pour un total de 160U par rat [Figure 19]. Au cours de

ces incubations, le bloc cœur-poumons est maintenu à 37°C dans un bain-marie, dans une solution de SGGGS (sodium glucose gentamycine septra).

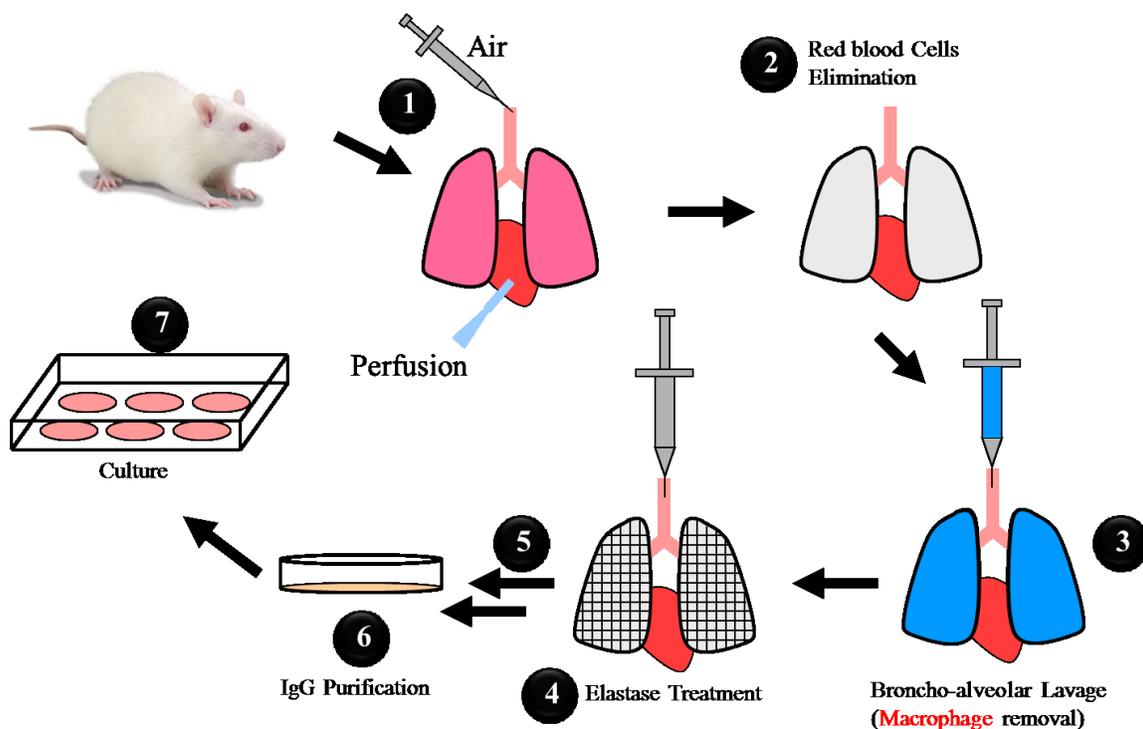


Figure 19. Isolations d'ATII de rats

1. Perfusion 2.Élimination des globules rouges 3. Lavage broncho-alvéolaire (retrait des macrophages) 4. Traitement à l'élastase 5. Les poumons sont émincés et filtrés 6. Purification aux IgG 7. Culture cellulaire.

3.1.2 Isolation des cellules épithéliales alvéolaires et culture cellulaire

Les poumons sont alors libérés des structures médiastinales puis placés dans 5mL de solution II contenant de la désoxyribonucléase (DNase) I (250µg/mL). Ils sont alors émincés pendant 5min à l'aide d'un ciseau. 5mL de sérum de veau fœtal (SVF) sont ensuite ajoutés pour bloquer l'activité enzymatique de l'élastase et de la DNase I. La suspension cellulaire est agitée pendant 5min avant d'être filtrée à travers un montage de filtres de porosités successivement plus fines (deux épaisseurs de gaze, un filtre de nylon 150µm et un de 30µm) afin d'éliminer les fragments non digérés. Le filtrat est centrifugé à 200 g pendant 10min à 4°C et le culot est resuspendu dans 7,5mL de MEM sans SVF. Dans le but de retirer les macrophages pulmonaires des cellules épithéliales alvéolaires, 2,5mL de la suspension est placé dans trois pétris

bactériologiques recouverts d'IgG de rat qui permettront l'adsorption des macrophages pendant 35min dans un incubateur à 5% CO₂ à 37°C [Figure 19]. Les cellules sont de nouveau centrifugées à 200 g pendant 10min à 4°C, mais cette fois le culot, qui contient les cellules épithéliales alvéolaires de type II, est resuspendu dans du MEM supplémenté avec du SVF ainsi que 367,9µM de Septra. Un décompte des cellules viables est ensuite fait à l'hématimètre en présence de bleu de trypan et celles-ci sontensemencées à une densité de 14x10⁶ cellules dans un milieu MEM + 10% SVF + Septra dans un pétri de 100mm [Figure 19]. Cette technique permet l'obtention d'une population composée d'ATII (≥ 80%) ainsi que d'ATI.

3.2 Réactifs

Le milieu de culture MEM, le SVF et le TNF-α recombinant de rat ont été obtenus de Life Technologies Inc. (Burlington, ON). L'élastase pancréatique porcine a été obtenue de Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ). Le Septra provient de Triton Pharma inc. (Montréal, QC) et la gentamycine de Sandoz (Boucherville, QC). Les IgGs de rat et la doxycycline proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

3.3 Mutants de délétion(s)

Pour étudier l'impact des différentes CS du 3'UTR d'αENaC des mutants présentant différentes combinaisons de délétions de ces séquences ont été générées pour voir l'impact du retrait de ces séquences.

Les vecteurs pTet-Off Advanced et pTRE-tight proviennent de Clontech Laboratories inc. (Mountain View, CA). Pour construire le vecteur pTRE-V5-αENaC, une amplification par PCR a été effectuée avec l'amorce sens, codant pour l'épitope V5 en aval du cadre de lecture ouvert d'αENaC du rat (5' – ATC GCA GCT AGC ACC ATG GGT GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC – 3'), et l'amorce anti-sens à l'extrémité 3' de l'ADNc (5' – GCA CTA ATC GAT TTT ATT GAG TAC CTG CCT ACC CGT C – 3'). Le produit de l'amplification a ensuite été inséré dans le vecteur pTRE-tight suivant une digestion enzymatique par NheI-ClaI. C'est la séquence de l'épitope V5 (5' – GGT GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG – 3') situé en amont des séquences αENaC qui permettra d'amplifier spécifiquement l'ARNm αENaC recombinant et non le transcrit endogène lors de la RT-qPCR.

Les différents mutants au niveau du 3'UTR d' α ENaC ont été générés à partir du plasmide pTRE-V5- α ENaC avec le 3'UTR complet à l'aide de la trousse *Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* de New England Biolabs (Ipswich, MA) en fonction du protocole du fournisseur présenté à la figure 20, en utilisant les oligonucléotides de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) présentés dans le tableau III.

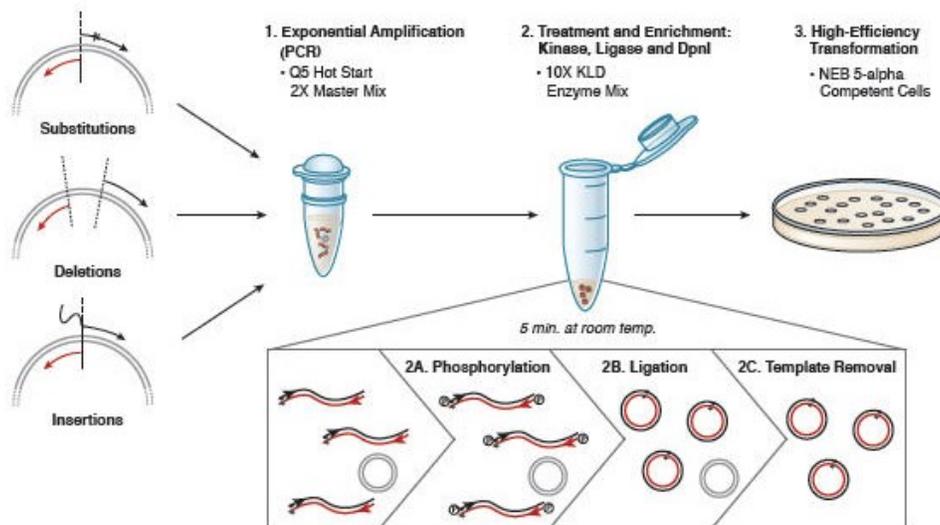


Figure 20. Aperçu du Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit

1re étape : amplification exponentielle avec des oligonucléotides standards et le *master mix* contenant la *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase*. 2e étape : Incubation du produit d'amplification avec un mélange d'enzymes, soit une kinase, une ligase et DpnI. Ceci permet une circularisation du produit de PCR et la dégradation du template d'ADN. 3e étape : Transformation dans des bactéries *E. coli* NEB 5-alpha compétentes.

Tableau III. Oligonucléotides utilisés lors de l'étape d'amplification du « Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit » pour générer les différents mutants de délétion du 3'UTR α ENaC

Oligonucléotides	Séquence 5' → 3'
Délétion CS1 S	TGTGAACTCAGTTACCCTG
Délétion CS1 AS	GGGATGCATAGACTGTGTG
Délétion CS2 S	GTAAGACAGACCAGGGTAG
Délétion CS2 AS	ACAAGGGGGCTTTTGGGT
Délétion CS3 S	AAGCCCCCTTGTTAGTTC
Délétion CS3 AS	GTTCAAGGAGAGGAGCAG
Délétion CS2&3 S	GTAAGACAGACCAGGGTAG
Délétion CS2&3 AS	GTTCAAGGAGAGGAGCAG
Délétion CS4&5 S	GCCGTCCAGAGGACAGGG
Délétion CS4&5 AS	ATGTGCTGAAGTGAGATATCCATCAG

3.4 Transfection transitoire des cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules épithéliales alvéolaires ensemencées à une densité de 14×10^6 cellules dans un pétri de culture cellulaire de 100mm sont, au jour 2, traités avec 5mL de trypsine 0,05% pour 3min à 37°C afin de les suspendre. 14mL de milieu de culture MEM + 10% SVF sans antibiotique sont par la suite utilisés pour neutraliser la trypsine avant de centrifuger le tout à 300 g pendant 5min à 22°C. Ensuite, 1mL de PBS est utilisé pour resuspendre le culot; les cellules vivantes sont comptées à l'hématimètre en présence de bleu de trypan. Une seconde centrifugation est effectuée et cette fois les cellules sont resuspendues dans le tampon R du système de transfection NEON de Life Technologies Inc. (Waltham, MA) à une concentration de 4×10^7 cellules/mL. Pour chaque puit, 4×10^5 cellules ont été mélangées avec 1 μ g de vecteur pTet-Off et 1 μ g de pTRE-V5- α ENaC avant d'être électroporées dans un embout électrode NEON de 10 μ L. L'électroporation a été faite avec les conditions suivantes : deux pulses, 20ms par pulse à un voltage de 1450V. Les cellules électroporées sont immédiatement déposées dans un puit contenant 1mL de MEM + 10% SVF sans antibiotique. Au jour 4, le milieu des cellules est changé pour du MEM + 10% SVF avec antibiotique et peuvent subir un traitement dès le jour suivant.

3.5 Traitement à la doxycycline

Le modèle Tet-Off développé permet la transcription du gène V5- α ENaC en absence de doxycycline, alors que la protéine tTA-Adv s'associe au promoteur P_{Tight}. Au jour 5, 1 μ g/mL de doxycycline est ajouté pour une période de 15min à 6 heures. La doxycycline se lie alors à la protéine tTA qui se dissocie ensuite du promoteur cessant du coup la transcription de V5- α ENaC. La séquence de l'épitope V5 insérée en amont de la séquence codante pour α ENaC assure l'amplification spécifique de l'ARNm α ENaC exogène par RT-qPCR de sorte à le distinguer du messenger endogène.

La stabilité des transcrits α ENaC en réponse à un stress inflammatoire (TNF- α) a aussi été déterminée en présence de doxycycline, mais uniquement après un prétraitement de 5h (TNF- α 100ng/mL).

3.6 Mesure de l'expression d'ENaC

L'extraction de l'ARN total des cellules ensemencées a été effectuée avec du Ribozol selon les indications du manufacturier : AMRESCO (Solon, OH). L'ADN complémentaire (ADNc) est alors synthétisé à l'aide du iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad Laboratories Inc., Mississauga, ON), selon les indications du fabricant, à partir d'1µg d'ARN total. L'amplification des transcrits V5-αENaC et tTA-Adv a par la suite été effectuée avec 5ng d'ADNc (10µL final) avec le SsoAdvanced Universal SYBR Green qPCR Supermix (BioRad Laboratories Inc.) dans le thermocycleur StepOne Plus[®] d'Applied Biosystems (Life Technologies in.). Les oligonucléotides utilisés pour le RT-qPCR sont présentés dans le tableau IV. L'amplification a été effectuée selon les paramètres suivant : une étape de dénaturation initiale à 95°C pour 10min permettant l'activation de la *Taq* polymérase suivi de 40 cycles composés d'une phase de dénaturation à 95°C pour 10sec, d'une phase d'hybridation et d'élongation à 60°C pour 1min. Des courbes de fusion à haute résolution sont effectuées à la fin des cycles d'amplification pour vérifier l'homogénéité des produits de PCR, incluant la présence d'amorces dimères, confirmant la spécificité de la réaction de PCR [Figure 21]. La normalisation du signal de V5-αENaC a été faite avec le signal de tTA-Adv permettant du même coup de normaliser l'efficacité de la transfection selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$. L'ARNm est exprimé en pourcentage d'expression après traitement à la doxycycline par rapport aux cellules non traitées provenant du même rat.

Tableau IV. Oligonucléotides utilisés pour le RT-qPCR en temps réel

Oligonucléotides	Séquence 5' → 3'
V5 rt S	CCTAACCCTCTCCTCGGTCT
V5 rt AS	TTGAATTGGTTGCCCTTCAT
tTA-Adv S	GCCTGACGACAAGGAAACTC
tTA-Adv AS	AGTGGGTATGATGCCTGTCC

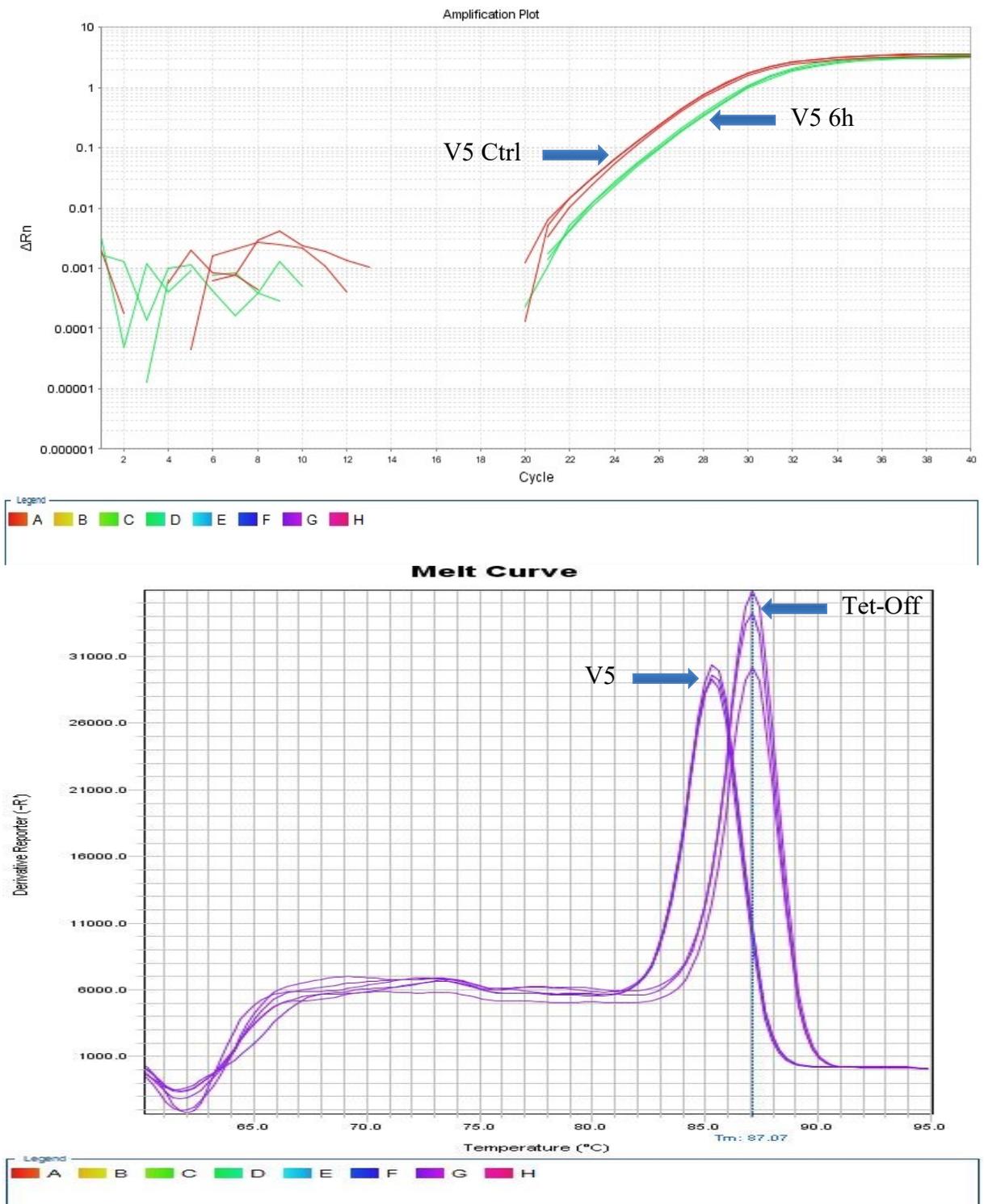


Figure 21. Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR)

3.7 Méthodes statistiques

Tous les résultats expérimentaux ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. Différents tests statistiques ont été effectués en fonction des résultats analysés. Une régression non linéaire « One-phase decay » a permis d'évaluer les courbes de dégradation de l'ARNm α ENaC [Figure 23]. Un test ANOVA à un facteur suivi d'un test post hoc de Bonferroni a été effectué lors de la comparaison des demi-vies des différents mutants au 3'UTR complet [Figure 24]. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les niveaux d'expressions à 30 min de l'ARNm en condition basale à ceux en présence de TNF- α [Figure 27]. Dans tous les cas, un résultat fut considéré significatif lorsque le test statistique présente un $P < 0,05$.

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Description des mutants ponctuels d'ARNm α ENaC

Pour mieux étudier l'impact des séquences conservées trouvées dans le cadre des travaux de Migneault, cinq mutants de délétion ponctuels pour la région 3'UTR ont été produits [Figure 22]. Les séquences CS1, CS2&3, CS3, CS4&5, CS1 à CS5 ont été enlevées spécifiquement du 3'UTR pour tester leur effet sur la demi-vie du messager. En raison du rôle potentiellement stabilisateur de CS3 nous avons également testé un mutant 3'UTR dépourvu de toutes les CS sauf CS3. [Figure 22]. Tous ces mutants sont alors insérés dans le vecteur pTRE-tight codant pour α ENaC tel que mentionné précédemment [Figure 22].

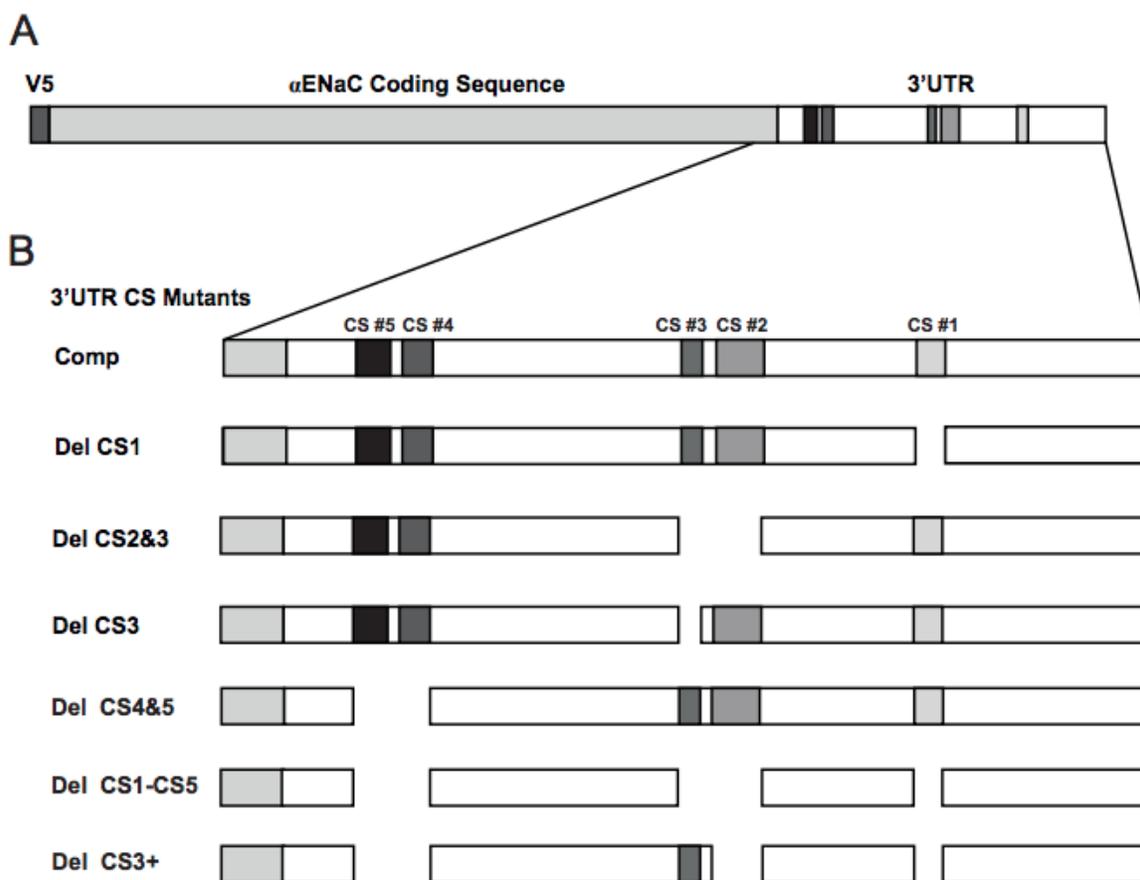


Figure 22. Mutants de délétion ponctuels

4.2 Modulation de la stabilité des mutants ponctuels d'ARNm α ENaC

En évaluant l'expression du messenger α ENaC en fonction du temps à l'aide du système Tet-Off décrit précédemment, un modèle exponentiel de « One-Phase-Decay » a pu être généré. Cette courbe permet alors de calculer la demi-vie des différents mutants à partir de leur constante de dégradation respective. Un R^2 est associé à chacune des courbes du modèle. Celui-ci correspond à la justesse avec laquelle la courbe générée traverse les points expérimentaux. Plus le R^2 est près de 1.0, plus la courbe représente bien la relation entre l'expression de l'ARNm V5- α ENaC (% du contrôle) et le temps (min). Les R^2 obtenus pour nos courbes varient entre 0.6 et 0.8. Nous avons jugé ces valeurs acceptables, puisque de façon général le modèle suit bien la dégradation expérimentale observées. La demi-vie des mutants ponctuels CS4&5, CS3, CS1-CS5 et CS3+ a augmenté significativement par rapport à la demi-vie de 99 ± 15 min du messenger V5- α ENaC possédant son 3'UTR complet [Figure 18, 23 et 24]. Le retrait des différentes séquences conservées a entraîné une stabilisation des messagers avec des temps de demi-vie de 169 ± 11 min, 172 ± 16 min, 246 ± 40 min, 193 ± 31 min, 208 ± 38 min et 237 ± 40 min pour les mutants CS1, CS2&3, CS4&5, CS3, CS1-CS5 et CS3+ respectivement [Figure 23 et 24]. La dégradation de l'ARNm V5- α ENaC ralentit et se stabilise entre 25 et 35% de l'expression pour le messenger avec le 3'UTR complet ainsi que tous les mutants de délétion ponctuels [Figure 23].

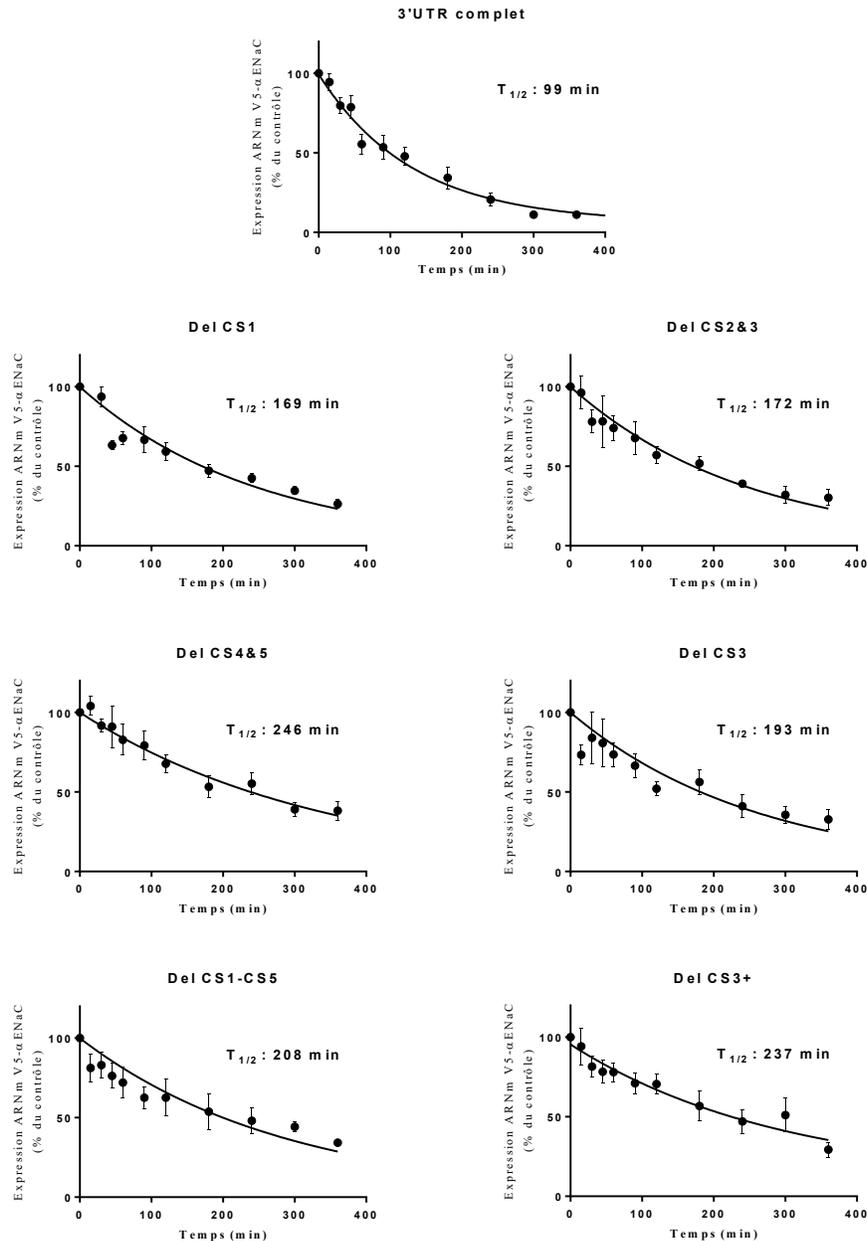


Figure 23. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC

Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pTRE-tight codant pour αENaC et les différents mutants 3'UTR. Le plasmide pTet-Off a été cotransfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Traité à la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15min à 6h, l'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées (t = 0) après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. (La demi-vie de l'ARNm V5-αENaC a été déterminée par l'équation de dégradation obtenue à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay »)

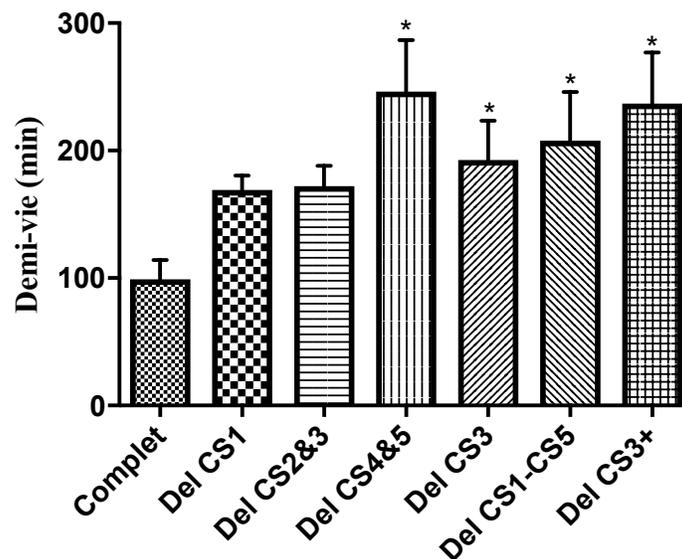


Figure 24. Modulation de la stabilité des mutants ponctuels d'ARNm V5- α ENaC
 Les demi-vies des ARNm V5- α ENaC des différents mutants de délétion ponctuels ont été comparées à celle du 3'UTR complet. Les demi-vies ont été mesurées à partir de la constante de dégradation des courbes de dégradation de l'ARNm V5- α ENaC obtenues pour chaque mutant et sont exprimées en minutes. (Test ANOVA à un facteur et test *post hoc* de Dunnett; * : $P < 0.05$ vs contrôle; $n \geq 4$)

4.3 Modulation de la stabilité des mutants ponctuels d'ARN α ENaC en condition inflammatoire

En utilisant le système Tet-Off, la dégradation du messager α ENaC avec son 3'UTR complet ainsi que celle des différents mutants de délétions ponctuels a été testée en conditions inflammatoires. Les différents mutants ponctuels du 3'UTR dans leur plasmide pTRE-V5- α ENaC ont donc été cotransfectés avec le plasmide Tet-Off. Le profil de dégradation des ARNm correspondants a alors été déterminé en présence de doxycycline suite à un prétraitement de 5h au TNF- α (100ng/mL). Suite au prétraitement de TNF- α , le messager α ENaC avec le 3'UTR complet se dégrade rapidement avant d'atteindre un plateau à 48% [Figure 25]. En ce qui concerne les mutants ponctuels, seul le CS1-CS5 a montré une similarité avec le 3'UTR complet au niveau de la courbe de dégradation avec une dégradation rapide suivie d'un plateau à 42% [Figure 26]. Pour les autres mutants, les courbes de dégradation sont plutôt similaires aux courbes sans TNF- α [Figure 26].

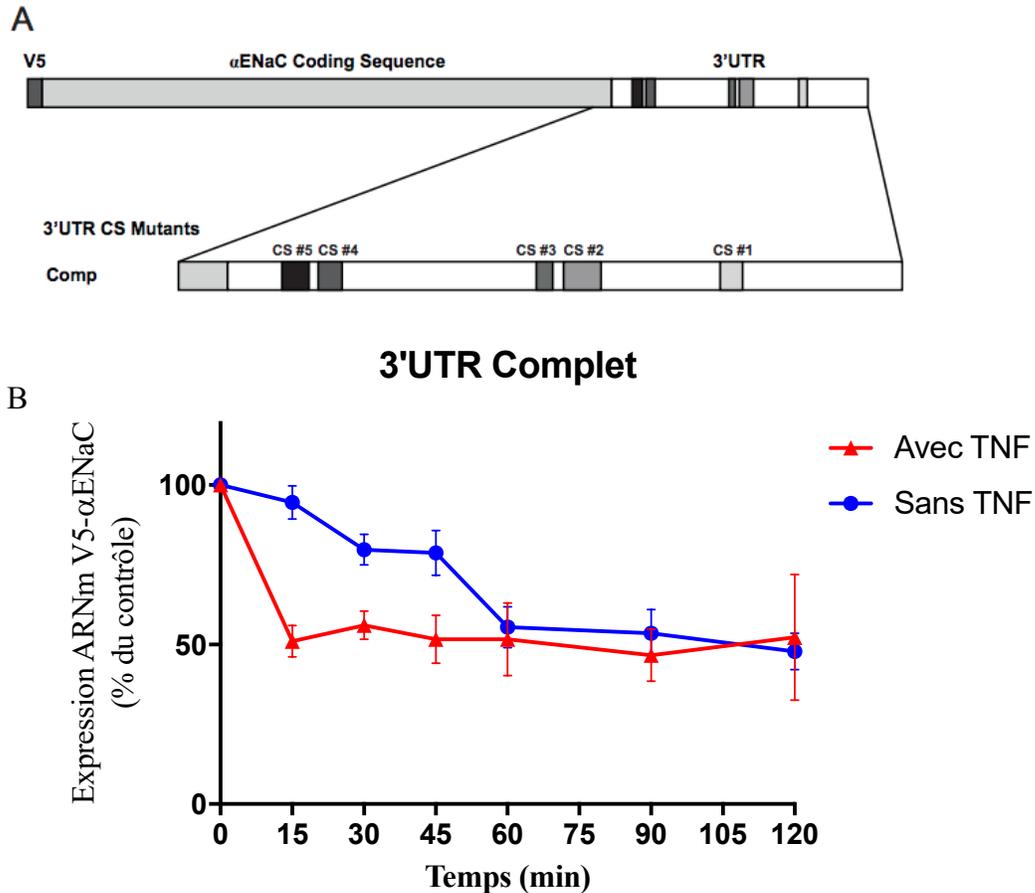


Figure 25. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec le 3'UTR complet en condition inflammatoire

(A) Représentation schématique du 3'UTR complet. (B) Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pTRE-tight codant pour α ENaC et le 3'UTR complet. Le plasmide pTet-Off a été cotransfecté afin d'exprimer l'ARNm V5- α ENaC. Suite à un prétraitement de 5h au TNF- α , les cellules ont été traitées à la doxycycline 1,0 μ g/mL durant une période de 15min à 2h, l'expression de l'ARNm V5- α ENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5- α ENaC comparé aux cellules non traitées (t = 0) après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad.

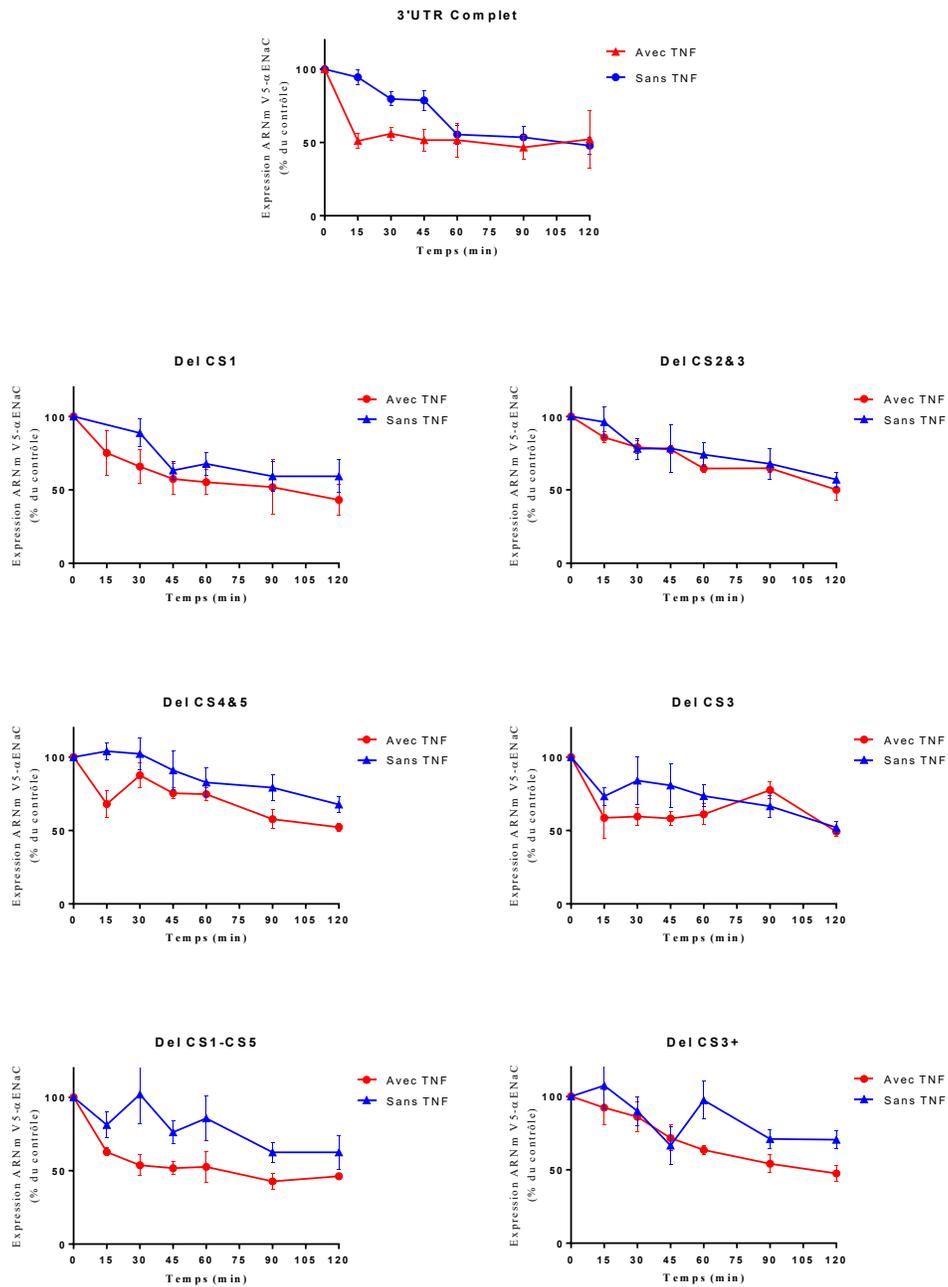


Figure 26. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC en condition inflammatoire

Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pTRE-tight codant pour αENaC et les différents mutants 3'UTR. Le plasmide pTet-Off a été cotransfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Suite à un prétraitement de 5h au TNF-α, les cellules ont été traitées à la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15 min à 2 h, l'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées (t = 0) après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad.

4.4 Modulation rapide de la stabilité des mutants ponctuels d'ARN α ENaC en condition inflammatoire à 30 min

Les courbes du messenger contenant le 3'UTR complet et du mutant CS1-CS5 sont toutes les deux biphasiques. La seconde phase étant un plateau qui ne permet pas de comparer l'impact du TNF- α sur la dégradation du messenger, la première phase est analysée. À 30 min, l'expression en condition basale de l'ARNm contenant le 3'UTR complet se situe en moyenne à 80%, alors qu'en présence de TNF- α il chute à 56% [Figure 27]. En ce qui a trait au mutant CS1-CS5, son niveau d'expression en condition basale se situe à 83%, alors qu'en présence de la cytokine pro-inflammatoire l'expression de l'ARNm chute à 54% [Figure 27].

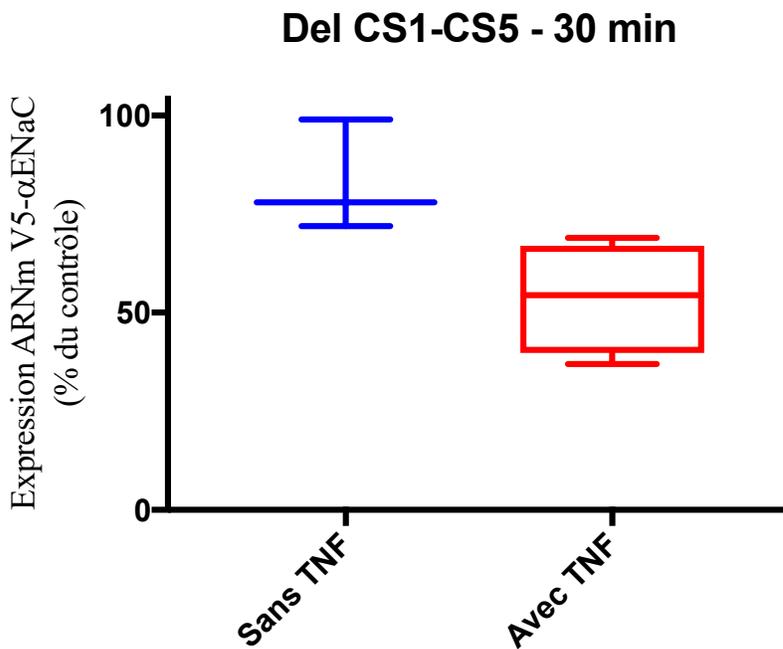
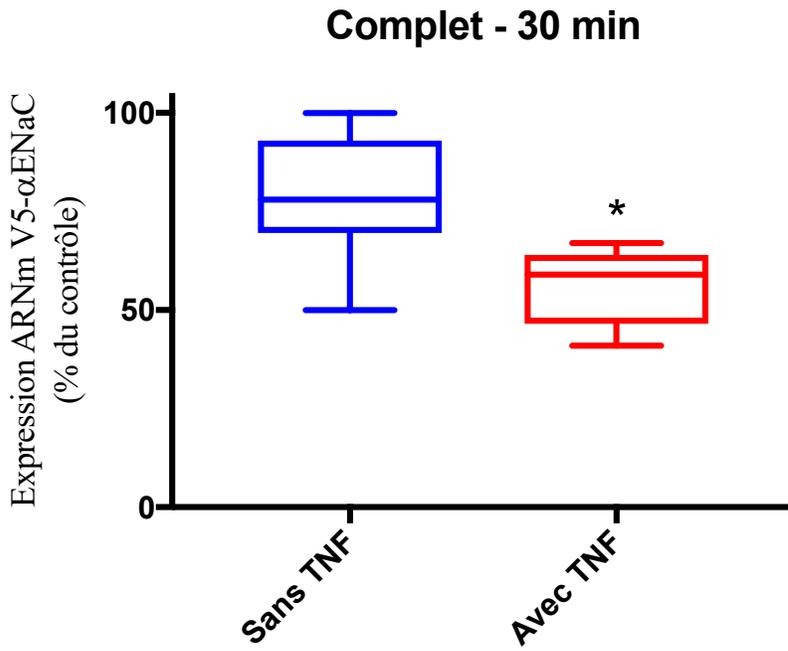


Figure 27. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC en condition inflammatoire à 30 min – Mutant de délétion CS1-CS5

Chapitre 5 : Discussion

5.1 Impact des séquences conservées du 3'UTR dans la stabilité de l'ARNm α ENaC

Nous avons créé des mutants de délétion ponctuels pour chaque CS identifiée précédemment [Figure 22]. L'étude de chacun de ces mutants nous a permis d'observer que peu importe la CS retirée, le messenger est stabilisé par rapport à celui possédant le 3'UTR complet [Figure 24].

En utilisant le système Tet-Off développé par le laboratoire, la demi-vie du transcrit α ENaC est estimée à 99 min, une valeur bien inférieure aux 8 à 22h estimée en utilisant l'Act. D [Tableau V] (207). Avec ce même système, les mutants de délétion ponctuelle démontrent une demi-vie plus élevée que le messenger contenant le 3'UTR complet [Figure 24]. Cette stabilisation du transcrit lors du retrait d'une ou plusieurs CS nous indique que ces CS sont déstabilisatrices pour l'ARNm lorsqu'elles sont présentes dans le 3'UTR.

Bien que l'Act. D soit le standard pour estimer la stabilité de transcrits [Tableau V], les résultats de Migneault et coll. suggèrent que cet inhibiteur de transcription agit sur la stabilité de l'ARNm α ENaC en inhibant des facteurs impliqués dans la déstabilisation du transcrit (207). D'ailleurs, le même phénomène a été rapporté pour l'ARNm MALAT1, c-fos et β -galactosyltransferase-1 (210-212). Sans compter que la présence d'Act. D a stabilisé l'ARNm α ENaC du système Tet-Off faisant passer sa demi-vie de 99 min à 284 min (207). Le système Tet-Off est donc un meilleur outil pour étudier la stabilité du transcrit et les mécanismes impliqués dans sa modulation.

L'analyse des CS identifiées montre une capacité de celles-ci à former une structure en tige-boucle [Figure 16]; une structure qui ajoute à la possibilité d'attachement de facteurs *trans* responsables de stabiliser ou de dégrader l'ARNm (213, 214). Sans compter que ces CS possèdent des éléments connus pour moduler l'ARNm. Les CS1 et CS3, de façon cohérente avec nos résultats, possèdent toutes les deux des GURE, des éléments qui sont connus pour être impliqués dans la dégradation de l'ARNm [Figure 15] (106, 215). Dans le cas de la CS2, elle possède une région CURE similaire à celle retrouvée dans le 3'UTR de l'ARNm eNOS [Figure

15]. Les CURE sont des séquences connues pour stabiliser le transcrit; dans le cas d'eNOS cette modulation est effectuée par le recrutement de la RBP hnRNP E1 (216, 217). Ceci est contraire au rôle déstabilisateur que nous avons observé. Par contre, il est possible que différentes combinaisons de RBP et miARN se lient à une même séquence (218-220). Ces combinaisons définiraient, plutôt que la séquence en soi, si le transcrit est stabilisé ou déstabilisé (218-220). Ces CS pourraient donc très bien avoir un impact stabilisateur ou déstabilisateur sur le messenger α ENaC en fonction de la nature des RBPs qui s'y attachent.

Des études antérieures dans notre laboratoire ont identifié différentes RBP liant le 3'UTR de l'ARNm d' α ENaC qui entraînent la déstabilisation du transcrit, lorsque surexprimées (207). Les deux plus intéressantes sont DHX36 et Tial1 (207). DHX36, aussi connu sous le nom de « RNA Helicase associated with AU-rich element » (RHAU), est une hélicase à ARN essentielle qui peut modifier la structure secondaire de l'ARN et affecter les interactions ARN-protéine qui modulent la stabilité de l'ARNm (221-224). Cette RBP est une des deux hélicases connues pour perturber des séquences G-quadruplexes (G4), des structures secondaires à quatre brins, dans l'ARN (225-229). Du coup, en utilisant *GQRS Mapper* nous avons trouvé que CS4 de même que deux autres séquences dans la région proximale du 3'UTR α ENaC détiennent des séquences associées à la formation de G4, [Figure 15] (230, 231). Il est donc possible que la CS4 recrute DHX36 pour moduler la stabilité de l'ARNm α ENaC [Figure 15] (230, 231). Cependant, il y a tout de même une possibilité que DHX36 module l'ARNm de façon indirecte tel qu'elle le fait pour PITX1 via un mécanisme possiblement miARN-dépendant (232). Il serait intéressant de voir si la déstabilisation de l'ARNm α ENaC associée à DHX36 est inhibée lorsque la RBP est surexprimée avec les différents mutants de délétions ponctuelles, en particulier le mutant CS4&5 puisque la G4 est présente dans la CS4.

La seconde protéine identifiée dans notre laboratoire, TIAL1 ou « T-cell-restricted intracellular antigen-related protein » (TIAR) s'associe particulièrement avec des ARNm possédant des AREs et des CUREs dans leur 3'UTR (233-235). Ce type d'éléments *cis* sont entre autres retrouvés dans la CS2 du 3'UTR d' α ENaC [Figure 15]. Bien que ce ne soit pas observé souvent, il est possible que cette protéine module la stabilité de l'ARNm de façon directe comme elle le fait avec l'ARNm iNOS (236). Toutefois, le rôle principal de Tial1 est de moduler la traduction, un processus lié à la formation de granules de stress (233, 237-241).

TIAL1 agit de façon indirecte sur la stabilité du messager en bloquant la traduction de celui-ci et en relocalisant ce dernier dans des granules de stress ou il favorise sa dégradation avec l'aide de DHX36 (230, 242-244). De façon similaire à DHX36, il serait intéressant de surexprimer TIAL1 en présence des différents mutants, en particulier le mutant CS2&3 vu les séquences CURE qu'elle comporte. De cette façon, nous pourrions avoir une meilleure idée de l'implication de cette RBP dans l'effet déstabilisateur des différentes CS identifiées.

Nos résultats concordent avec l'observation faite précédemment dans le laboratoire à l'aide de mutants séquentiels que le 3'UTR d' α ENaC est déstabilisateur [Figure 17, 18]. Ces mutants séquentiels étaient principalement déstabilisateurs à l'exception de la CS3 qui semblait stabiliser l'ARNm. Ceci n'est toutefois pas appuyé par le mutant de délétion CS3 de nos travaux [Figure 26] qui tout au contraire est stabilisé de façon significative par rapport au messager contenant le 3'UTR complet [Figure 25 et 26]. Les mutants de délétions ponctuels générés dans ces travaux-ci retirent spécifiquement les CS offrant une perspective plus adéquate de leur impact sur la modulation de l'ARNm α ENaC contrairement aux mutants de délétions séquentiels qui retireraient des grandes portions du 3'UTR. Il était donc difficile, avec ces derniers, d'attribuer la stabilisation/déstabilisation observée uniquement aux CS. D'autres séquences que les CS jouent également un rôle dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC.

Tableau V. Estimation de la demi-vie de l'ARNm α ENaC dans différentes études

Auteur	Méthode	Type cellulaire	Demi-vie (heures)
Migneault, F (207)	Tet-Off Dox 1 μ g/mL	Cellules épithéliales alvéolaires de rat	~ 1.5
Migneault, F (207)	Tet-Off Act D 5 μ g/mL	Cellules épithéliales alvéolaires de rat	~ 4.7
Zentner, MD (245)	Act D 5 μ g/mL	Cellules parotidiennes de rat	8
Otulakowski, G (246)	Act D 5 μ g/mL	Cellules épithéliales du poumon distal foetal	22
Mick, VE (247)	Act D 1 μ M	Cellules MDCK-C7 (rein)	14
Itani, OA (248)	Act D 1 μ M	Cellules MDCK-C7 (rein)	9
Dagenais, A (249)	Act D 5 μ g/mL	Cellules épithéliales alvéolaires de rat	15
Mustafa, SB (250)	Act D 1 μ M	Cellules SMG-C6 (glande submandibulaire)	17

La modulation de l'expression génique et protéique d' α ENaC a été étudiée par plusieurs groupes (58, 251-254). En effet plusieurs mécanismes ont été mis en évidence au sujet de son expression protéique, de l'activité du canal à la membrane cellulaire, de son activation par clivage protéolytique ainsi que tous les mécanismes régulant la dégradation et le recyclage du canal (42, 43, 62, 66, 81-84, 92-97). De plus, la modulation de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires a été extensivement étudiée dans diverses conditions de stress physiopathologique (84, 176, 181, 195, 255-257). Cependant, vu que les études faites avec l'Act. D démontraient une très longue demi-vie (>10h), il n'y a jamais eu de véritable intérêt à

étudier les mécanismes impliqués dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC [Tableau V] (207). Avec la courte demi-vie rapportée dans nos travaux, il devient beaucoup plus intéressant de porter une attention particulière à la stabilité [Tableau V] (207). En effet, la modulation de la stabilité pourrait entre autres expliquer la diminution rapide et importante (75% en 4h) de l'expression de l'ARNm α ENaC dans un modèle de lésion pulmonaires induites par l'ischémie reperfusion (205).

Nos résultats attribuent un impact déstabilisateur aux différentes CS identifiées du 3'UTR dans la modulation de l'ARNm α ENaC. On comprend donc qu'au travers l'évolution, le 3'UTR de l'ARNm α ENaC a conservé des séquences dans le 3'UTR permettant de moduler rapidement à la baisse le niveau de transcrite α ENaC. Dans le contexte du SDRA, ces séquences jouent un rôle délétère en diminuant l'expression de ENaC et en diminuant la capacité à résorber l'œdème pulmonaire.

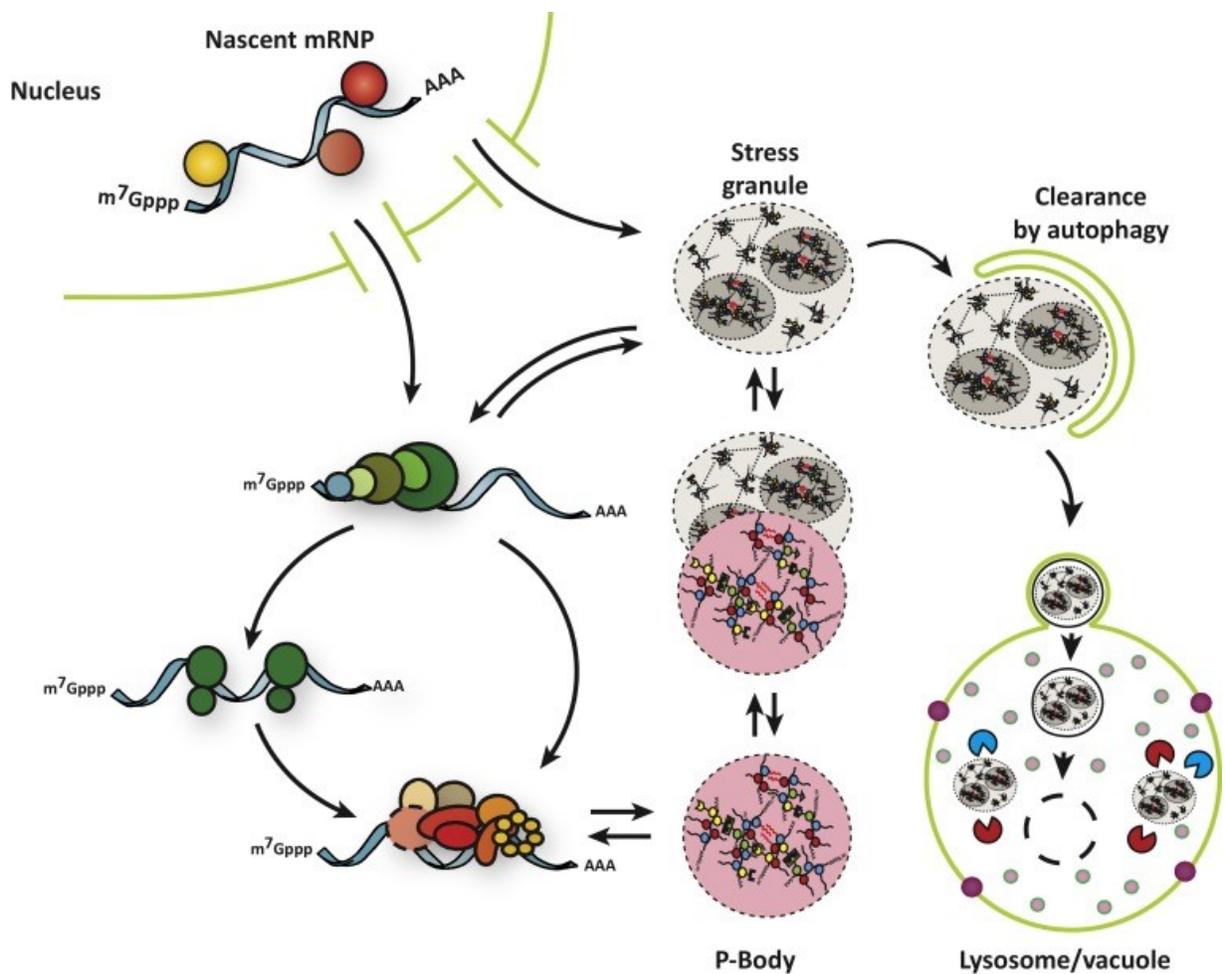
5.2 Impact des séquences conservées du 3'UTR dans la stabilité de l'ARNm α ENaC en condition inflammatoire

Le TNF- α est une partie intégrale de la réponse inflammatoire du SDRA qui induit un stress aux cellules épithéliales alvéolaires (193). Cette cytokine pro-inflammatoire est d'ailleurs connue pour diminuer l'expression des messagers et l'expression protéique des trois sous-unités ENaC (193, 198). Des travaux antérieurs dans le laboratoire ont montré une corrélation directe entre le niveau d'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires traitées au TNF- α et le courant ENaC trouvé dans ces cellules (193). Le TNF- α agit en diminuant l'activité transcriptionnelle du promoteur, mais implique également une modulation post-transcriptionnelle de la stabilité de l'ARNm α ENaC (193, 198). Les structures en tiges-boucles formées par les CS que nous avons identifiées [Figure 16] pourraient donc potentiellement favoriser l'attachement d'éléments *trans* déstabilisateurs (99, 258, 259). C'est pour cette raison que nous avons testé si les différents mutants CS pouvaient affecter le mécanisme de déstabilisation rapide de l'ARNm α ENaC observé en condition inflammatoire lorsque les cellules sont traitées avec le TNF- α .

Suite au prétraitement TNF- α , l'ARNm α ENaC avec son 3'UTR complet et le mutant CS1-CS5 arborent une courbe de dégradation surprenante [Figure 25 et 26]. Il s'agit d'une courbe biphasique où la dégradation semble se faire en deux phases : la première est caractérisée par une dégradation rapide et la seconde par un plateau où la dégradation semble stagner [Figure 26]. Une possibilité qui pourrait expliquer la forme de cette courbe de dégradation serait que le TNF- α agit via un mécanisme d'activation biphasique d'NF- κ B (260-265). Ce dernier est un facteur de transcription responsable de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune et inflammatoire en plus d'un amalgame de facteur *trans* pouvant potentiellement moduler la stabilité d'ARNm (266-270). Ce type d'activation biphasique a été répertorié à plusieurs reprises et n'est pas de type cellulaire ou stimuli spécifique (260-265). Il ne semble pas être limité à un seul mécanisme de régulation (260-265). L'activation biphasique de NF- κ B a aussi été détectée dans le muscle squelettique de rat en réponse à une ischémie-reperfusion (271). La durée de ces phases serait dépendante de l'expression d'I κ B α et d'I κ B β , deux protéines régulées à la baisse avec persistance par TNF- α (260, 261, 265). La dégradation de ces protéines libère le facteur de transcription qui peut alors se déplacer au noyau et stimuler la transcription de nombreux gènes dont I κ B α (265). Le TNF- α activerait donc de façon transitoire NF- κ B qui atteindrait son pic d'activité rapidement et serait aussi rapidement désactivé en fonction de la vitesse de dégradation et de resynthèse I κ B α (265). La seconde phase d'activation se produirait un peu plus tard et serait plus soutenue, s'étendant sur des périodes pouvant aller jusqu'à 48h suivant la stimulation initiale au TNF- α (260, 261, 265). De plus, le TNF- α induit initialement des transcrits majoritairement instables, mais devient progressivement dominé par des transcrits très stables (272). Il serait donc pertinent de vérifier si la courbe de dégradation de l'ARNm α ENaC en présence de TNF reprendrait une dégradation plus soutenue à des temps plus longs (par exemple 4-16h). Du coup, il serait intéressant de voir si le type cellulaire utilisé dans le cadre de nos travaux répond aussi au TNF- α selon une courbe d'activation biphasique d'NF- κ B qui corrèlerait potentiellement avec la courbe de dégradation du messager α ENaC en présence de TNF- α .

Une autre possibilité qui expliquerait la courbe de dégradation biphasique observée serait la présence de deux populations distinctes d'ARNm α ENaC [Figure 25 et 26]. Une première dont le TNF- α fait chuter la stabilité rapidement et une seconde qui serait protégée contre la

dégradation. Cette dernière servirait probablement à être rapidement mobilisée par la cellule lorsque celle-ci sera prête à reprendre la traduction. Il serait intéressant d'évaluer cette hypothèse avec une technique telle que l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) pour l'ARNm α ENaC à différents temps (273, 274). Peut-être les transcrits se regroupent-ils selon la population à laquelle ils appartiennent pour être protégé ou dégradé, dans des granules de stress (SG) ou des « Processing bodies » (PB) par exemple [Figure 29] (273-275). Ce sont tous les deux des granules cytoplasmiques de ribonucléoprotéines messagères (mRNP) se formant à partir d'ARNm non traduit lorsque la cellule est soumise à un stress (244, 276, 277). Les SG sont des compartiments qui se forment à partir d'ARNm dont la traduction est arrêtée à l'initiation (244, 276, 277). Ils contiennent le complexe de pré-initiation 48S, divers facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3), la protéine PABP, une variété de RBP, ainsi que de nombreuses protéines ne se liant pas à l'ARN (244, 276, 277). Les SG se forment principalement pour protéger l'ARNm endogène contre la dégradation précoce entraînée par un stress (278, 279). Le TNF- α a d'ailleurs montré une capacité à augmenter de façon significative la formation de SG via la phosphorylation de eIF-2 α et l'arrêt de la traduction de Hsp70 par le recrutement du partenaire protéique de TIAL1, TIA1, qui se fixe au 3'UTR d'Hsp70 (280). À l'opposé, les PB sont généralement associés à la dégradation de l'ARNm, malgré la présence d'évidences où l'ARNm peut être retourné à l'initiation de sa traduction (278, 279). Ces compartiments cytoplasmiques contiennent des ARNm associés à des répresseurs de traduction ainsi que la machinerie de désintégration de l'ARNm (242, 275, 276). L'ARNm à l'intérieur des PB peut se voir retirer sa coiffe ou être dégradé (242, 275, 276). Il existe un équilibre dynamique entre les SG et les PB où elles peuvent s'échanger du contenu, être remodelées et de cette façon permettre une transition rapide entre la traduction active, la protection et la dégradation de l'ARNm (242, 275, 276, 279).



Trends in Cell Biology

Figure 28. Équilibre dynamique entre les granules de stress et les « processing bodies » (276)

Contrairement à nos attentes, les CS identifiées du 3'UTR α ENaC n'ont aucun impact discernable dans la modulation de l'ARNm en présence de TNF- α dans des cellules épithéliales alvéolaires. L'évidence de ceci est notable lorsque la courbe de dégradation en présence de TNF- α du mutant CS1-CS5 est comparée à celle du 3'UTR complet [Figure 25 et 26]. Le mutant de délétion ponctuelle CS1-CS5, bien qu'il n'ait aucune des CS identifiées, présente la même courbe de dégradation biphasique que le messager possédant son 3'UTR complet [Figure 25 et 26].

Dans la portion rapide de la dégradation ($t=30$), l'expression du messager possédant son 3'UTR complet chute de 80% en conditions basales à 56% en présence de TNF- α [Figure 27]. La même chose se produit chez le mutant CS1-CS5 où les niveaux chutent de 83 à 54%, des niveaux qui ne sont pas significativement différents du complet [Figure 27]. Bien que la différence entre le niveau d'expression en condition basale versus en présence de TNF- α ne soit pas significatif pour le mutant, ceci pourrait simplement être causé par un manque de puissance statistique [Figure 27]. Pour y remédier, l'échantillonnage du mutant CS1-CS5 pourrait être augmenté de 4 à 6, de cette façon le pouvoir statistique passerait de 98.5% à 99.9% (281). Il y aurait donc moins de chance de se tromper. De plus, dans la seconde phase de la courbe de dégradation de l'ARNm possédant le 3'UTR complet, le niveau d'expression se stabilise rapidement à environ 48% de l'expression du contrôle ($t=0$) [Figure 25 et 26]. Ce plateau n'est pas significativement différent de celui atteint par le mutant CS1-CS5 qui se stabilise à 42% [Figure 26]. Il est donc évident que d'autres séquences du 3'UTR jouent un rôle dans la stabilisation/déstabilisation du messager.

L'Act. D inhiberait la transcription des facteurs *trans* déstabilisateurs tels que les miARN et les RBP qui découlent de la présence de TNF- α (193, 207). L'effet stabilisateur de l'Act. D et sa capacité à bloquer la déstabilisation entraînée par le TNF- α suggèrent donc que la cytokine en question agit au niveau des facteurs *trans* recrutés par le messager (193, 207). Ceux-ci seraient responsables du jeu de stabilisation/déstabilisation du messager. Cependant, ces facteurs *trans* associés au TNF- α n'interagissent pas forcément avec les CS identifiés. Ils pourraient moduler la stabilité du messager via d'autres séquences du 3'UTR.

Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer avec certitude la raison pour laquelle les CS identifiées dans le 3'UTR d' α ENaC n'ont pas d'impact sur la modulation de la stabilité de l'ARNm en présence de TNF- α . Une possibilité est que l'emploi de mutants de délétions ne soit pas la meilleure méthode pour étudier l'impact des CS sur la modulation de la stabilité de l'ARNm en présence de TNF- α . L'ARNm forme des structures secondaires et possède une conformation tridimensionnelle qui peuvent favoriser le recrutement de facteurs *trans* pour moduler sa stabilité (282-290). Certains facteurs *trans* comme Xlrbpa-2 chez *Xenopus laevis*, Staufen chez *Drosophila melanogaster* ou Rnt1p dans la levure se lient à des structures en particulier (291-294). Nous devons donc envisager la possibilité qu'en retirant les différentes

CS identifiées, les structures secondaires et tertiaires de l'ARNm changent et que le profil de facteurs *trans* se liant au messenger, ainsi que la courbe de dégradation du transcrit, soit altéré (282-290). Une autre méthode pour vérifier si les CS sont impliquées dans l'impact du TNF- α sur la modulation de la stabilité serait d'isoler les protéines liant les différents mutants de délétion ainsi que celles liant le 3'UTR complet en présence de TNF- α , par chromatographie d'affinité et de les identifier par spectrométrie de masse. De cette façon les profils des RBP se liant à ces différentes versions du 3'UTR pourraient être comparés entre eux pour vérifier quelles protéines sont moins présentes ou tout simplement absentes lors du retrait des différentes CS. Nous pourrions alors établir quelles RBP lient les différentes CS et contribuent à la déstabilisation du messenger.

Aucun miARN se liant au 3'UTR du messenger α ENaC n'a encore été identifié dans la littérature, il serait intéressant de tenter d'en identifier puisque certains miARNs pourraient être responsable de la chute du messenger observée en présence du TNF- α . Une recherche sur *TargetScan* n'a pas permis d'identifier de miARN liant le 3'UTR du messenger α ENaC. Cependant, ceci ne signifie pas qu'aucun miARN n'interagit avec celui-ci. Des miARN sont continuellement découverts et leur potentielle interaction avec le 3'UTR du messenger α ENaC devrait être extensivement étudiée.

Dans le SDRA, quatre miARN ont été identifiés pour leur action sur l'expression d'ENaC (295) [29]. Toutefois, ils n'agissent pas sur le messenger directement (295). miR-21, trouvé en forte quantité dans les poumons et sérum de patient SDRA, diminue l'expression de la protéine et du messenger de γ ENaC via la voie de signalisation PTEN/Akt dans le modèle de rat SDRA induit par les LPS (295, 296). Dans des cellules épithéliales A549, miR-7-5p régule l'expression d'ENaC via la voie mTORC2/SGK-1 (295, 297). Le troisième miARN, miR-16, dans des cellules A549 cible SERT (295, 298). La diminution de celui-ci entraîne une augmentation de l'expression de β ENaC en présence de sérotonine (5-HT) (295, 298). De plus miR-16 induit aussi une hausse de l'expression d'ENaC via une diminution significative de TGF- β 1 (295, 298). C'est aussi le seul miARN à avoir montré une action avec le 3'UTR du messenger de la sous-unité β (295, 298). Dans le cas de miR-126-5p, il agit directement sur le 3'UTR du transcrit de VEGFA (299). En diminuant l'expression de VEGFA, miR-126-5p

atténue la diminution de l'expression d'ENaC et de AQP1 par les LPS dans des ATII murins (295, 299).

Nous n'arrivons pas expliquer ce qui se produit au niveau de la forme des courbes de dégradation en présence de TNF- α pour les autres mutants. Le mutant CS3+ montre que la CS3 peut diminuer significativement la dégradation précoce observée à 30 min dans le mutant CS1-CS5. Ceci lui attribuerait donc un rôle stabilisateur, cependant le mutant CS3 n'a aucun effet sur la chute à 30 min. De plus, le mutant CS2&3 stabilise la chute induite par la cytokine donc l'absence d'une CS2 fonctionnelle pourrait inhiber la dégradation puisque CS3 n'a aucun impact. Pour évaluer le rôle de CS2 avec plus de précision, d'autres expériences devraient être faites en créant un mutant CS2 pour évaluer son impact indépendamment de CS3. Les courbes de dégradation des mutants de délétion permettent d'apprécier la complexité des mécanismes qui modulent la stabilité de l'ARNm [Figure 26].

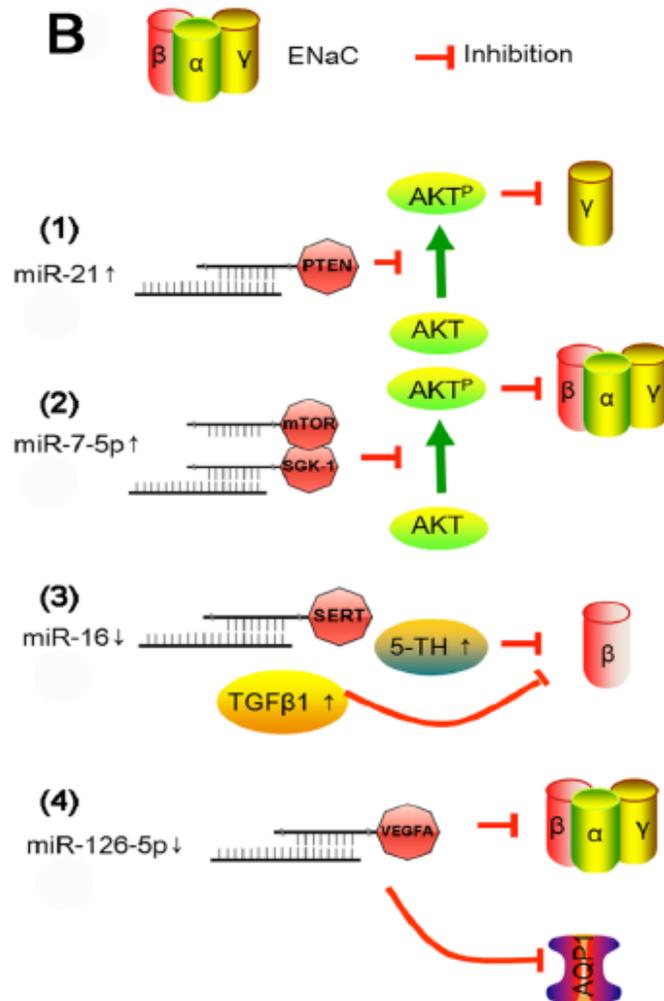


Figure 29. Mécanisme de régulation d'ENaC par les miARNs connus (295)

Globalement, les CS identifiées du 3'UTR α ENaC n'ont aucun impact dans la modulation de l'ARNm en présence de TNF- α dans des cellules épithéliales alvéolaires de rat. Par contre, nous avons montré qu'il existe une modulation très fine et complexe de stabilisation et déstabilisation qui est effectuée par les CS identifiées, mais que d'autres régions sont également impliquées. Ceci nous permet donc de supposer que cette cytokine pro-inflammatoire affecte la stabilité de cet ARNm via l'emploi de facteurs *trans* agissant sur d'autres séquences que celles identifiées. Bien que nous ayons établi le rôle des CS que nous avons identifié dans le 3'UTR de l'ARNm α ENaC comme étant déstabilisateur, nous avons pu éliminer un rôle de celles-ci dans la régulation négative du transcrit en présence de TNF- α . Cependant, ceci

n'empêche pas qu'elles aient un rôle dans la régulation négative d' α ENaC par une autre cytokine ou même un autre stress pathophysiologique.

Chapitre 6 : Conclusion

Les résultats présentés dans ce mémoire permettent de mieux apprécier la complexité de la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC en conditions basales ainsi qu'en présence de TNF- α . La création de mutants de délétions ponctuels jumelée à un système Tet-Off a permis de mesurer la demi-vie associée à l'ARNm V5- α ENaC en présence et en absence des différentes CS identifiées. De cette façon, un rôle déstabilisateur a pu être associé à toutes les CS puisque leur délétion entraînait, dans tous les cas, une hausse de la demi-vie par rapport au 99 min du messenger contenant le 3'UTR complet. Un rôle de ces CS dans la chute du messenger α ENaC entraîné par le TNF- α a toutefois été écarté puisque la délétion de toutes les CS n'a aucun impact sur la dégradation de messenger par rapport à lorsqu'elles sont présentes en présence de TNF- α .

La génération des différents mutants nécessitait l'utilisation d'amorces pour la mutagenèse dirigée; celles-ci comportaient cependant toutes une extension de trois nucléotides pour assurer leur stabilité. Il est donc possible que ces modifications à la séquence, tout comme l'ajout de l'épitope V5, altèrent la modulation de la stabilité du messenger endogène par rapport au messenger exogène. Sans compter qu'il est possible que les messagers endogènes et exogènes interagissent ensemble. De plus, notre modèle expérimental est hautement dépendant de la transfection des plasmides dans nos cellules ainsi que de la différenciation de celles-ci en culture.

Les RBP et les miARN liant le 3'UTR, que ce soit par les CS que nous avons identifiés ou via d'autres séquences, doivent continuer d'être exploré pour mieux comprendre les mécanismes qui entraînent la chute de stabilité de l'ARNm α ENaC en conditions pro-inflammatoires. Bien que le TNF- α demeure une cytokine intéressante pour l'étude de ces conditions inflammatoires, elle n'est pas l'unique cytokine impliquée dans le SDRA. D'autres cytokines, comme le TGF- β 1, IL-1 β , IL-4 ou IL-13, devraient être extensivement étudiées individuellement ainsi que dans un mélange (dans un cytomix par exemple) de sorte à mieux représenter *in vitro* les conditions inflammatoires retrouvées dans le SDRA. Éventuellement, l'objectif serait d'explorer le rôle potentiel des CS ou du 3'UTR de l'ARNm α ENaC dans un modèle *in vivo*. En étudiant plus extensivement les mécanismes modulant la stabilité du messenger α ENaC en conditions pro-inflammatoires nous serons mieux outillés pour comprendre

comment l'appareil respiratoire répond à ces stress pathophysiologiques et par le fait même mieux outillé pour tenter de rapidement rétablir la clairance liquidienne chez les patients atteints du SDRA.

Bibliographie

1. Ionescu CM, SpringerLink (Service en ligne). *The Human Respiratory System : An Analysis of the Interplay between Anatomy, Structure, Breathing and Fractal Dynamics*. London: Springer London : Imprint: Springer; 2013.
2. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth*. 2015;59(9):533-41.
3. Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(1):67-74.
4. Cauberghs M, Van de Woestijne KP. Mechanical properties of the upper airway. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1983;55(2):335-42.
5. Shusterman D. Review of the upper airway, including olfaction, as mediator of symptoms. *Environ Health Perspect*. 2002;110 Suppl 4:649-53.
6. Baraniuk JN, Merck SJ. New concepts of neural regulation in human nasal mucosa. *Acta Clin Croat*. 2009;48(1):65-73.
7. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):210-29.
8. Fokkens WJ, Scheeren RA. Upper airway defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev*. 2000;1(4):336-41.
9. Elad D, Wolf M, Keck T. Air-conditioning in the human nasal cavity. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008;163(1-3):121-7.
10. Sahin-Yilmaz A, Baroody FM, DeTineo M, Cuttance G, Makinson D, Pinto JM, et al. Effect of changing airway pressure on the ability of the human nose to warm and humidify air. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(7):501-5.
11. Fraser RS. Histology and gross anatomy of the respiratory tract. *Physiologic Basis of Respiratory Disease*. 2005:1-14.
12. Betts JG, College O, Desaix P, Johnson JE, Johnson EW, Korol O, et al. *Anatomy and Physiology: OpenStax College*; 2013.
13. Herring MJ, Putney LF, Wyatt G, Finkbeiner WE, Hyde DM. Growth of alveoli during postnatal development in humans based on stereological estimation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(4):L338-44. Epub 2014/06/08.
14. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(1):120-4. Epub 2003/09/27.
15. Thurlbeck WM. Postnatal human lung growth. *Thorax*. 1982;37(8):564-71. Epub 1982/08/01.
16. Butler JP, Tsuda A. Transport of gases between the environment and alveoli--theoretical foundations. *Compr Physiol*. 2011;1(3):1301-16. Epub 2011/07/01.
17. Frohlich E, Mercuri A, Wu S, Salar-Behzadi S. Measurements of Deposition, Lung Surface Area and Lung Fluid for Simulation of Inhaled Compounds. *Front Pharmacol*. 2016;7:181. Epub 2016/07/23.
18. Federle MP, Rosado-de-Christenson ML, Raman SP, Carter BW, Woodward PJ, Shaaban AM. *Imaging Anatomy: Chest, Abdomen, Pelvis E-Book: Elsevier Health Sciences*; 2016.

19. SK Jindal PSSSRDG. Textbook of Pulmonary and Critical Care Medicine Vols 1 and 2: Jaypee Brothers, Medical Publishers; 2011.
20. Parent RA. Comparative biology of the normal lung. Second edition. ^e éd. London, UK: Academic Press; 2015. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124045774> Accès réservé UdeM
21. Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers*. 2013;1(4):e24997.
22. Godfrey RW. Human airway epithelial tight junctions. *Microsc Res Tech*. 1997;38(5):488-99.
23. Williams AE. Immunology: Mucosal and Body Surface Defences: Wiley; 2011.
24. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol*. 2004;164(2):577-88.
25. Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*. 2003;171(2):1051-60.
26. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(1):1-4.
27. Buckpitt A, Chang AM, Weir A, Van Winkle L, Duan X, Philpot R, et al. Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. *Mol Pharmacol*. 1995;47(1):74-81.
28. Van Scott MR, Davis CW, Boucher RC. Na⁺ and Cl⁻ transport across rabbit nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells. *Am J Physiol*. 1989;256(4 Pt 1):C893-901.
29. Linnoila RI. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Invest*. 2006;86(5):425-44.
30. Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen MH, Chuang PT. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17531-6.
31. Berthiaume Y, Voisin G, Dagenais A. The alveolar type I cells: the new knight of the alveolus? *J Physiol*. 2006;572(Pt 3):609-10.
32. Chen J, Chen Z, Chintagari NR, Bhaskaran M, Jin N, Narasaraju T, et al. Alveolar type I cells protect rat lung epithelium from oxidative injury. *J Physiol*. 2006;572(Pt 3):625-38.
33. Dobbs LG, Johnson MD. Alveolar epithelial transport in the adult lung. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;159(3):283-300.
34. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*. 1982;126(2):332-7.
35. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology*. 2006;11 Suppl:S12-5.
36. Ridsdale R, Na CL, Xu Y, Greis KD, Weaver T. Comparative proteomic analysis of lung lamellar bodies and lysosome-related organelles. *PLoS One*. 2011;6(1):e16482.
37. Schmitz G, Muller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res*. 1991;32(10):1539-70.
38. Weaver TE, Na CL, Stahlman M. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(4):263-70.

39. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(11):2568-73.
40. Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, et al. Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(4):L658-67.
41. Matalon S, Bartoszewski R, Collawn JF. Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309(11):L1229-38.
42. Berthiaume Y, Matthay MA. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(3):350-9.
43. Dagenais A, Boncoeur E, Berthiaume Y. [Na⁺ Transport in the lungs: differential impact of ENaC in the airways and alveoli]. *Med Sci (Paris).* 2009;25(10):815-20. Transport du Na⁺ dans les poumons : impact différentiel du canal ENaC dans les voies aériennes et les alvéoles.
44. Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(3):324-30.
45. Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:174306.
46. Hastings RH, Folkesson HG, Matthay MA. Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(4):L679-89.
47. Helenius IT, Dada LA, Sznajder JI. Role of ubiquitination in Na,K-ATPase regulation during lung injury. *Proc Am Thorac Soc.* 2010;7(1):65-70.
48. Morth JP, Poulsen H, Toustrup-Jensen MS, Schack VR, Egebjerg J, Andersen JP, et al. The structure of the Na⁺,K⁺-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364(1514):217-27.
49. Azzam ZS, Sznajder JI. Lung Edema Clearance: Relevance to Patients with Lung Injury. *Rambam Maimonides Med J.* 2015;6(3).
50. Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV. The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol.* 1986;376:321-40.
51. Dagenais A, Kothary R, Berthiaume Y. The alpha subunit of the epithelial sodium channel in the mouse: developmental regulation of its expression. *Pediatr Res.* 1997;42(3):327-34.
52. Jain L, Eaton DC. Physiology of fetal lung fluid clearance and the effect of labor. *Semin Perinatol.* 2006;30(1):34-43.
53. Hooper SB, Polglase GR, Roehr CC. Cardiopulmonary changes with aeration of the newborn lung. *Paediatr Respir Rev.* 2015;16(3):147-50.
54. Hillman NH, Kallapur SG, Jobe AH. Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clin Perinatol.* 2012;39(4):769-83.
55. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 1996;12(3):325-8.
56. Robertson PA, Sniderman SH, Laros RK, Jr., Cowan R, Heilbron D, Goldenberg RL, et al. Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(6 Pt 1):1629-41; discussion 41-5.

57. Helve O, Pitkanen OM, Andersson S, O'Brodivich H, Kirjavainen T, Otulakowski G. Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics*. 2004;113(5):1267-72.
58. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 2016;579(2):95-132.
59. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev*. 2002;82(3):735-67.
60. Ji HL, Zhao RZ, Chen ZX, Shetty S, Idell S, Matalon S. delta ENaC: a novel divergent amiloride-inhibitable sodium channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(12):L1013-26.
61. Giraldez T, Rojas P, Jou J, Flores C, Alvarez de la Rosa D. The epithelial sodium channel delta-subunit: new notes for an old song. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(3):F328-38.
62. Butterworth MB. Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(12):1166-77.
63. Stewart AP, Haerteis S, Diakov A, Korbmacher C, Edwardson JM. Atomic force microscopy reveals the architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem*. 2011;286(37):31944-52.
64. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994;367(6462):463-7.
65. Konstas AA, Korbmacher C. The gamma-subunit of ENaC is more important for channel surface expression than the beta-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):C447-56. Epub 2003/01/17.
66. Schild L. The epithelial sodium channel and the control of sodium balance. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(12):1159-65.
67. Trac PT, Thai TL, Linck V, Zou L, Greenlee M, Yue Q, et al. Alveolar nonselective channels are ASIC1a/alpha-ENaC channels and contribute to AFC. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;312(6):L797-L811.
68. Jain L, Chen XJ, Malik B, Al-Khalili O, Eaton DC. Antisense oligonucleotides against the alpha-subunit of ENaC decrease lung epithelial cation-channel activity. *Am J Physiol*. 1999;276(6 Pt 1):L1046-51.
69. Dagenais A, Gosselin D, Guilbault C, Radzioch D, Berthiaume Y. Modulation of epithelial sodium channel (ENaC) expression in mouse lung infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Res*. 2005;6:2.
70. Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J*. 1998;17(2):344-52.
71. Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO, Foskett JK, Kleyman TR. Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem*. 1998;273(22):13469-74.
72. Anantharam A, Palmer LG. Determination of epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry from single-channel conductances. *J Gen Physiol*. 2007;130(1):55-70.
73. Dijkink L, Hartog A, van Os CH, Bindels RJ. The epithelial sodium channel (ENaC) is intracellularly located as a tetramer. *Pflugers Arch*. 2002;444(4):549-55.
74. Snyder PM, Cheng C, Prince LS, Rogers JC, Welsh MJ. Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem*. 1998;273(2):681-4.

75. Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM. Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* 1999;274(38):27281-6.
76. Stockand JD, Staruschenko A, Pochynyuk O, Booth RE, Silverthorn DU. Insight toward epithelial Na⁺ channel mechanism revealed by the acid-sensing ion channel 1 structure. *IUBMB Life.* 2008;60(9):620-8.
77. Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature.* 2009;460(7255):599-604.
78. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature.* 2007;449(7160):316-23.
79. McNicholas CM, Canessa CM. Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *J Gen Physiol.* 1997;109(6):681-92.
80. Fyfe GK, Canessa CM. Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel. *J Gen Physiol.* 1998;112(4):423-32.
81. Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T, Gerber AP. Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(5):798-813.
82. Taylor MR, Campbell NA. *Biology: Study Guide: Pearson/Benjamin Cummings; 2005.*
83. Pochynyuk O, Bugaj V, Stockand JD. Physiologic regulation of the epithelial sodium channel by phosphatidylinositides. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(5):533-40.
84. Bardou O, Prive A, Migneault F, Roy-Camille K, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(7):1682-90.
85. Otulakowski G, Rafii B, Harris M, O'Brodovich H. Oxygen and glucocorticoids modulate alphaENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(2):204-12.
86. Killick R, Richardson G. Isolation of chicken alpha ENaC splice variants from a cochlear cDNA library. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1350(1):33-7.
87. Tucker JK, Tamba K, Lee YJ, Shen LL, Warnock DG, Oh Y. Cloning and functional studies of splice variants of the alpha-subunit of the amiloride-sensitive Na⁺ channel. *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 1):C1081-9.
88. Chraïbi A, Verdumo C, Merrillat AM, Rossier BC, Horisberger JD, Hummler E. Functional analyses of a N-terminal splice variant of the alpha subunit of the epithelial sodium channel. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(3):115-22.
89. Shehata MF. Characterization of the epithelial sodium channel alpha subunit coding and non-coding transcripts and their corresponding mRNA expression levels in Dahl R versus S rat kidney cortex on normal and high salt diet. *Int Arch Med.* 2009;2(1):5.
90. Li XJ, Xu RH, Guggino WB, Snyder SH. Alternatively spliced forms of the alpha subunit of the epithelial sodium channel: distinct sites for amiloride binding and channel pore. *Mol Pharmacol.* 1995;47(6):1133-40.
91. Shehata MF. Regulation of the epithelial sodium channel [ENaC] in kidneys of salt-sensitive Dahl rats: insights on alternative splicing. *Int Arch Med.* 2009;2(1):28.
92. Caohuy H, Jozwik C, Pollard HB. Rescue of DeltaF508-CFTR by the SGK1/Nedd4-2 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2009;284(37):25241-53.
93. Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology.* 2005;146(12):5079-85.

94. Oberfeld B, Ruffieux-Daidie D, Vitagliano JJ, Pos KM, Verrey F, Staub O. Ubiquitin-specific protease 2-45 (Usp2-45) binds to epithelial Na⁺ channel (ENaC)-ubiquitylating enzyme Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(1):F189-96.
95. Zhou R, Tomkovicz VR, Butler PL, Ochoa LA, Peterson ZJ, Snyder PM. Ubiquitin-specific peptidase 8 (USP8) regulates endosomal trafficking of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem*. 2013;288(8):5389-97.
96. Staruschenko A, Nichols A, Medina JL, Camacho P, Zheleznova NN, Stockand JD. Rho small GTPases activate the epithelial Na⁽⁺⁾ channel. *J Biol Chem*. 2004;279(48):49989-94.
97. Kashlan OB, Kleyman TR. Epithelial Na⁽⁺⁾ channel regulation by cytoplasmic and extracellular factors. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):1011-9.
98. Eaton DC, Malik B, Bao HF, Yu L, Jain L. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7(1):54-64.
99. Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*. 2012;9(5):563-76.
100. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. 2002;3(3):REVIEWS0004.
101. Chen CY, Chen ST, Juan HF, Huang HC. Lengthening of 3'UTR increases with morphological complexity in animal evolution. *Bioinformatics*. 2012;28(24):3178-81.
102. Grzybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA. Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(2):291-5.
103. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(21):3613-34.
104. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*. 2005;33(22):7138-50.
105. Vlasova IA, Tahoe NM, Fan D, Larsson O, Rattenbacher B, Sternjohn JR, et al. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell*. 2008;29(2):263-70.
106. Vlasova IA, Bohjanen PR. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol*. 2008;5(4):201-7.
107. Pullmann R, Jr., Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Yang X, et al. Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol Cell Biol*. 2007;27(18):6265-78.
108. Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, Willis AE. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 4):641-7.
109. Hui J, Reither G, Bindereif A. Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA*. 2003;9(8):931-6.
110. Lee DH, Lim MH, Youn DY, Jung SE, Ahn YS, Tsujimoto Y, et al. hnRNP L binds to CA repeats in the 3'UTR of bcl-2 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382(3):583-7. Epub 2009/03/21.
111. Kaestle SM, Reich CA, Yin N, Habazettl H, Weimann J, Kuebler WM. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(4):L859-69.

112. Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadasz I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, et al. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(25):E2308-16.
113. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373(9678):1891-904.
114. Zvereff VV, Faruki H, Edwards M, Friedman KJ. Cystic fibrosis carrier screening in a North American population. *Genet Med*. 2014;16(7):539-46.
115. Tsui LC, Dorfman R. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(2):a009472.
116. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical biochemistry*. 2012;45(15):1132-44. Epub 2012/06/16.
117. Linsdell P. Functional architecture of the CFTR chloride channel. *Mol Membr Biol*. 2014;31(1):1-16.
118. Horsley A, Cunningham S, Innes JA. *Cystic Fibrosis*: Oxford University Press; 2015.
119. Guggino WB, Stanton BA. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(6):426-36.
120. Clunes MT, Boucher RC. Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2007;4(2):63-72.
121. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*. 2007;58:157-70.
122. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(12):841-51.
123. Chambers LA, Rollins BM, Tarran R. Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;159(3):256-70.
124. Cohen-Cymbarknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax*. 2013;68(12):1157-62.
125. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Jr., Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(10):957-69.
126. Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, et al. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med*. 2008;10(12):851-68.
127. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2017;377(19):1904-5.
128. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:147-63.
129. Schwarz MA. Acute lung injury: cellular mechanisms and derangements. *Paediatr Respir Rev*. 2001;2(1):3-9.
130. Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax*. 1999;54(2):150-60.
131. Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Med Wkly*. 2003;133(43-44):586-90.
132. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1334-49.

133. Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(4):243-52.
134. Villar J, Blanco J, Kacmarek RM. Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care.* 2016;22(1):1-6.
135. Villar J. What is the acute respiratory distress syndrome? *Respir Care.* 2011;56(10):1539-45.
136. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2(7511):319-23.
137. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med.* 1994;20(3):225-32.
138. Flori HR, Glidden DV, Rutherford GW, Matthay MA. Pediatric acute lung injury: prospective evaluation of risk factors associated with mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(9):995-1001.
139. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(4):319-27.
140. Amigoni A, Pettenazzo A, Stritoni V, Circelli M. Surfactants in Acute Respiratory Distress Syndrome in Infants and Children: Past, Present and Future. *Clin Drug Investig.* 2017;37(8):729-36.
141. Fioretto JR, Carvalho WB. Temporal evolution of acute respiratory distress syndrome definitions. *J Pediatr (Rio J).* 2013;89(6):523-30.
142. Dager S, Le Bourgeois F, Guichoux J, Brissaud O. Syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'enfant : évolution de la définition et nouveautés de la conférence de consensus pédiatrique. *Journal Européen des Urgences et de Réanimation.* 2017;29(2):100-6.
143. Umbrello M, Formenti P, Bolgiaghi L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1).
144. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307(23):2526-33.
145. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2731-40.
146. Confalonieri M, Salton F, Fabiano F. Acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144).
147. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis.* 2013;5(3):326-34.
148. Riviello ED, Kiviri W, Twagirumugabe T, Mueller A, Banner-Goodspeed VM, Officer L, et al. Hospital Incidence and Outcomes of the Acute Respiratory Distress Syndrome Using the Kigali Modification of the Berlin Definition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(1):52-9.
149. Kwizera A, Dünser MW. A Global Perspective on Acute Respiratory Distress Syndrome and the Truth about Hypoxia in Resource-limited Settings. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2016;193(1):5-7.
150. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet.* 2010;376(9749):1339-46.

151. Pham T, Rubenfeld GD. Fifty Years of Research in ARDS. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome. A 50th Birthday Review. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(7):860-70.
152. Sigurdsson MI, Sigvaldason K, Gunnarsson TS, Moller A, Sigurdsson GH. Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2013;57(1):37-45.
153. Gohil SK, Cao C, Phelan M, Tjoa T, Rhee C, Platt R, et al. Impact of Policies on the Rise in Sepsis Incidence, 2000-2010. *Clin Infect Dis.* 2016;62(6):695-703.
154. Nolan S, Burgess K, Hopper L, Braude S. Acute respiratory distress syndrome in a community hospital ICU. *Intensive Care Med.* 1997;23(5):530-8.
155. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(6):1849-61.
156. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J, Australian, New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials G. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(4):443-8.
157. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1685-93.
158. Manzano F, Yuste E, Colmenero M, Aranda A, Garcia-Horcajadas A, Rivera R, et al. Incidence of acute respiratory distress syndrome and its relation to age. *J Crit Care.* 2005;20(3):274-80.
159. Li G, Malinchoc M, Cartin-Ceba R, Venkata CV, Kor DJ, Peters SG, et al. Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(1):59-66.
160. Caser EB, Zandonade E, Pereira E, Gama AM, Barbas CS. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients*. *Crit Care Med.* 2014;42(3):574-82.
161. Linko R, Okkonen M, Pettila V, Perttila J, Parviainen I, Ruokonen E, et al. Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2009;35(8):1352-61.
162. Villar J, Blanco J, Anon JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambros A, et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med.* 2011;37(12):1932-41.
163. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med.* 2004;30(1):51-61.
164. Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD, Network A. Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med.* 2003;31(6):1607-11.
165. Sakr Y, Vincent JL, Reinhart K, Groeneveld J, Michalopoulos A, Sprung CL, et al. High tidal volume and positive fluid balance are associated with worse outcome in acute lung injury. *Chest.* 2005;128(5):3098-108.
166. Irish Critical Care Trials G. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management. *Crit Care.* 2008;12(1):R30.

167. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*. 2016;315(8):788-800.
168. Checkley W. Neuregulin-1 as a potentially novel biomarker in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 2013;41(2):259-61.
169. Wynne BM, Zou L, Linck V, Hoover RS, Ma H-P, Eaton DC. Regulation of Lung Epithelial Sodium Channels by Cytokines and Chemokines. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:766.
170. Olman MA, White KE, Ware LB, Cross MT, Zhu S, Matthay MA. Microarray analysis indicates that pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury mediates inflammation, mitogen gene expression, and fibroblast proliferation through bioactive interleukin-1. *Chest*. 2002;121(3 Suppl):69s-70s. Epub 2002/03/15.
171. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(6 Pt 1):1850-6.
172. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho O, Repine AJ, et al. Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(1):L75-80.
173. Hybertson BM, Lee YM, Cho HG, Cho OJ, Repine JE. Alveolar type II cell abnormalities and peroxide formation in lungs of rats given IL-1 intratracheally. *Inflammation*. 2000;24(4):289-303.
174. Leff JA, Bodman ME, Cho OJ, Rohrbach S, Reiss OK, Vannice JL, et al. Post-insult treatment with interleukin-1 receptor antagonist decreases oxidative lung injury in rats given intratracheal interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(1):109-12.
175. Repine JE. Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 10:75-8.
176. Roux J, Kawakatsu H, Gartland B, Pespeni M, Sheppard D, Matthay MA, et al. Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18579-89.
177. Galam L, Soundararajan R, Breitzig M, Rajan A, Yeruva RR, Czachor A, et al. SOCS-1 rescues IL-1beta-mediated suppression of epithelial sodium channel in mouse lung epithelial cells via ASK-1. *Oncotarget*. 2016;7(20):29081-91.
178. Galiotta LJ, Pagesy P, Folli C, Caci E, Romio L, Costes B, et al. IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *J Immunol*. 2002;168(2):839-45.
179. Wynne BM, Zou L, Linck V, Hoover RS, Ma HP, Eaton DC. Regulation of Lung Epithelial Sodium Channels by Cytokines and Chemokines. *Front Immunol*. 2017;8:766.
180. Peters DM, Vadasz I, Wujak L, Wygrecka M, Olschewski A, Becker C, et al. TGF-beta directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):E374-83.
181. Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278(45):43939-50.

182. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.
183. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-24.
184. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(6):586-93.
185. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
186. Leung AK, Sharp PA. MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell.* 2010;40(2):205-15.
187. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:351-79.
188. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466(7308):835-40.
189. Ghosh T, Soni K, Scaria V, Halimani M, Bhattacharjee C, Pillai B. MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic {beta}-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(19):6318-32.
190. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931-4.
191. Yang G, Hamacher J, Gorshkov B, White R, Sridhar S, Verin A, et al. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *Journal of Cardiovascular Disease Research.* 2010;1(1):29-36.
192. Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR, Buschke S, Dunant Y, Wendel A, et al. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(5):651-6.
193. Dagenais A, Frechette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, et al. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(2):L301-11.
194. Yamagata T, Yamagata Y, Nishimoto T, Hirano T, Nakanishi M, Minakata Y, et al. The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;166(1):16-23.
195. Dagenais A, Frechette R, Clermont ME, Masse C, Prive A, Brochiero E, et al. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(6):L1220-31.
196. Willam A, Aufy M, Tzotzos S, El-Malazi D, Poser F, Wagner A, et al. TNF Lectin-Like Domain Restores Epithelial Sodium Channel Function in Frameshift Mutants Associated with Pseudohypoaldosteronism Type 1B. *Front Immunol.* 2017;8:601.
197. Czikora I, Alli A, Bao HF, Kaftan D, Sridhar S, Apell HJ, et al. A novel tumor necrosis factor-mediated mechanism of direct epithelial sodium channel activation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(5):522-32.
198. Migneault F, Boncoeur E, Morneau F, Pascariu M, Dagenais A, Berthiaume Y. Cycloheximide and lipopolysaccharide downregulate alphaENaC mRNA via different mechanisms in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;305(10):L747-55.

199. Zentner MD, Lin HH, Wen X, Kim KJ, Ann DK. The amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is transcriptionally down-regulated in rat parotid cells by the extracellular signal-regulated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30770-6.
200. Otulakowski G, Rafii B, Bremner HR, O'Brodovich H. Structure and hormone responsiveness of the gene encoding the alpha-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(5):1028-40.
201. Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ, Thomas CP. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol Endocrinol.* 2001;15(4):575-88.
202. Itani OA, Cornish KL, Liu KZ, Thomas CP. Cycloheximide increases glucocorticoid-stimulated alpha-ENaC mRNA in collecting duct cells by p38 MAPK-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(4):F778-87.
203. Mustafa SB, Castro R, Falck AJ, Petershack JA, Henson BM, Mendoza YM, et al. Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways mediate cAMP induction of alpha-epithelial Na⁺ channels (alpha-ENaC). *J Cell Physiol.* 2008;215(1):101-10.
204. Ljungman M. The transcription stress response. *Cell Cycle.* 2007;6(18):2252-7.
205. Sugita M, Ferraro P, Dagenais A, Clermont ME, Barbry P, Michel RP, et al. Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1440-50.
206. Li Y, Chang J, Cui Y, Zhao R, Ding Y, Hou Y, et al. Novel mechanisms for crotonaldehyde-induced lung edema. *Oncotarget.* 2017;8(48):83509-22.
207. Migneault F. Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires
Détermination du rôle des séquences 3' non traduites. 2014. Epub 2014.
208. Hardison RC. Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends Genet.* 2000;16(9):369-72.
209. Jegga AG, Aronow BJ. Evolutionarily Conserved Noncoding DNA. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
210. Tani H, Mizutani R, Salam KA, Tano K, Ijiri K, Wakamatsu A, et al. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res.* 2012;22(5):947-56.
211. Chen CY, Xu N, Shyu AB. mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol Cell Biol.* 1995;15(10):5777-88.
212. Scocca JR, Charron M, Shaper NL, Shaper JH. Determination of the half-life of the murine beta4-galactosyltransferase-1 mRNA in somatic cells using the tetracycline-controlled transcriptional regulation system. *Biochimie.* 2003;85(3-4):403-7.
213. Svoboda P, Di Cara A. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(7-8):901-8.
214. Ray D, Kazan H, Chan ET, Pena Castillo L, Chaudhry S, Talukder S, et al. Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins. *Nat Biotechnol.* 2009;27(7):667-70.
215. Vlasova-St Louis I, Bohjanen PR. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Current opinion in genetics & development.* 2011;21(4):444-51. Epub 2011/04/19.

216. Ho JJ, Robb GB, Tai SC, Turgeon PJ, Mawji IA, Man HS, et al. Active stabilization of human endothelial nitric oxide synthase mRNA by hnRNP E1 protects against antisense RNA and microRNAs. *Mol Cell Biol.* 2013;33(10):2029-46.
217. Lai PF, Mohamed F, Monge JC, Stewart DJ. Downregulation of eNOS mRNA expression by TNFalpha: identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc Res.* 2003;59(1):160-8.
218. Oliveira C, Faoro H, Alves LR, Goldenberg S. RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics and Molecular Biology.* 2017;40:22-30.
219. Newman R, McHugh J, Turner M. RNA binding proteins as regulators of immune cell biology. *Clinical and Experimental Immunology.* 2016;183(1):37-49.
220. Kishore S, Lubner S, Zavolan M. Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Brief Funct Genomics.* 2010;9(5-6):391-404.
221. Gregersen LH, Schueler M, Munschauer M, Mastrobuoni G, Chen W, Kempa S, et al. MOV10 Is a 5' to 3' RNA helicase contributing to UPF1 mRNA target degradation by translocation along 3' UTRs. *Mol Cell.* 2014;54(4):573-85. Epub 2014/04/15.
222. Lai JC, Ponti S, Pan D, Kohler H, Skoda RC, Matthias P, et al. The DEAH-box helicase RHAU is an essential gene and critical for mouse hematopoiesis. *Blood.* 2012;119(18):4291-300.
223. Gao X, Ma W, Nie J, Zhang C, Zhang J, Yao G, et al. A G-quadruplex DNA structure resolvase, RHAU, is essential for spermatogonia differentiation. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1610.
224. Nie J, Jiang M, Zhang X, Tang H, Jin H, Huang X, et al. Post-transcriptional Regulation of Nkx2-5 by RHAU in Heart Development. *Cell Rep.* 2015;13(4):723-32.
225. Vaughn JP, Creacy SD, Routh ED, Joyner-Butt C, Jenkins GS, Pauli S, et al. The DEXH protein product of the DHX36 gene is the major source of tetramolecular quadruplex G4-DNA resolving activity in HeLa cell lysates. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38117-20.
226. Creacy SD, Routh ED, Iwamoto F, Nagamine Y, Akman SA, Vaughn JP. G4 resolvase 1 binds both DNA and RNA tetramolecular quadruplex with high affinity and is the major source of tetramolecular quadruplex G4-DNA and G4-RNA resolving activity in HeLa cell lysates. *J Biol Chem.* 2008;283(50):34626-34.
227. Chakraborty P, Grosse F. Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes. *DNA Repair (Amst).* 2011;10(6):654-65.
228. Meier M, Patel TR, Booy EP, Marushchak O, Okun N, Deo S, et al. Binding of G-quadruplexes to the N-terminal recognition domain of the RNA helicase associated with AU-rich element (RHAU). *J Biol Chem.* 2013;288(49):35014-27.
229. Lattmann S, Giri B, Vaughn JP, Akman SA, Nagamine Y. Role of the amino terminal RHAU-specific motif in the recognition and resolution of guanine quadruplex-RNA by the DEAH-box RNA helicase RHAU. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(18):6219-33.
230. Chalupnikova K, Lattmann S, Selak N, Iwamoto F, Fujiki Y, Nagamine Y. Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain. *J Biol Chem.* 2008;283(50):35186-98.
231. Tran H, Schilling M, Wirbelauer C, Hess D, Nagamine Y. Facilitation of mRNA deadenylation and decay by the exosome-bound, DEXH protein RHAU. *Mol Cell.* 2004;13(1):101-11.

232. Booy EP, Howard R, Marushchak O, Ariyo EO, Meier M, Novakowski SK, et al. The RNA helicase RHAU (DHX36) suppresses expression of the transcription factor PITX1. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(5):3346-61.
233. Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. Stress puts TIA on TOP. *Genes Dev.* 2011;25(20):2119-24.
234. LaJevic MD, Koduvayur SP, Caffrey V, Cohen RL, Chambers DA. Thy-1 mRNA destabilization by norepinephrine a 3' UTR cAMP responsive decay element and involves RNA binding proteins. *Brain Behav Immun.* 2010;24(7):1078-88.
235. Kim HS, Kuwano Y, Zhan M, Pullmann R, Jr., Mazan-Mamczarz K, Li H, et al. Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol.* 2007;27(19):6806-17.
236. Fechir M, Linker K, Pautz A, Hubrich T, Kleinert H. The RNA binding protein TIAR is involved in the regulation of human iNOS expression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51(3):299-305.
237. Gottschald OR, Malec V, Krasteva G, Hasan D, Kamlah F, Herold S, et al. TIAR and TIA-1 mRNA-binding proteins co-aggregate under conditions of rapid oxygen decline and extreme hypoxia and suppress the HIF-1alpha pathway. *J Mol Cell Biol.* 2010;2(6):345-56.
238. Cok SJ, Acton SJ, Morrison AR. The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36157-62.
239. Tong X, Van Dross RT, Abu-Yousif A, Morrison AR, Pelling JC. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. *Mol Cell Biol.* 2007;27(1):283-96.
240. Mazumder B, Li X, Barik S. Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response. *J Immunol.* 2010;184(7):3311-9.
241. Damgaard CK, Lykke-Andersen J. Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev.* 2011;25(19):2057-68.
242. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* 2005;169(6):871-84.
243. Fred RG, Mehrabi S, Adams CM, Welsh N. PTB and TIAR binding to insulin mRNA 3'- and 5'UTRs; implications for insulin biosynthesis and messenger stability. *Heliyon.* 2016;2(9):e00159.
244. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell.* 2009;36(6):932-41.
245. Zentner MD, Lin HH, Wen X, Kim KJ, Ann DK. The amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is transcriptionally down-regulated in rat parotid cells by the extracellular signal-regulated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30770-6.
246. Otulakowski G, Rafii B, Bremner HR, O'Brodovich H. Structure and hormone responsiveness of the gene encoding the alpha-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Am J RespirCell MolBiol.* 1999;20(5):1028-40.
247. Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ, Thomas CP. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *MolEndocrinol.* 2001;15(4):575-88.

248. Itani OA, Cornish KL, Liu KZ, Thomas CP. Cycloheximide increases glucocorticoid-stimulated alpha-ENaC mRNA in collecting duct cells by p38 MAPK-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(4):F778-F87.
249. Dagenais A, Frechette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, et al. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(2):L301-L11.
250. Mustafa SB, Castro R, Falck AJ, Petershack JA, Henson BM, Mendoza YM, et al. Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways mediate cAMP induction of alpha-epithelial Na⁺ channels (alpha-ENaC). *J Cell Physiol.* 2008;215(1):101-10.
251. Zhang D, Yu ZY, Cruz P, Kong Q, Li S, Kone BC. Epigenetics and the control of epithelial sodium channel expression in collecting duct. *Kidney Int.* 2009;75(3):260-7.
252. Boscardin E, Alijevic O, Hummler E, Frateschi S, Kellenberger S. The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC): IUPHAR Review 19. *Br J Pharmacol.* 2016;173(18):2671-701.
253. Bhalla V, Hallows KR. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(10):1845-54.
254. Kleyman TR, Kashlan OB, Hughey RP. Epithelial Na⁽⁺⁾ Channel Regulation by Extracellular and Intracellular Factors. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:263-81.
255. Dagenais A, Denis C, Vives MF, Girouard S, Masse C, Nguyen T, et al. Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(1):L217-30.
256. Xu H, Chu S. ENaC alpha-subunit variants are expressed in lung epithelial cells and are suppressed by oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(6):L1454-62.
257. Hussain R, Oliynyk I, Roomans GM, Bjorkqvist M. Modulation of ENaC, CFTR, and iNOS expression in bronchial epithelial cells after stimulation with *Staphylococcus epidermidis* (94B080) and *Staphylococcus aureus* (90B083). *APMIS.* 2013;121(9):814-26.
258. Li X, Quon G, Lipshitz HD, Morris Q. Predicting in vivo binding sites of RNA-binding proteins using mRNA secondary structure. *RNA.* 2010;16(6):1096-107.
259. Szostak E, Gebauer F. Translational control by 3'-UTR-binding proteins. *Brief Funct Genomics.* 2013;12(1):58-65.
260. Han Y, Brasier AR. Mechanism for biphasic rel A. NF-kappaB1 nuclear translocation in tumor necrosis factor alpha-stimulated hepatocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(15):9825-32.
261. Kemler I, Fontana A. Role of IkappaBalpha and IkappaBbeta in the biphasic nuclear translocation of NF-kappaB in TNFalpha-stimulated astrocytes and in neuroblastoma cells. *Glia.* 1999;26(3):212-20.
262. Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol.* 1995;69(9):5391-400.
263. Han SJ, Ko HM, Choi JH, Seo KH, Lee HS, Choi EK, et al. Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem.* 2002;277(47):44715-21.
264. You WC, Li W, Zhuang Z, Tang Y, Lu HC, Ji XJ, et al. Biphasic activation of nuclear factor-kappa B in experimental models of subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:786242.

265. Ladner KJ, Caligiuri MA, Guttridge DC. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2294-303. Epub 2002/11/15.
266. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179(8):5082-9.
267. Cleyneen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciort R, et al. HMGA2 regulates transcription of the Imp2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res*. 2007;5(4):363-72.
268. Matsumoto T, Marusawa H, Endo Y, Ueda Y, Matsumoto Y, Chiba T. Expression of APOBEC2 is transcriptionally regulated by NF-kappaB in human hepatocytes. *FEBS Lett*. 2006;580(3):731-5.
269. Minczuk M, Lilpop J, Boros J, Stepien PP. The 5' region of the human hSUV3 gene encoding mitochondrial DNA and RNA helicase: promoter characterization and alternative pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1729(2):81-7.
270. Sohn WJ, Kim D, Lee KW, Kim MS, Kwon S, Lee Y, et al. Novel transcriptional regulation of the schlafen-2 gene in macrophages in response to TLR-triggered stimulation. *Mol Immunol*. 2007;44(13):3273-82.
271. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, Suchy H, Boyle EM, Jr., Farr AL, et al. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. *Muscle Nerve*. 2001;24(4):534-41.
272. Loupasakis K, Kuo D, Sokhi UK, Sohn C, Syracuse B, Giannopoulou EG, et al. Tumor Necrosis Factor dynamically regulates the mRNA stabilome in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *PLoS One*. 2017;12(7):e0179762.
273. Zurla C, Lifland AW, Santangelo PJ. Characterizing mRNA interactions with RNA granules during translation initiation inhibition. *PLoS One*. 2011;6(5):e19727.
274. Khong A, Matheny T, Jain S, Mitchell SF, Wheeler JR, Parker R. The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Mol Cell*. 2017;68(4):808-20 e5.
275. Stoecklin G, Kedersha N. Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol*. 2013;768:197-211.
276. Protter DS, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol*. 2016;26(9):668-79.
277. Jayabalan AK, Sanchez A, Park RY, Yoon SP, Kang GY, Baek JH, et al. NEDDylation promotes stress granule assembly. *Nat Commun*. 2016;7:12125.
278. Anderson P, Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(3):141-50.
279. Brengues M, Teixeira D, Parker R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. 2005;310(5747):486-9. Epub 2005/09/06.
280. Hu S, Claud EC, Musch MW, Chang EB. Stress granule formation mediates the inhibition of colonic Hsp70 translation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(4):G481-92.
281. : [2018]. Disponible:
<https://www.dssresearch.com/KnowledgeCenter/toolkitcalculators/statisticalpowercalculators.aspx>

282. Alonso CR. A complex 'mRNA degradation code' controls gene expression during animal development. *Trends Genet.* 2012;28(2):78-88.
283. Azizi H, Romao TP, Santos Charret K, Padmanabhan PK, de Melo Neto OP, Muller-McNicoll M, et al. RNA secondary structure and nucleotide composition of the conserved hallmark sequence of *Leishmania* *SIDER2* retroposons are essential for endonucleolytic cleavage and mRNA degradation. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180678.
284. Wu X, Brewer G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene.* 2012;500(1):10-21.
285. Shi YZ, Jin L, Wang FH, Zhu XL, Tan ZJ. Predicting 3D Structure, Flexibility, and Stability of RNA Hairpins in Monovalent and Divalent Ion Solutions. *Biophys J.* 2015;109(12):2654-65.
286. Cruz JA, Westhof E. The dynamic landscapes of RNA architecture. *Cell.* 2009;136(4):604-9.
287. Ding Y, Tang Y, Kwok CK, Zhang Y, Bevilacqua PC, Assmann SM. In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. *Nature.* 2014;505(7485):696-700.
288. Li F, Zheng Q, Ryvkin P, Dragomir I, Desai Y, Aiyer S, et al. Global analysis of RNA secondary structure in two metazoans. *Cell Rep.* 2012;1(1):69-82.
289. Li F, Zheng Q, Vandivier LE, Willmann MR, Chen Y, Gregory BD. Regulatory impact of RNA secondary structure across the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Cell.* 2012;24(11):4346-59.
290. Zheng Q, Ryvkin P, Li F, Dragomir I, Valladares O, Yang J, et al. Genome-wide double-stranded RNA sequencing reveals the functional significance of base-paired RNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 2010;6(9):e1001141.
291. Li X, Kazan H, Lipshitz HD, Morris QD. Finding the target sites of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;5(1):111-30.
292. Wu H, Henras A, Chanfreau G, Feigon J. Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8307-12.
293. Rytter JM, Schultz SC. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 1998;17(24):7505-13.
294. Ramos A, Grunert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, Freund S, et al. RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J.* 2000;19(5):997-1009.
295. Ding Y, Zhao R, Zhao X, Matthay MA, Nie HG, Ji HL. ENaCs as Both Effectors and Regulators of MiRNAs in Lung Epithelial Development and Regeneration. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(3):1120-32.
296. Qi W, Li H, Cai XH, Gu JQ, Meng J, Xie HQ, et al. Lipoxin A4 activates alveolar epithelial sodium channel gamma via the microRNA-21/PTEN/AKT pathway in lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury. *Lab Invest.* 2015;95(11):1258-68.
297. Qin K, Zhong X, Wang D. MicroRNA-7-5p regulates human alveolar epithelial sodium channels by targeting the mTORC2/SGK-1 signaling pathway. *Exp Lung Res.* 2016;42(5):237-44.
298. Tamarapu Parthasarathy P, Galam L, Huynh B, Yunus A, Abuelenen T, Castillo A, et al. MicroRNA 16 modulates epithelial sodium channel in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;426(2):203-8.

299. Tang R, Pei L, Bai T, Wang J. Down-regulation of microRNA-126-5p contributes to overexpression of VEGFA in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Biotechnol Lett.* 2016;38(8):1277-84.

Annexes

Annexe 1. Solutions utilisées dans le cadre de la chirurgie et de l'isolation de cellules épithéliales alvéolaires.

Solution SGGS

salin 0,9% (NaCl) (154 mM)	9g
Glucose (1 mg/mL) (5,55 mM)	1g
Gentamycine	10mg (250 μ L)
Septra	200 μ L
Volume final	1L

Solution I

	<u>Pour 1 rat</u>
SGGS	100mL
KCl 0,15 M	4mL
HEPES 0,2 M	6mL
tampon (Na) PO ₄ pH 7,4 0,1 M	3mL
Volume final	113mL

Solution II

	<u>Pour 1 rat</u>
SGGS	200mL
KCl 0,15 M	8mL
CaCl ₂ 0,11 M	4mL
MgSO ₄ 0,15 M	2mL
HEPES 0,2 M	12mL
tampon (Na) PO ₄ pH 7,4 0,1 M	6mL
Volume final	232mL

Milieu MEM

	<u>Pour 1 bouteille</u>
Poudre MEM (GIBCO no cat. 11700-077)	3,34g
NaHCO ₃ 7,5% stérile (Gibco #25080-094)	6,7mL
L-glutamine 200 mM (Gibco #25030-081)	3,3mL
HEPES 1M [pH 7,3] (Gibco# 15630-080)	3,3mL
+ SVF 10%	34mL
<i>Antibiotique</i>	
Gentamycin 40 mg/mL	0,67mL
Septra	70μL