

Université de Montréal

2m 11.2713.1

Modulation de l'expression d' α -rENaC et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase dans les cellules alvéolaires de type II chez le rat

par

Christine Denis

Département de Médecine

Faculté de Médecine

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

Septembre 1997

© Christine Denis, 1997



W
4
U58
1999
v. 099



**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé:

Modulation de l'expression d' α -rENaC et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase dans les cellules alvéolaires de type II chez le rat

présenté par

Christine Denis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

<i>Denis DeHon</i>	président-rapporteur
<i>Yves Berthiaume</i>	directeur de recherche
<i>André Jazencin</i>	co-directeur de recherche
<i>Olivier Lesur</i>	membre du jury (Univ. Sherbrooke)
	examineur externe

Mémoire accepté le: *99.01.22*

SOMMAIRE

Le transport du sodium par le canal rENaC (rat Epithelial Na⁺ Channel) sensible à l'amiloride joue un rôle important dans l'homéostasie liquidienne des alvéoles pulmonaires. Ce canal constitué de trois sous-unités (α , β et γ) est exprimé chez les cellules alvéolaires de type II en culture. La sous-unité α est celle qui permet le transport du sodium. Des travaux ont montré une modulation de l'expression d' α -rENaC dans les poumons à la naissance, lorsque le transport de sodium permet la réabsorption du liquide des alvéoles. *In vitro*, les corticostéroïdes augmentent l'expression d' α -rENaC dans les cellules alvéolaires fœtales en culture. Nous avons voulu déterminer si l'AMPc intracellulaire, connu pour augmenter la réabsorption du sodium, ainsi que les glucocorticostéroïdes, pouvaient moduler l'expression d' α -rENaC dans les cellules de type II en culture. Comme le sodium qui entre dans la cellule doit en ressortir pour maintenir un équilibre, on a aussi voulu déterminer si l'expression de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase, la seule voie de sortie connue du sodium, pouvait être co-réglée avec α -rENaC. Par buvardage de type Northern, nous avons quantifié au PhosphorImager™ l'expression d' α -rENaC et d' α_1 -Na⁺/K⁺-ATPase dans les cellules alvéolaires de type II traitées au dibutyryl AMPc (dbAMPc), la forskoline et la dexaméthasone. Le traitement au dibutyryl GMPc (dbGMPc) sert de témoin négatif. Les résultats sont normalisés avec la β -actine.

Une stimulation des cellules de type II par le dbAMPc 1 mM double l'expression d' α -rENaC après 8 h de traitement. La forskoline 20 μ M, un produit qui stimule l'adénylate cyclase, double aussi l'expression du canal. L'activité PKA est augmentée après 8 h de traitement au dbAMPc et à la forskoline. L'augmentation induite par le dbAMPc est bloquée par l'actinomycine D ce qui suggère que cette hausse dépende en partie de la transcription. Le traitement de ces cellules à la dexaméthasone

100 nM quadruple l'expression des messagers et cet effet est plus soutenu que celui induit par le dbAMPc ou la forskoline. Par ailleurs, le dbAMPc et la dexaméthasone administrés ensemble ont un effet additif sur l'expression d' α -rENaC. Les messagers de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase montrent le même patron d'expression qu' α -rENaC lors d'une stimulation au dbAMPc, à la forskoline et au dbGMPc. Cet impact sur la pompe à 8 h est bloqué par l'actinomycine D, donc la transcription semble aussi impliquée en partie. Cependant, l'effet de la dexaméthasone sur la pompe est moins élevé et moins soutenu que celui produit sur d' α -rENaC, et l'administration concomitante du dbAMPc et de la dexaméthasone montre un effet additif sur l'expression de la pompe. Une analyse de corrélation montre que les patrons d'expression d' α -rENaC et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase réagissent différemment au traitement à la dexaméthasone.

L'AMPc intracellulaire semble donc augmenter l'expression des ARN messagers d' α -rENaC chez les cellules alvéolaires de type II. Cette modulation pourrait se produire au niveau de la transcription du gène et impliquer la présence d'un élément CRE (cAMP Response Element) dans le promoteur du gène. Quant à la dexaméthasone, elle semble jouer un rôle prédominant dans la régulation du canal. La voie de l'AMPc pourrait coréguler les principaux éléments de la machinerie du transport sodique, soit α -rENaC et la pompe Na⁺/K⁺-ATPase. Toutefois, les glucocorticoïdes semblent réguler ces éléments de manière indépendante.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiii
1. INTRODUCTION.....	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
2.1. RÔLES ET PROPRIÉTÉS DES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II.....	3
2.1.1. L'ÉPITHÉLIUM DU POUMON DISTAL.....	3
2.1.2. CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES DE TYPE II <i>IN VIVO</i>	4
2.1.3. MISE EN CULTURE DES CELLULES DE TYPE II.....	5
2.1.4. TRANSPORT TRANSÉPITHÉLIAL.....	7
2.2. MODÈLE DU TRANSPORT ACTIF DU SODIUM À TRAVERS UNE MONOCOUCHE ÉPITHÉLIALE.....	8
2.3. PROPRIÉTÉS D'ENaC, UN CANAL SODIQUE ÉPITHÉLIAL (Garty 1994, et Lingueglia <i>et al.</i> 1996).....	13
2.3.1. DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE GRANDE FAMILLE DE CANAUX SODIQUES ÉPITHÉLIAUX.....	13
2.3.2. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES.....	17
2.3.3. PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES.....	17
2.3.4. PROPRIÉTÉS ET ORGANISATION MOLÉCULAIRES.....	18
2.3.5. RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE.....	21

2.4.	CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE LA POMPE Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	23
2.5.	RÉGULATION HORMONALE DU TRANSPORT SODIQUE.....	25
2.5.1.	FONCTIONNEMENT DES VOIES DE SIGNALISATION DÉPENDANTES DE L'AMPc (Borrelli <i>et al.</i> 1992, Meyer <i>et al.</i> 1993, et Sassone-Corsi 1994).....	27
2.5.2.	FONCTIONNEMENT DES VOIES STÉROÏDIENNES (Wright <i>et al.</i> 1993).....	32
2.5.3.	RÉGULATION DES COMPOSANTES DE LA MACHINERIE DU TRANSPORT SODIQUE DANS LE POUMON.....	37
2.5.3.1.	ENaC.....	37
2.5.3.2.	LA POMPE Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	38
2.5.3.3.	CO-RÉGULATION D'ENaC ET DE LA POMPE Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	41
2.5.4.	RÔLE DE LA GMPc DANS LE TRANSPORT ÉPITHÉLIAL SODIQUE DU POUMON.....	42
3.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	44
4.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	46
4.1.	MISE EN CULTURE DES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II (Dobbs <i>et al.</i> 1986).....	46
4.2.	SOLUTIONS ET PRODUITS CHIMIQUES.....	48
4.3.	QUANTIFICATION DU MESSAGER DU CANAL.....	49
4.4.	ACTIVITÉ PKA.....	52
4.5.	STATISTIQUES.....	53

5. RÉSULTATS.....	55
5.1. EXPRESSION SPONTANÉE D'α-rENaC DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE DURANT 7 JOURS.....	55
5.2. MODULATION DE L'EXPRESSION D'α-rENaC PAR LA VOIE DÉPENDANTE DE L'AMPc DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE.....	59
5.2.1. IMPACT D'UN TRAITEMENT AU dbAMPc À COURT TERME SUR DES CELLULES EN MONOCOUCHE.....	60
5.2.2. STIMULATION EN AMONT DES VOIES DE SIGNALISATION PAR LA FORSKOLINE.....	63
5.2.3. EFFET D'UN TRAITEMENT AU dbGMPc.....	66
5.2.4. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PKA.....	72
5.3. IMPACT D'UN TRAITEMENT À L'ACTINOMYCINE D SUR LA TRANSCRIPTION DU CANAL.....	75
5.4. RÔLE MODULATEUR DES CORTICOSTÉROÏDES SUR L'EXPRESSION D'α-rENaC DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE.....	78
5.4.1. TRAITEMENT DES CELLULES DE TYPE II À LA DEXAMÉTHASONE.....	78
5.4.2. EFFET D'UN TRAITEMENT SIMULTANÉ À LA DEXAMÉTHASONE ET AU dbAMPc SUR L'EXPRESSION DU CANAL.....	79
5.5. CO-RÉGULATION D'α-rENaC ET DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na⁺/K⁺-ATPase AU NIVEAU DES ARNm.....	82
5.5.1. INFLUENCE DES VOIES DE SIGNALISATION DÉPENDANTES DE L'AMPc SUR L'EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na⁺/K⁺-ATPase.....	86

5.5.2.	INFLUENCE DES CORTICOSTÉROÏDES SUR L'EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase.....	91
5.5.3.	RELATION ENTRE LES VOIES DE SIGNALISATION AMPc-DÉPENDANTE ET CORTICOSTÉROÏDE-DÉPENDANTE POUR L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase.....	94
6.	DISCUSSION.....	100
6.1.	MODIFICATION DES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE.....	100
6.2.	IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'AMPc DANS LA MODULATION D' α -rENaC.....	103
6.3.	MODULATION D' α -rENaC PAR LES GLUCOCORTICOÏDES.....	108
6.4.	CO-RÉGULATION D' α -rENaC D' α_1 - Na^+/K^+ -ATPase.....	111
6.5.	INTERACTION DE L'AMPc ET DES GLUCOCORTICOÏDES DANS LA MODULATION DES COMPOSANTES DE LA MACHINERIE DU TRANSPORT SODIQUE.....	114
6.6.	TRAITEMENT DE L'ŒDÈME PULMONAIRE VIA ENaC?.....	115
7.	RÉFÉRENCES.....	117

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Modèle du transport sodique de l'épithélium pulmonaire.....	9
Figure 2: Structure topologique de rENaC.....	14
Figure 3: Voie de signalisation de l'AMPc et son implication possible sur l'expression de rENaC.....	29
Figure 4: Voie de signalisation empruntée par les glucocorticoïdes.....	35
Figure 5: Expression spontanée d'α-rENaC chez les cellules de type II en culture durant 7 jours.....	57
Figure 6: Protocole de traitement des cellules alvéolaires de type II isolées et mises en culture.....	61
Figure 7: Expression d'α-rENaC suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM.....	64
Figure 8: Expression d'α-rENaC, de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+-ATPase et du gène standard de la β-actine suite à une stimulation des cellules de type II au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μM et au dbGMPc 1 mM.....	67
Figure 9: Expression d'α-rENaC suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μM et au dbGMPc 1 mM.....	69
Figure 10: Activité PKA suite à un traitement de 8 h au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μM et au dbGMPc 1 mM.....	73
Figure 11: Blocage de la transcription d'α-rENaC par l'actinomycine D suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM.....	76

Figure 12: Expression d'α-rENaC suite à une stimulation à la dexaméthasone 100 nM.....	80
Figure 13: Comparaison d'un traitement au dbAMPc 1 mM, à la dexaméthasone 100 nM et d'un traitement concomitant sur l'expression d'α-rENaC.....	83
Figure 14: Expression de la sous-unité α_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM.....	87
Figure 15: Expression de la sous-unité α_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase suite à une stimulation de 8 h au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μM et au dbGMPc 1 mM.....	89
Figure 16: Blocage de la transcription de la sous-unité α_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase par l'actinomycine D suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM.....	92
Figure 17: Expression de la sous-unité α_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase suite à une stimulation à la dexaméthasone 100 nM.....	95
Figure 18: Comparaison d'un traitement au dbAMPc 1 mM, à la dexaméthasone 100 nM et d'un traitement concomitant sur l'expression de la sous-unité α_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase.....	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANF	Facteur natriurétique auriculaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Messagers d'ARN
ATF	<i>Active Transcription Factor</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CRE	<i>Cyclic AMP Response Element</i>
CREB	<i>Cyclic AMP Response Element Binding Protein</i>
CREM	<i>Cyclic AMP-Responsive Element Modulator</i>
dbAMPc	Dibutyryl AMPc
dbGMPc	Dibutyryl GMPc
dCTP	Désoxycytosine triphosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EGTA	Acide éthylène-bis-glycol tétraacétique
EIPA	<i>Ethyl isopropyl amiloride</i>
ENaC	<i>Epithelial Na⁺ Channel</i>
FaNaCh	<i>FMRamide Na⁺ Channel</i>
FBS	Sérum fœtal de bovin
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes

HEPES	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
IC₅₀	Concentration inhibant 50% de la réponse maximale
IgG	Immunoglobuline G
Kb	Kilobase
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Na⁺/K⁺-ATPase	Pompe sodium/potassium-adénosine triphosphatase
pb	Paire de base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase C
P_x	Perméabilité membranaire associée à l'ion X
rENaC	<i>Rat Epithelial Na⁺ Channel</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SSC	Tampon à base de citrate de sodium
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TRIS	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane, un tampon
UU	Rayons ultra-violets

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes deux codirecteurs, le Dr Yves Berthiaume (M.D., M.Sc., F.R.C.P.), directeur du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire des poumons, et le Dr André Dagenais (Ph.D.) pour leur soutien académique. Ils ont su m'encadrer dans ce projet tant sur le plan technique que conceptuel.

Je tiens aussi à remercier notre agent technique de recherche, Chantal Massé, sur qui on peut toujours compter pour régler tous les problèmes... ou presque! Elle a réussi à me transmettre la délicate technique de chirurgie du rat utilisée au laboratoire. Elle a de plus été une amie pour moi.

Ma reconnaissance va aussi à Yoshiaki Minakata avec qui j'ai pu entretenir de savantes discussions sur nos projets de recherche conjoints et sur le Japon!

Je tiens aussi à remercier toute personne du Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Montréal ayant participé de près ou de loin à ma formation globale.

Un merci tout spécial à Pierre Dumas, étudiant au Ph.D., pour toute son aide infinie, tant pour l'aspect technique du projet que pour son inspiration scientifique.

1. INTRODUCTION

Le transport du sodium joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie liquidienne des alvéoles pulmonaires, plus particulièrement à la naissance, et dans l'œdème pulmonaire chez l'adulte. Les cellules alvéolaires de type II sont responsables du transport actif du sodium et elles créent un gradient osmotique qui favorise l'absorption de l'eau. La sous-unité α de rENaC (rat Epithelial Na Channel) sensible à l'amiloride a été cloné. Ce canal est exprimé du côté apical des cellules alvéolaires de type II. Des études nous montrent que ce canal pourrait être régulé par la voie de l'AMPc et les corticostéroïdes, confirmant ainsi des travaux antérieurs *in vivo*. Étant donné que le transport transépithélial du sodium dépend de son entrée du côté apical de la cellule, et de sa sortie du côté basolatéral par le biais de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, et que l'expression de la pompe est régulée par l'AMPc, il est donc possible que l'expression d' α -rENaC soit régulée par l'AMPc. De plus, on sait que les corticostéroïdes favorisent la maturation des poumons chez le fœtus et stimulent la réabsorption du sodium en augmentant l'expression d' α -rENaC chez les cellules alvéolaires fœtales. Il se pourrait donc que les corticostéroïdes influencent l'expression d' α -rENaC et de la pompe dans les cellules alvéolaires adultes. De plus, compte tenu de l'importance de ces deux transporteurs dans le mouvement transépithélial du sodium et d'eau, il est possible de penser que leur régulation est concertée de même manière.

Ce mémoire propose donc d'étudier d'abord les modifications possibles de l'expression des messagers d'ARN d' α -rENaC chez les cellules alvéolaires de type II maintenues en culture. Ensuite, d'étudier la régulation de l'expression des messagers d'ARN d' α -rENaC et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase par la voie de l'AMPc et des glucocorticoïdes, deux voies de signalisation très importantes dans le poumon, chez les

cellules alvéolaires de type II formant une monocouche. La régulation entre les deux principaux transporteurs sodiques sera ensuite abordée.

Une connaissance plus approfondie des mécanismes cellulaires régulateurs impliqués dans le transport ionique du poumon pourrait éventuellement permettre de découvrir de nouveaux traitements ou d'en appliquer de meilleurs à ceux déjà existants pour des maladies telles que l'œdème pulmonaire et la fibrose kystique.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. RÔLES ET PROPRIÉTÉS DES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II

Les cellules alvéolaires de type II sont l'outil principal de ce travail. Il est donc essentiel de situer ce modèle en tant qu'objet d'étude.

2.1.1. L'ÉPITHÉLIUM DU POUMON DISTAL

Le poumon est constitué de plus de 40 différents types cellulaires (Breeze et Wheeldon 1977, et Sorokin 1970) dont chacun est responsable de fonctions très variées et complexes nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'alvéole, une structure particulière au poumon, permet les échanges gazeux en édifiant la frontière air-tissu. Les cellules épithéliales de type I et de type II forment principalement la paroi alvéolaire. Les cellules de type I couvrent la majeure partie de la paroi alvéolaire (environ 95%) et forment un revêtement continu permettant les échanges gazeux. Cependant, elles représentent seulement 8% de la population cellulaire de la paroi alvéolaire (Crapo *et al.* 1982). Les cellules de type II sont plus petites, mais elles sont plus nombreuses (16% de la population parenchymateuse du poumon (Crapo *et al.* 1982)). Ce sont des cellules granuleuses de forme cubique localisées aux coins des alvéoles et dispersées à travers l'épithélium (Weibel *et al.* 1976). Les cellules de type II produisent le surfactant, une mince couche d'une substance phospholipidique qui réduit la tension de surface, et qui ainsi, empêche l'affaissement des alvéoles. La présence de jonctions serrées entre les différents types cellulaires maintiennent l'étanchéité de l'épithélium pulmonaire et favorisent la distribution polarisée des lipides et des protéines.

2.1.2. CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES DE TYPE II *IN VIVO*

Les cellules alvéolaires de type II sont polarisées; leur surface apicale contient de nombreux microvilli où chacun possède des filaments d'actine disposés longitudinalement (Tsilibary et Williams 1983). De plus, elles possèdent un organelle particulier, les corps lamellaires, qui mesure environ 1 μm de diamètre et accumule le surfactant en couches. La libération du surfactant par les corps lamellaires va permettre de recouvrir l'épithélium alvéolaire. Entre l'épithélium et cette couche de surfactant se trouve une mince couche de fluide composée d'eau et d'électrolytes. Il est proposé que les cellules alvéolaires de type II participent au maintien de cette couche grâce à leur implication dans le transport transépithélial associé à un transport de liquide permettant ainsi une modulation du volume de cette couche liquidienne.

De nombreuses études permettent d'affirmer que les cellules alvéolaires de type II participent au transport actif du sodium. Des travaux *in utero* montrent que les voies aériennes sont remplies de liquide grâce à une sécrétion active de chlore produite par l'épithélium pulmonaire (Olver et Strang 1974). Au moment de la naissance, la sécrétion de chlore diminue graduellement et l'épithélium se met à réabsorber activement le sodium (Olver *et al.* 1986). Ce processus de réabsorption de sodium suivi de fluide joue un rôle très important pour le nouveau-né qui doit vider ses poumons du liquide fœtal et passer au mode de respiration aérien (Bland 1990, O'Brodovich 1991, et Olver *et al.* 1986). La localisation des transporteurs sodiques chez les cellules de type II (Nici *et al.* 1991, Schneeberger et McCarthy 1986, et Sorscher *et al.* 1988) indique qu'elles ont le potentiel de transporter activement le sodium.

En plus de leur fonction de transport, les cellules de type II servent de progénitrices lorsque des lésions surviennent (Crapo *et al.* 1980, et Cross 1974). Elles auraient la capacité de proliférer et de se

différencier en cellules de type I afin de consolider l'épithélium pulmonaire (Evans *et al.* 1975).

2.1.3. MISE EN CULTURE DES CELLULES DE TYPE II

L'utilisation des cellules épithéliales du poumon distal présente de nombreux avantages lorsqu'on étudie les mécanismes du transport épithélial. Ainsi, on élimine la structure alvéolaire et la présence des petites bronchioles.

La méthode d'isolement doit considérer la présence de plusieurs types cellulaires dans le poumon distal. La technique décrite par Dobbs *et al.* (1986) et mentionnée à la section "MATÉRIEL ET MÉTHODE" permet d'obtenir avec une grande pureté les cellules alvéolaires de type II.

L'isolement des cellules alvéolaires de type II permet d'étudier leurs fonctions particulières. D'ailleurs, il a été démontré que les cellules de type II en culture sont responsables du transport actif de sodium suivi passivement d'eau (Goodman et Crandall 1982, Goodman *et al.* 1983, et Mason *et al.* 1982). Cependant, lorsque ces cellules sont maintenues en culture, elles perdent certaines de leurs caractéristiques et les conditions de culture influencent leur morphologie et leurs propriétés de transport (Brody et Williams 1992, Diglio et Kikkawa 1977, Dobbs *et al.* 1985, Dobbs 1990, Mason et Dobbs 1980, Mason *et al.* 1983, et Yue *et al.* 1993).

Les cellules de type II isolées ont une apparence ultrastructurelle similaire à celles des poumons intacts; la présence de corps lamellaires servent de marqueurs morphologiques aux cellules de type II (Mason *et al.* 1977). La phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol présents dans le surfactant (Mason *et al.* 1977) ainsi que la phosphatase alcaline (Edelson *et al.* 1988) servent aussi d'empreinte aux cellules de type II

après leur isolement et confirment le phénotype biochimique de ces cellules. De plus, il existe des marqueurs de surface permettant de différencier les cellules de type I des cellules de type II selon leur capacité de fixation à différentes lectines (Brandt 1982, et Dobbs *et al.* 1985). Donc, si les cellules de type II perdent certaines de leurs caractéristiques lors de leur mise en culture, elles en conservent toutefois une grande partie.

En plus des caractéristiques morphologiques et biochimiques, le phénotype antigénique a été étudié par Danto *et al.* (1992). On propose d'utiliser un anticorps détecteur des cellules de type I sur les cellules de type II en culture. Les cellules de type II ne réagissent pas à cet anticorps avant le jour 3, et elles deviennent progressivement plus réactives en fonction du temps de culture, indiquant un plateau au jour 8. Cette étude démontre ainsi qu'il y a une différenciation partielle des cellules de type II.

Des caractéristiques bioélectriques ont en plus été déterminées chez les cellules alvéolaires de type II maintenues en culture (Cheek *et al.* 1989, Cott *et al.* 1986, Cott 1989, et Yue *et al.* 1993). Brièvement, les cellules de type II en culture forment une monocouche qui manifeste un transport transépithélial absorbant le sodium; ce mouvement ionique est influencé par des stimulateurs ou des inhibiteurs de transport actif ionique.

Les cellules alvéolaires de type II isolées puis cultivées sont actuellement largement utilisées. Toutefois, ce modèle doit être utilisé avec précaution compte tenu des changements que pourrait imposer la mise en culture de ces cellules. Le travail présenté dans ce mémoire propose des études *in vitro* venant appuyer des résultats antérieurs *in vivo*.

2.1.4. TRANSPORT TRANSÉPITHÉLIAL

Suite à l'isolement des cellules de type II, celles-ci s'attachent graduellement au substrat, prennent une forme aplatie et atteignent la confluence au bout de 2 à 3 jours. Les corps lamellaires caractérisant les cellules de type II sont toujours présents, ainsi que les jonctions serrées (Cott 1989, Dobbs *et al.* 1985, Mason *et al.* 1982, et Mason *et al.* 1983). Puis il y a apparition de dômes, une structure hémisphérique constituée d'un groupement d'une dizaine de cellules qui se soulèvent d'un substrat non perméable. Les dômes se rattachent à ce substrat par d'autres cellules formant un anneau (Goodman et Crandall 1982).

La formation de dômes provient du transport actif de solutés à partir du milieu vers le substrat, emportant passivement l'eau à travers la monocouche épithéliale (Cereijido *et al.* 1978, Leighton *et al.* 1970, Lever 1979, Misfeldt *et al.* 1976, Mullin *et al.* 1980, et Valentich *et al.* 1979). Il est donc reconnu que les cellules de type II forment un épithélium polarisé lorsqu'elles sont mises en culture, et qu'elles participent au transport actif d'électrolytes *in vitro* (Mason *et al.* 1982). Cette caractéristique confirme ici leur phénotype physiologique, plus important en ce qui nous concerne que leur phénotype morphologique ou biochimique décrits précédemment. La densité des dômes formés par des cellules de type II confluentes peut être modifiée en ajoutant des agents dans le milieu connus pour affecter le transport ionique. Mason *et al.* (1982), et Goodman *et al.* (1983) ont inhibé la formation de dômes en ajoutant de l'ouabaïne ou de l'amiloride, deux agents qui influencent le transport sodique. L'ouabaïne est connue pour bloquer la pompe Na^+/K^+ -ATPase, et l'amiloride agit à faible concentration en bloquant les canaux sodiques, et à concentration plus élevée en bloquant les échangeurs Na^+ -ion (Kleyman et Cragoe 1988). L'addition d'inhibiteurs affectant le transport du chlore n'a aucun impact sur la formation des dômes. Celle-

ci semble donc être influencée par la concentration extracellulaire en sodium, car un milieu de culture pauvre en chlore n'affecte pas la concentration des dômes tandis qu'un milieu pauvre en sodium inhibe leur formation. Un ensemble d'études prises collectivement (Goodman *et al.* 1983, Goodman *et al.* 1984, et Mason *et al.* 1982) suggère que les cellules alvéolaires de type II formant une monocouche auraient la capacité de transporter un fluide à partir du milieu de culture vers le substrat, que ce transport serait dépendant du sodium présent dans le milieu, et qu'il pourrait être stimulé par des agents connus pour augmenter l'AMPc intracellulaire.

2.2. MODÈLE DU TRANSPORT ACTIF DU SODIUM À TRAVERS UNE MONOCOUCHE ÉPITHÉLIALE

Plusieurs études établissent une relation entre la clairance pulmonaire et le transport actif du sodium chez des animaux entiers (Berthiaume *et al.* 1987, et Smedira *et al.* 1991), dans les poumons isolés et perfusés du rat (Basset *et al.* 1987a, b, et Goodman *et al.* 1987), et par les cellules alvéolaires de type II isolées ou cultivées (Goodman *et al.* 1983, Kim *et al.* 1991, et Mason *et al.* 1982). Pour mieux comprendre les principes de ce transport transépithélial, il est essentiel de détailler le mouvement du sodium et de l'eau à travers les membranes cellulaires.

Les cellules alvéolaires de type II sont des cellules polarisées; elles possèdent un côté apical donnant vers la lumière de l'organe, et un côté basolatéral ou plasmatique (figure 1). Ces deux côtés de la cellule ne sont donc pas forcément identiques. Cette situation est par ailleurs le commun des épithéliums.

Il existe plusieurs possibilités d'entrée du sodium du côté apical chez les cellules de type II en culture: le co-transporteur sodium-glucose (Basset *et al.* 1987a, b, et O'Brodovich *et al.* 1991), l'échangeur Na^+-H^+

Modèle du transport sodique de l'épithélium pulmonaire

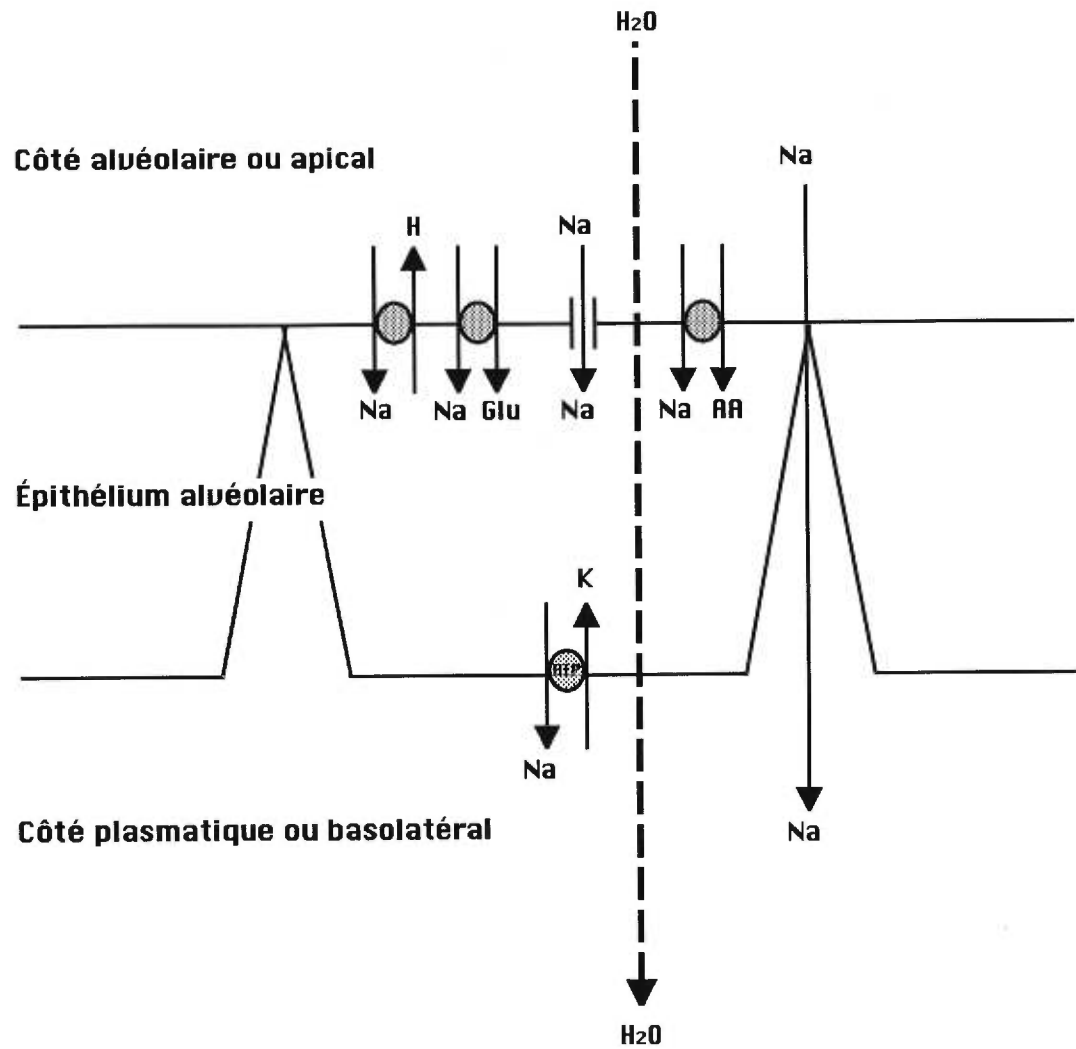


Figure 1

(Brown *et al.* 1991, Nord *et al.* 1987, et O'Brodovich *et al.* 1991), le co-transporteur sodium-acide aminé (Brown *et al.* 1985), et les canaux sodiques (Feng *et al.* 1993, Matalon *et al.* 1992, O'Brodovich *et al.* 1990, et Orser *et al.* 1991). L'échangeur $\text{Na}^+\text{-H}^+$ contribue très peu à cette entrée de sodium dans la cellule (Matalon *et al.* 1991, O'Brodovich *et al.* 1990, O'Brodovich *et al.* 1991, et Russo *et al.* 1992). Le co-transporteur sodium-acide aminé est occupé à des fonctions nutritives (Clerici *et al.* 1991) et contribuerait peu au transport sodique (Matalon *et al.* 1994). Il reste donc deux voies d'entrée possibles du sodium, le co-transporteur sodium-glucose et les canaux sodiques. *In vivo*, il semble que le co-transporteur sodium-glucose soit important dans la réabsorption de fluide (Matalon *et al.* 1994). Toutefois, les résultats d'une étude *in vitro* chez les cellules de type II en culture montre que la présence de bumétanide (un inhibiteur du transporteur) ou l'absence de glucose n'affectent pas l'entrée du sodium. Il est donc possible que le co-transporteur sodium-glucose soit endommagé par la méthode d'isolement ou que son activité diminue durant la période de culture.

Le sodium pénètre donc dans la cellule du côté apical principalement par des canaux sodiques (figure 1). L'amiloride, un diurétique, a la capacité d'inhiber le transport du sodium en bloquant ces canaux. Plusieurs études utilisant ce diurétique démontrent que l'entrée du sodium se fait du côté apical des cellules de type II. Lorsqu'on instille l'amiloride dans des poumons isolés ou *in situ*, on bloque principalement le transport sodique transépithélial de 30 à 70% (Basset *et al.* 1987a, b, et Effros *et al.* 1989). Des résultats similaires sont obtenus *in vivo* (Berthiaume *et al.* 1987). Une conductivité au sodium de faible affinité pour l'amiloride a été décrite chez les cellules alvéolaires de type II, utilisant le modèle de vésicules membranaires; cette conductivité est attribuée aux canaux sodiques (Matalon *et al.* 1991). Finalement, chez les cellules de type II, la présence de ces canaux sodiques a été démontrée par immunofluorescence (Matalon *et al.* 1992). Des données obtenues à partir de deux différentes méthodes, soit par *patch clamp*

en configuration *whole-cell*, soit par la mesure du courant électrogénique du sodium dans des vésicules membranaires, appuient la présence de canaux sodiques sensibles à l'amiloride (Bubien *et al.* 1990, résumé, et Matalon *et al.* 1991). Des études de buvardage de type Northern ont aussi confirmé la présence de ces canaux chez les cellules de type II (O'Brodovich *et al.* 1993, Voilley *et al.* 1994, et Yue *et al.* 1995).

Le sodium, ayant pénétré la cellule, doit en ressortir afin de préserver l'état homéostatique de la cellule. La seule voie de sortie du sodium est la pompe Na^+/K^+ -ATPase, qui elle, est située du côté basolatéral des cellules de type II (figure 1). L'ouabaïne, un bloqueur de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, réduit de manière significative le flux sodique unidirectionnel (Basset *et al.* 1987a, et Goodman *et al.* 1987) ainsi que le taux d'absorption liquidienne dans les poumons perfusés (Basset *et al.* 1987a, et Effros *et al.* 1987). Ceci confirme le rôle que joue la pompe Na^+/K^+ -ATPase basolatérale dans le transport du sodium et d'eau à partir de l'alvéole. Il existe, en plus du transport actif, un transport paracellulaire passif de sodium suivant un gradient de concentration (figure 1). Ce type de transport est cependant limité par la faible perméabilité de l'épithélium au sodium. Dans ces expériences, le transport paracellulaire n'est pas affecté, indiquant qu'il s'agit bien d'un transport trans-cellulaire inhibé par l'ouabaïne (Goodman *et al.* 1987). Ce transport transépithélial de sodium entraîne passivement un flux d'eau.

En résumé, des canaux sodiques hautement sélectifs sont exprimés à la surface apicale des cellules de type II dans le poumon. Le sodium qui entre par ces canaux est expulsé par le biais de la pompe Na^+/K^+ -ATPase située à la membrane basolatérale (Champigny *et al.* 1994, Garty 1994, Palmer 1995, Renard *et al.* 1994, et Rossier *et al.* 1994). L'entrée du sodium par ENaC, un canal sodique épithélial, est l'étape limitante de ce processus de réabsorption (Garty et Benos 1988).

2.3. PROPRIÉTÉS D'ENaC, UN CANAL SODIQUE ÉPITHÉLIAL (Garty 1994, et Lingueglia *et al.* 1996)

2.3.1. DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE GRANDE FAMILLE DE CANAUX SODIQUES ÉPITHÉLIAUX

Récemment, un canal sodique sensible à l'amiloride a été cloné à partir d'une banque d'ADNc provenant du colon du rat (Canessa *et al.* 1993, et Lingueglia *et al.* 1993). Ce canal nommé ENaC (*Epithelial Na⁺ Channel*) est formé de trois sous-unités homologues, α , β et γ (Canessa *et al.* 1994). Les travaux de Canessa *et al.* (1994) et de Renard *et al.* (1994) ont permis de distinguer des éléments de la topologie membranaire de la sous-unité α d'ENaC. Globalement, α -ENaC est composé de deux domaines hydrophobiques transmembranaires (M1H1 et H2M2) en forme d'hélice α , entrecoupés d'une longue boucle extracellulaire d'environ 500 acides aminés (figure 2). Des travaux de mutagénèse dirigée combinés à l'expression dans des ovocytes ont permis d'impliquer le deuxième domaine transmembranaire de la sous-unité α dans la formation du pore du canal (Waldmann *et al.* 1995a). Les domaines terminaux NH₂ et COOH sont cytoplasmiques et possèdent des sites potentiellement régulateurs tels que des sites consensus pour la PKC et une région riche en proline capable de s'attacher à un domaine SH3 (*Sarc-homology type 3*) (Rotin *et al.* 1994). La boucle extracellulaire est parsemée de six sites consensus de glycosylation aux résidus asparagine. On y retrouve aussi une région riche en cystéine.

Les trois sous-unités d'ENaC montrent une homologie de séquence similaire comparée aux dégénélines, une famille de protéines retrouvées dans les neurones mécanosensitifs et les interneurons chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. ENaC ne montre toutefois pas d'homologie avec d'autres canaux sodiques épithéliaux. Mais récemment, un ADNc isolé et amplifié à partir de tissus du système

Structure topologique de rENaC

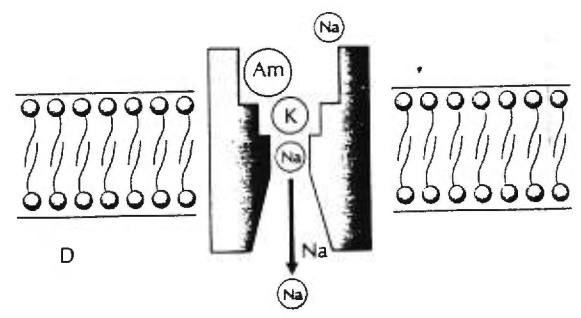
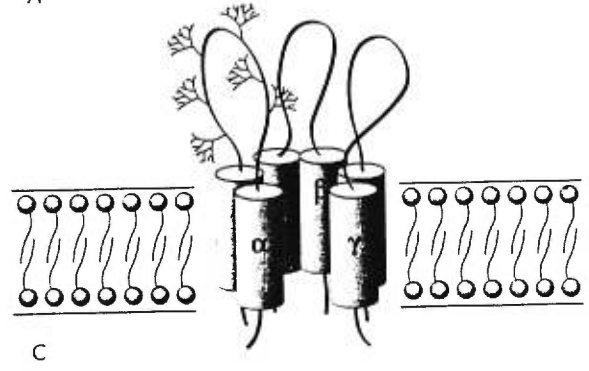
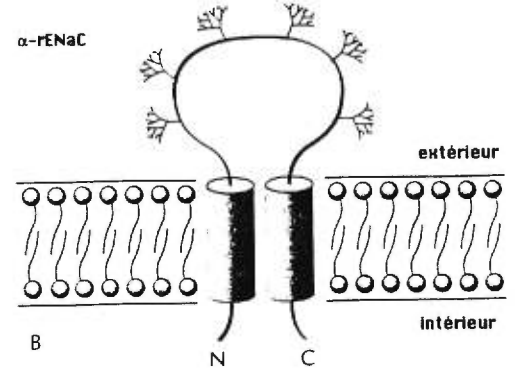
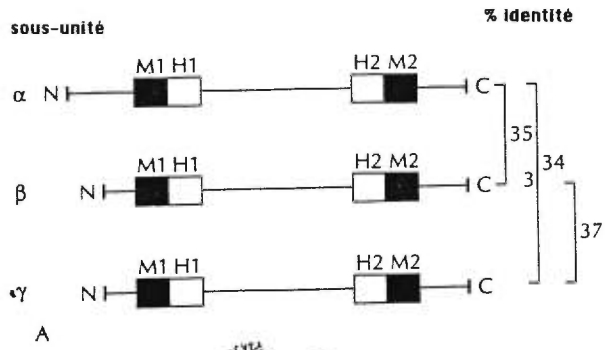


figure 2

nerveux central de l'escargot *Helix aspersa* a permis de caractériser un canal sodique sensible à l'amiloride (Lingueglia *et al.* 1995). Ce canal (FaNaCh) est activé par un peptide appelé FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) présent dans le système nerveux des invertébrés et des vertébrés. Tout comme ENaC, FaNaCh est sensible à l'amiloride et peut être bloqué par ce diurétique. Au niveau de sa séquence protéique, ce canal montre une très faible homologie comparée aux autres protéines de la famille; le plus haut degré d'homologie se situe au deuxième domaine transmembranaire (32-36%) puis au premier domaine hydrophobique et la région riche en cystéine (21-27%). C'est la structure globale de la protéine qui est cependant très similaire à ENaC et aux dégénérines. Très récemment, un canal sodique découvert dans le cerveau de l'humain (BNC1 - *Brain Na⁺ Channel 1*) s'est ajouté à la liste des canaux semblables à ENaC (Price *et al.* 1996); les travaux de Waldmann *et al.* (1996) ont décrit le même clone qu'ils ont associé à une dégénérine de mammifère (MDEG - *Mammalian Degenerin*).

On peut donc envisager l'existence d'une grande famille de canaux ioniques ayant une structure semblable impliqués dans la perception, la modulation neuronale et la régulation du volume cellulaire (revu par North, 1996). Comme on retrouve des représentants de ces canaux depuis les nématodes en montant jusqu'aux mammifères, leur omniprésence dans le règne animal suggérerait qu'ils jouent un rôle capital tout au long de l'évolution. De plus, on retrouve ENaC dans plusieurs tissus chez les mammifères - partie distale du colon, tubule distal du rein, épithélium pulmonaire, peau, vessie, glande sudoripare, glande salivaire, etc. (Lindemann 1984, Garty et Benos 1988, et Palmer 1992) - ce qui renforce le rôle fondamental de cette famille de canaux.

2.3.2. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

L'amiloride ainsi que ses dérivés sont les marqueurs universels des canaux sodiques épithéliaux. En particulier, ENaC montre une grande spécificité à l'amiloride; la IC_{50} pour l'amiloride se situe entre 0.05 et 0.5 μM , alors que celle pour la benzamide et la phénamide est de 10 à 20 fois inférieure. Le dérivé EIPA est un bloqueur beaucoup moins efficace ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ (Kleyman et Cragoe 1990)). Les échangeurs Na^+-H^+ et $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ représentant une autre porte d'entrée pour le sodium, montrent un profil d'inhibition très différent. En résumé, on peut définir l'affinité des différents bloqueurs pour le canal sodique comme suit: benzamide ou phénamide > amiloride >> EIPA. L'amiloride a la capacité de s'attacher à une partie du canal située dans le pore, et la sous-unité α semble être principalement responsable de cette liaison (Busch *et al.* 1996, Horisberger *et al.* 1994, Li *et al.* 1995, Lin *et al.* 1994, et Waldmann *et al.* 1995a).

2.3.3. PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES

De nombreux travaux utilisant la technique de *patch clamp* démontrent que les canaux sodiques apicaux possèdent une grande variabilité biophysique. Des études de reconstitution dans des ovocytes ont permis de comprendre que le canal sodique épithélial sensible à l'amiloride est composé de plusieurs entités protéiques. Lorsque les trois sous-unités de rENaC sont co-exprimées, le canal reconstitué montre les mêmes propriétés que le complexe protéique initialement découvert. Grâce à la technique de *patch clamp*, Canessa *et al.* (1994) ont identifié un canal indépendant du voltage, sélectif au sodium (conductance de 4.5 pS), et sélectif au lithium (conductance de 6.5 pS), mais non perméable au potassium. Ce canal est identique à celui décrit dans les tissus intacts (Palmer 1992, et Voilley *et al.* 1994). Il partage

les mêmes propriétés que celui reconstitué à partir de clones de *Xenopus laevis* (Puoti *et al.* 1995) et de clones humains (McDonald *et al.* 1995, et Waldmann *et al.* 1995b). Les trois sous-unités d'ENaC clonées à partir d'une banque d'ADNc de poumon humain et exprimées dans des ovocytes génèrent un canal indépendant du voltage, sélectif pour le sodium (conductance de 5.6 pS), sélectif pour le lithium (7.8 pS), mais non perméable au potassium (Voilley *et al.* 1994, Voilley *et al.* 1995, et Waldmann *et al.* 1995b). En comparant les propriétés des canaux ENaC de l'humain et du rat, les sous-unités peuvent être interchangeables sans affecter la fonction du canal lorsqu'on les exprime dans le système des ovocytes (McDonald *et al.* 1995).

Ce canal à haute sélectivité a été détecté dans le poumon du rat et dans les cellules du poumon fœtal du rat en culture primaire (Voilley *et al.* 1994). Il fait partie d'un groupe de canaux dont la sélectivité au sodium est très supérieure au potassium (10 fois et plus), ayant une faible conductance (~5 pS), et un long temps d'ouverture et de fermeture (0.5-5 s).

2.3.4. PROPRIÉTÉS ET ORGANISATION MOLÉCULAIRES

Un clone de 3081 nucléotides codant pour une protéine de 699 acides aminés a été isolé (Canessa *et al.* 1993, et Lingueglia *et al.* 1993); on le nomme α -rENaC. Son homologue humain (α -hENaC) a par la suite été identifié (McDonald *et al.* 1994, et Voilley *et al.* 1994); il a été cartographié et localisé au chromosome 12p13 (McDonald *et al.* 1995, et Voilley *et al.* 1994); la protéine humaine est composée de 669 acides aminés et partage 83% d'homologie avec la protéine du rat. Les propriétés fonctionnelles d' α -hENaC sont identiques à celles d' α -rENaC lorsqu'elles sont exprimées dans des ovocytes de *Xenopus* (Voilley *et al.* 1994).

Les travaux poursuivis par Canessa *et al.* (1994) et Lingueglia *et al.* (1994) ont permis d'identifier deux autres sous-unités du canal, β et γ , dont les ADNc repêchés d'une banque de cellules épithéliales du colon du rat sont respectivement homologues à 34 et 35% par rapport à la sous-unité α (figure 2). Les sous-unités humaines β et γ partagent un fragment commun de 400 kb au chromosome 16p12-p13 (Voilley *et al.* 1995); on détecte aussi une forme tronquée en 3' de la sous-unité β qui pourrait être impliquée dans une forme rare d'hypertension.

Le messager d' α -rENaC est abondant dans les tissus exprimant les canaux sodiques tels que l'épithélium de la partie distale du colon, la vessie, l'épithélium pulmonaire, le placenta, la portion sécrétrice des glandes salivaires et sudoripares, et les parties corticale et médullaire du rein. On note une faible présence du messager dans le colon proximal, l'utérus, la thyroïde et l'intestin, et il est absent dans le cerveau, le lit capillaire de la barrière hémato-encéphalée, le foie, le duodénum, le jéjunum, l'estomac, le muscle (strié ou lisse), et le cœur (Canessa *et al.* 1994, Li *et al.* 1994, Renard *et al.* 1995, et Voilley *et al.* 1994). Un patron d'expression semblable a été observé pour les trois sous-unités en utilisant des anticorps spécifiques marqués (Duc *et al.* 1994, et Voilley *et al.* 1995). Dans le poumon du nouveau-né, les messagers d' α -rENaC augmentent considérablement juste avant et après la naissance (Dagenais *et al.* 1997, et Voilley *et al.* 1994). Dans le poumon du rat adulte, les sous-unités α , β et γ qui forment le canal ENaC codent pour des messagers de 3.7, 2.2 et 3.2 kb respectivement (Canessa *et al.* 1994, et Matsushita *et al.* 1996). La protéine de 78 kDa peut être glycosylée en présence de microsomes pour produire une bande de 92 kDa (Canessa *et al.* 1994, et Lingueglia *et al.* 1993).

Des études chez les ovocytes de *Xenopus laevis* attestent que l'expression des sous-unités β et γ de rENaC, ensemble ou séparément, ne produisent que très peu d'activité. Toutefois, lorsque les trois sous-unités sont exprimées simultanément, le courant sensible à l'amiloride

dépasse de 100 fois celui d' α -rENaC seule (Canessa *et al.* 1994).

Des études utilisant les techniques de liaison à haute affinité pour des analogues de l'amiloride marqués ont tenté de caractériser le complexe protéique sensible à l'amiloride. Benos *et al.* (1986, 1987) identifient un hétéro-oligomère de ~700 kDa à partir de cellules A6 et de la papille rénale bovine; l'amiloride se lie à une sous-unité de 150 kDa. De plus, des travaux utilisant des techniques immunologiques confirment la présence du complexe multimérique de 700 kDa. Un anticorps polyclonal dirigé envers le complexe purifié le localise à la surface apicale des cellules A6 (Tousson *et al.* 1989) et à des parties spécifiques des tubules rénaux (Brown *et al.* 1989). L'immunoprécipitation pratiquée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique (anti-anti-amiloride) a aussi permis d'identifier une protéine de 110-140 kDa liant l'amiloride chez la lignée cellulaire A6 (Kleyman *et al.* 1991, et Kleyman *et al.* 1992). La dissection du complexe génère des variantes chez les sous-unités, suggérant que les complexes hétéro-oligomériques ne sont pas nécessairement identiques.

En résumé, le polypeptide de 150 kDa contient le site liant l'amiloride qui peut ainsi bloquer le pore des canaux hautement ou modérément sélectifs. D'autres sous-unités servent à la régulation par la PKA et la PKC. Mais il est possible qu' α , β et γ -ENaC ne soient pas les seules sous-unités présentes dans le complexe authentique et que d'autres polypeptides participent à la formation ou à la régulation du complexe conducteur. Le complexe de 700 kDa pourrait être composé d'un nombre variable de chacune des sous-unités. Toutefois, il n'est pas encore clair si ce complexe de 700 kDa contient ou pas ENaC.

2.3.5. RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE

Un nombre considérable d'études, de travaux et d'auteurs associent les canaux sodiques présents dans le poumon adulte, le poumon fœtal, l'épithélium pulmonaire ou les cellules alvéolaires de type II à la réabsorption de sodium suivie d'un flux passif d'eau (revu par Matthay *et al.* 1996). Parmi ces travaux, certains concluent que ce mécanisme de transport transépithélial de sodium et d'eau est responsable de la réabsorption du liquide présent dans les poumons à la naissance, et qu'il pourrait être impliqué dans la résorption de l'œdème pulmonaire. D'ailleurs, Hummler *et al.* (1996) ont élaboré un modèle de souris où les deux allèles d' α -mENaC ont été invalidés par l'insertion d'un transgène. Les poumons démontrent une incapacité de produire un transport sodique sensible à l'amiloride; les souris homozygotes (ENaC^{-/-}) développent un syndrome de détresse respiratoire aiguë et meurent dans les heures suivant la naissance. Ces souris sont incapables de se départir du liquide alvéolaire sécrété durant la vie fœtale afin d'accéder à la vie aérienne. Ces travaux sont d'une grande importance en terme clinique lorsqu'on sait qu'une des causes majeures de mortalité chez le nouveau-né (humain) prématuré est le syndrome de détresse respiratoire caractérisé par un engorgement du liquide fœtal dans les voies aériennes. La compréhension et la régulation du mécanisme du transport sodique par ENaC pourrait donc avoir un impact dans le traitement de symptômes liés à l'œdème pulmonaire.

Des mutations des sous-unités d'ENaC sont également impliquées dans différentes pathologies, dont deux types de syndromes liés au contrôle de la pression sanguine (Hummler et Rossier 1996). Il s'agit du syndrome de Liddle et du pseudohypoaldostéronisme de type I.

Premièrement, le syndrome de Liddle (Liddle *et al.* 1963) est une maladie monogénique autosomique dominante (Botero-Velez *et al.* 1994) qui se manifeste par une hypertension sensible au sel (pseudo-

hyperaldostéronisme). Des mutations ponctuelles et des délétions de l'extrémité COOH-terminale des sous-unités β et γ d'ENaC seraient responsables de ce syndrome (Hansson *et al.* 1995a, Hansson *et al.* 1995b, et Shimkets *et al.* 1994). Le canal prendrait le phénotype hyperactif ce qui génère un gain de fonction (Schild *et al.* 1995, Schild *et al.* 1996, et Snyder *et al.* 1995). Un motif consensus PPxY (Pro-Pro-X-Tyr) impliqué dans l'interaction protéine-protéine (Sudol *et al.* 1995) et localisé à l'extrémité COOH jouerait un rôle essentiel dans la régulation de l'activité du canal, et sa délétion entraînerait une activité constitutive du canal (Einbond et Sudol 1996, Hansson *et al.* 1995a, Schild *et al.* 1996, et Tamura *et al.* 1996). Cette séquence consensus en C-terminal du canal aurait la capacité de lier la protéine NEDD-4 qui agirait comme répresseur du canal (Staub *et al.* 1996); lorsque cette région du canal est mutée ou délétée, la protéine NEDD-4 ne peut plus agir et le canal devient hyperactif. De plus, les travaux d'Ismailov *et al.* (1996) suggèrent qu'un peptide inhibiteur présent dans le complexe ENaC serait absent chez les patients souffrant du syndrome de Liddle.

Deuxièmement, le pseudohypoaldostéronisme de type 1 (PHA1) a aussi été associé à des mutations d'ENaC (Bubien *et al.* 1996, Chang *et al.* 1996, et Strautnieks *et al.* 1996). Cette maladie à transmission autosomique récessive, caractérisée par une perte de sel, se définit par une hypovolémie, une acidose métabolique et une hyperkaliémie sévère qui peut conduire rapidement à la mort. Des délétions importantes de la sous-unité α ont été identifiées, ainsi qu'une mutation ponctuelle de la sous-unité β et une mutation de la sous-unité γ , entraînant une diminution de l'activité d'ENaC (Bubien *et al.* 1996, Chang *et al.* 1996, et Strautnieks *et al.* 1996).

La fibrose kystique a aussi été associée à une augmentation de l'activité d'ENaC. Cette maladie est caractérisée par une réduction de la sécrétion de chlore dans l'épithélium pulmonaire, accompagnée d'une augmentation de deux fois la perméabilité au sodium au niveau de

canaux sodiques sensibles à l'amiloride situés du côté apical de l'épithélium (Boucher *et al.* 1988, et Willumsen et Boucher 1991). De plus, Stutts *et al.* (1995) ont démontré que le canal CFTR agissait comme régulateur d'ENaC. Il est possible que cette augmentation de l'activité des canaux sodiques provienne de leur expression accrue, de modifications dans le recyclage des membranes (Bradbury *et al.* 1992) ou du contrôle indirect par la concentration intracellulaire d'anions (Dinudom *et al.* 1995). D'autre part, cette réabsorption accrue de sodium pourrait être responsable de la déshydratation des voies respiratoires facilitant alors les infections pulmonaires chroniques observées chez les patients atteints de la fibrose kystique (Jiang *et al.* 1993). Des études cliniques ont démontré qu'un traitement à l'amiloride montre des effets bénéfiques (Knowles *et al.* 1990), et d'autres études se poursuivent dans le même sens (Delaney et Wainwright 1996). Des antibiotiques tels que la triméthoprime et la tétracycline, inhibant l'absorption du sodium dans l'épithélium de la trachée du mouton, pourraient aussi servir de traitement contre la fibrose kystique (Middleton *et al.* 1996).

2.4. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE LA POMPE Na⁺/K⁺-ATPase

La pompe Na⁺/K⁺-ATPase est une enzyme membranaire qu'on retrouve pratiquement partout dans l'organisme (Sweadner 1989). Elle expulse trois ions sodium hors de la cellule contre deux ions potassium dans la cellule. Elle fonctionne contre un gradient électrochimique, c'est pourquoi elle requiert de l'énergie; l'ATP hydrolysée en ADP libérant un groupement phosphate sert à cette fin (Alberts *et al.* 1990). La phosphorylation de l'ATPase par le dernier groupement phosphate de l'ATP est dépendante du sodium, tandis que l'hydrolyse de ce groupement phosphate transféré est dépendant du potassium.

L'ouabaine, un inhibiteur spécifique de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, intervient à cette deuxième étape du processus de transport pour ainsi bloquer le fonctionnement de la pompe (Alberts *et al.* 1990).

La pompe constituée des sous-unités α et β représente l'unité fonctionnelle (Sweadner 1989). La sous-unité α de 110 kDa inclut le site d'attachement du sodium, du potassium de l'ouabaine et de l'ATP; la sous-unité β de 35-55 kDa est fortement glycosylée et n'a pas de fonction bien définie autre que celle d'être nécessaire au fonctionnement de l'enzyme (Sweadner 1989, et Lingrel 1992). La sous-unité α de la pompe se présente sous trois isoformes distinctes connues, α_1 , α_2 , et α_3 ; leurs séquences protéique et nucléotidique sont spécifiques, elles ont une distinction antigénique, et leur affinité pour l'ouabaine est particulière à chacune d'elle (Berrebi-Bertrand *et al.* 1988, et Lingrel 1992). La sous-unité β comprend aussi au moins trois isoformes (Akopyanz *et al.* 1991, et Lingrel 1992). Les isoformes des sous-unités α et β sont distribuées spécifiquement selon le tissu, mais la sous-unité α_1 se retrouve dans presque tous les tissus.

Dans le poumon, l'isoforme 1 de la sous-unité α est prédominante par rapport aux autres isoformes et aux sous-unités β (Lingrel *et al.* 1988, Orłowski et Lingrel 1988, et Sweadner 1989). Son messenger d'ARN est formé de 3.7 kb (Ewart et Klip 1995). Avant la naissance, la quantité des messagers de la sous-unité α_1 dans le poumon est en croissance constante jusqu'à l'âge adulte où la quantité de protéine a atteint son niveau optimal (Orłowski et Lingrel 1988).

La localisation basolatérale de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans les épithéliums lui permet de contribuer au transport transépithélial; elle constitue la seule voie de sortie du sodium connue. Sa concentration dans le poumon est l'une des plus importantes dans l'organisme (Bonting *et al.* 1961). En utilisant des techniques

d'immunofluorescence indirecte et de cytochimie ultrastructurale, Schneeberger et McCarthy (1986) ont démontré la localisation basolatérale chez les cellules alvéolaires de type II, et leur faible quantité chez les cellules de type I.

À la naissance, on sait que l'épithélium pulmonaire passe du mode sécrétoire au mode absorbant afin de permettre la respiration aérienne. Ceci implique donc des changements dans la régulation du transport transépithélial, dont une augmentation de l'activité physiologique de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Cette dernière est régulée de deux manières lors de ce processus: l'activité cellulaire totale de la pompe peut être augmentée en raison d'une augmentation de l'activité moléculaire ou d'une augmentation du nombre de pompes à la surface de la cellule (Chapman *et al.* 1990).

2.5. RÉGULATION HORMONALE DU TRANSPORT SODIQUE

Les hormones se définissent comme étant des substances libérées par l'organisme jouant le rôle de messagers chimiques permettant de régler des fonctions physiologiques de cet organisme. En d'autres mots, elles rendent possible le maintien de l'homéostasie. Le transport transépithélial du sodium est une fonction essentielle à l'homéostasie, et il est facile de comprendre qu'il doit être régulé en fonction de demandes particulières d'un organisme complexe. Des hormones sont donc impliquées dans la régulation de cette fonction.

D'ailleurs, de nombreux travaux démontrent que les hormones à la naissance jouent un rôle dans le contrôle liquidien. Durant la gestation, les poumons du fœtus sont remplis de liquide grâce à la fonction sécrétrice du poumon. Un mécanisme impliquant le transport sodique favorise la réabsorption du liquide permettant au nouveau-né de passer à la respiration aérienne; le poumon devient alors un organe

d'absorption. L'implication des récepteurs β -adrénergiques dans le processus de réabsorption liquidienne chez le fœtus a été démontré (Walters et Oliver 1978). Les effets du travail peuvent être reproduits par une stimulation β -adrénergique (Brown *et al.* 1983, Enhorning *et al.* 1977, O'Brodovich 1991, Oliver *et al.* 1981, et Walters *et al.* 1990). L'amiloride a le pouvoir de bloquer ces effets (Oliver *et al.* 1986). Or, nous savons que l'AMPc agit en tant que second messenger dans la cascade β -adrénergique (Lefkowitz et Caron 1985), et que les effets observés suite à une stimulation β -adrénergique chez le fœtus découlent de l'AMPc, en passant par la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques (Barker *et al.* 1988, et Walters *et al.* 1990). De plus, les cellules alvéolaires de type II possèdent des récepteurs β -adrénergiques (Sommers Smith et Giannopoulos 1983); elles pourraient donc être le site de ce processus. La vasopressine, une hormone présente à un taux élevé à la naissance, pourrait aussi être importante lors de la réabsorption du liquide des poumons à la naissance (Cassin et Perks 1993).

Les agents β -adrénergiques ainsi que l'AMPc démontrent aussi un effet sur la clairance liquidienne dans le poumon adulte. Des études *in vivo* utilisant une combinaison de dbAMPc et d'aminophylline (un inhibiteur de la phosphodiesterase) ont permis de démontrer une augmentation de la clairance liquidienne, suggérant ainsi l'implication des voies de signalisation dépendantes de l'AMPc dans ce processus (Berthiaume 1991). Les travaux effectués sur des poumons isolés et perfusés permettent d'arriver aux mêmes conclusions. Des agents β -adrénergiques, l'AMPc et ses analogues, ainsi que des inhibiteurs de la phosphodiesterase favorisent le transport liquidien et sodique depuis l'espace alvéolaire, à travers l'épithélium intact (Crandall *et al.* 1986, Goodman *et al.* 1989, et Saumon *et al.* 1987).

Des observations semblables ont été faites chez les cellules alvéolaires de type II en monocouche. Mason *et al.* (1982) rapportent l'influence positive de la terbutaline sur la formation des dômes qui

représentent un indice du transport transépithélial. De plus, ils notent une augmentation de la différence de potentiel suite à l'ajout de la terbutaline; cette différence de potentiel est bloquée par l'amiloride du côté apical des cellules, et par l'ouabaine du côté basolatéral. Goodman *et al.* (1984) ont testé plusieurs produits sur les cellules de type II en monocouche afin d'en déterminer l'impact sur la formation des dômes. Des analogues de l'AMPc, des inhibiteurs de la phosphodiesterase, l'hormone anti-diurétique, et des agents β -adrénergiques ont tous augmenté significativement la formation des dômes. Une augmentation du courant et une baisse de la résistance sont observées lorsqu'on traite ces cellules avec le même type d'agents qui augmentent la concentration intracellulaire en AMPc (Cott *et al.* 1986). D'ailleurs, Cheek *et al.* (1989) concluent que des traitements à l'ouabaine, l'amiloride, et à la terbutaline produisent des changements au niveau des propriétés bioélectriques chez les cellules alvéolaires formant une monocouche, et que ces changements sont conformes à la présence d'une barrière épithéliale polarisée où se produit un transport actif de sodium du côté apical vers le côté basolatéral. Les voies de signalisation impliquées dans le transport sodique ne sont toutefois pas élucidées.

2.5.1. FONCTIONNEMENT DES VOIES DE SIGNALISATION DÉPENDANTES DE L'AMPc (Borrelli *et al.* 1992, Meyer et Habener 1993, et Sassone-Corsi 1994)

Les protéines et les peptides agissant comme hormones hydrosolubles ne peuvent traverser la double couche lipidique qui forment la membrane plasmique. Beaucoup d'hormones (premiers messagers) agissent alors par l'intermédiaire de seconds messagers intracellulaires. Parmi ces derniers, le système de transduction du signal utilisant l'AMPc est l'un des mieux connus et l'un des plus utilisés par l'organisme. La figure 3 montre que lorsqu'une hormone (Ter) se lie

à son récepteur spécifique ($R-\beta_2$) associé à l'adénylate cyclase (AC), cette enzyme membranaire est activée et catalyse la conversion d'ATP intracellulaire en AMPc. Cette réaction nécessite la présence d'une protéine G (Gs) qui active l'adénylate cyclase (McKnight *et al.* 1988). L'hydrolyse de la GTP, un composé riche en énergie, permet la conversion du premier message hormonal en un deuxième message sous l'action de la protéine G grâce à son activité GTPase. L'AMPc intracellulaire ainsi libérée a la capacité de déclencher une série de réactions chimiques, dont l'activation de la protéine kinase A (PKA). Lorsque l'AMPc se lie de manière coopérative aux deux sites de la sous-unité régulatrice (R) de la PKA, la sous-unité catalytique (C) est activée (C \star) puis relâchée (Lalli et Sassone-Corsi 1994, et Roesler *et al.* 1988). Cette sous-unité catalytique ainsi activée a la capacité de phosphoryler plusieurs protéines cytoplasmiques et nucléaires à la position sérine, suivant le patron X-Arg-Arg-X-Ser-X, où le X représente n'importe quel acide aminé (Edelman *et al.* 1987, Kemp *et al.* 1977, McKnight *et al.* 1988, et Zetterquist *et al.* 1976). Ceci peut déclencher des réactions dont l'activation d'enzymes, la sécrétion, des modifications de la perméabilité de la membrane aux ions, l'activation de gènes, etc.

Donc, à la suite d'une stimulation β -adrénergique, l'augmentation intracellulaire d'AMPc active la PKA; ultimement, les protéines phosphorylées par la PKA vont, dans le compartiment nucléaire, influencer la transcription de gènes sur des sites pouvant être induits au niveau du promoteur (Ziff 1990, et Borrelli *et al.* 1992). Ces facteurs nucléaires forment une famille de protéines qui peuvent agir comme activateur ou répresseur; ils viennent s'associer à un élément spécifique du promoteur d'un gène qu'on appelle CRE (Cyclic AMP Response Element) et qui correspond à la séquence 5'-GTGACGTA/CA/G-3' (Montminy *et al.* 1986); c'est la séquence nécessaire au contrôle de la transcription par l'AMPc (Lin et Green 1988), et elle est reconnue par les protéines se liant au CRE (CREB - *CRE-binding protein*). Un autre

Voie de signalisation de l'AMPC et son implication possible sur l'expression de rENaC

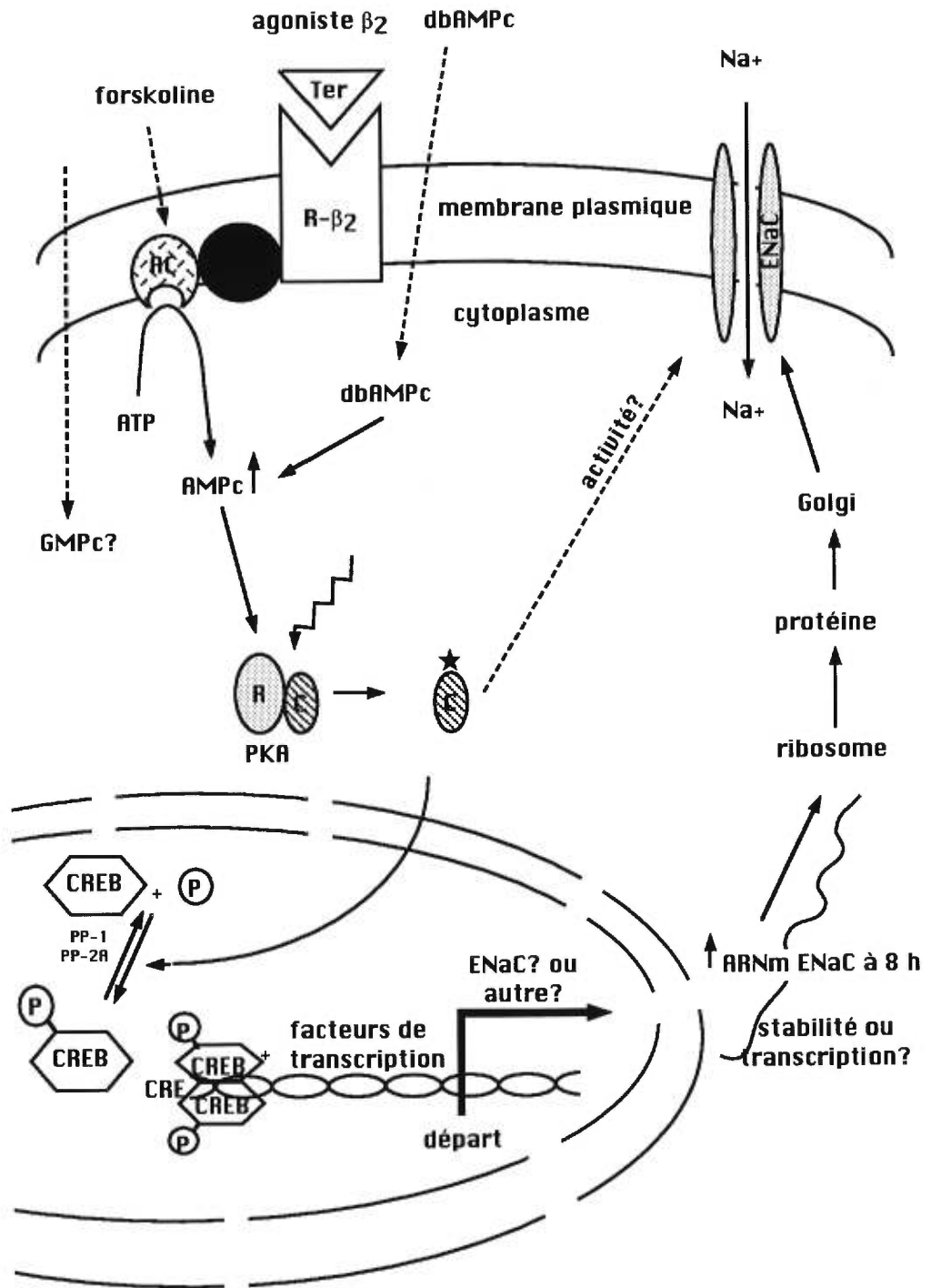


figure 3

élément très semblable dans le promoteur a été identifié qu'on a appelé un site ATF, et dont les facteurs de transcription nommés ATF ont la capacité de se lier à ces sites semblables aux CRE (Lee *et al.* 1987, Leza et Hearing 1989, et Lin et Green 1988); ces facteurs sont aussi sensibles à l'AMPc intracellulaire (Leza et Hearing 1989, et Lin et Green 1988).

Cette famille de protéines nucléaires est donc appelée CREB/ATF, et lorsqu'elles se lient à un élément d'ADN dans le promoteur d'un gène, elles contrôlent le taux d'expression en activant ou en réprimant la transcription de ce gène. CREB a été la première protéine nucléaire de cette famille à être identifiée (Hoeffler *et al.* 1988). Plusieurs autres facteurs ont été découverts à l'aide d'un criblage de banques d'ADNc par des sites CRE et ATF (Foulkes *et al.* 1991, et Hai *et al.* 1989). Ils possèdent tous un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation. Ils font partie de la classe des facteurs de transcription *basic leucine zipper* (bZip) dont les domaines fonctionnels sont bien conservés (Hai *et al.* 1989), et ont la capacité de former des hétérodimères selon certaines combinaisons spécifiques. Les facteurs CREB, CREM τ et ATF1 interviennent dans l'activation de la transcription (Foulkes *et al.* 1992, Gonzalez et Montminy 1989, et Rehfuss *et al.* 1991). Tandis que les isoformes CREM α , β et γ (Laoide *et al.* 1993), et les ICER (*cAMP-inducible repressors*) (Molina *et al.* 1993, et Stehle *et al.* 1993) provenant de l'épissage alternatif de CREM, ainsi que les produits des gènes E4BP4 et CREB-2 (Cowell *et al.* 1992, et Karpinski *et al.* 1992) agissent comme des antagonistes de la transcription induite par l'AMPc.

Ces protéines régulatrices contiennent plusieurs sites consensus dans le domaine inductible par les kinases (KID - *kinase-inducible domain*) (Gonzalez *et al.* 1991) permettant à plusieurs kinases de les phosphoryler (de Groot *et al.* 1993a, b, Gonzalez et Montminy 1989, et Lee *et al.* 1990). La transcription est pleinement active lorsque CREB

est phosphorylée par la PKA en position Ser 133 et Ser 119 (Gonzalez et Montminy 1989, et Lee *et al.* 1990). La protéine CBP (*CREB-binding protein*) vient ensuite se lier à CREB phosphorylée (Chrivia *et al.* 1993), ce qui facilite l'adhésion du facteur de transcription TFIIIB pour former le complexe de pré-initiation, et ainsi démarrer la transcription à l'aide de la polymérase ARN II (Kwok *et al.* 1994).

Le gène de CREM a la capacité de s'autoréguler. Suite à un traitement à la forskoline ou d'analogues de l'AMPc, la transcription de CREM augmente rapidement en 30 minutes, montrant un pic à 2 heures, et une chute au taux de base après 5 heures. Ceci est typique des gènes à réponse rapide. Cette réponse de CREM est spécifique à la voie de l'AMPc puisqu'elle n'a pas lieu en présence de TPA ou de dexaméthasone (Molina *et al.* 1993).

La répression des gènes induits par l'AMPc peut agir à deux niveaux. D'abord par la déphosphorylation de CREB par des phosphatases spécifiques (Hagiwara *et al.* 1992). *In vitro*, la protéine-phosphatase-1 (PP-1) ainsi que la protéine-phosphatase-2A (PP-2A) ont la capacité de déphosphoryler CREB (Alberts *et al.* 1994, Wadzinski *et al.* 1993, et Wheat *et al.* 1994) (figure 3). Ensuite, par la présence d'antagonistes constitutifs tels que CREM α , β et γ , ainsi que les ICER, qui peuvent homodimériser ou hétérodimériser entre eux ou avec CREB, bloquant ainsi la transcription par l'occupation du site CRE (Foulkes *et al.* 1991).

2.5.2. FONCTIONNEMENT DES VOIES STÉROÏDIENNES (Wright *et al.* 1993)

Contrairement aux récepteurs β -adrénergiques qui sont situés à la surface des cellules et qui empruntent la cascade de signalisation de l'AMPc, les récepteurs stéroïdiens sont nucléaires et empruntent une toute autre voie de signalisation. Dans nos recherches, nous avons

utilisé la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, comme agent effecteur ou ligand, c'est pourquoi nous allons surtout décrire la voie de signalisation se rapportant aux glucocorticoïdes plutôt que de décrire les voies stéroïdiennes en entier. Les récepteurs à glucocorticoïdes font partie d'une grande famille de récepteurs nucléaires, incluant les récepteurs stéroïdiens, thyroïdiens et de l'acide rétinoïque. Ils partagent en plus une forte homologie avec les récepteurs à minéralocorticoïdes (Arriza *et al.* 1988, et Hollenberg *et al.* 1985); ces récepteurs reconnaissent des éléments régulateurs semblables dans le promoteur. Grâce à la forte homologie de séquence au niveau du domaine de liaison à l'hormone, les corticostéroïdes synthétiques et endogènes servent de ligands aux deux types de récepteurs (Arriza *et al.* 1987, et Evans et Arriza 1989). D'ailleurs, on sait que les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes peuvent activer la transcription de gènes par le biais des récepteurs à minéralocorticoïdes. Cependant, l'affinité de la dexaméthasone pour le récepteur à glucocorticoïdes dans le rein est beaucoup plus grande que celle pour l'aldostérone par exemple, et inversement, l'affinité de la dexaméthasone pour le récepteur à minéralocorticoïdes est beaucoup plus faible que celle pour l'aldostérone (revu par Rossier *et al.* 1985).

À la figure 4, ce ligand (Dex) pénètre la membrane cellulaire, et rejoint son récepteur spécifique (RG). En l'absence d'hormone, ce récepteur est inactivé en formant un complexe avec la protéine de choc thermique hsp90 (hsp) (Mendel *et al.* 1986), mais il conserve une grande affinité pour son hormone (Bresnick *et al.* 1989, et Nemoto *et al.* 1990). Lorsque cette hormone (Dex) se lie à son récepteur (RG), le complexe se dissocie et le récepteur est activé. Le complexe récepteur-hormone est transloqué dans le noyau (Picard et Yamamoto 1987). Dans l'ADN de gènes régulés, des dimères se fixent à des éléments spécifiques nommés GRE (Glucocorticoid Receptor Element) (Cairns *et al.* 1991, Tsai *et al.* 1988, et Wrange *et al.* 1989) ayant comme séquence consensus

AGAACAxkxkTGTTCT. À cet endroit du promoteur, il peut y avoir plusieurs éléments régulateurs, ou l'implication de d'autres facteurs de transcriptions (Lucas et Granner 1992). Ces sites GRE agissent en synergie de manière à ce que leur effet combiné soit plus grand que la somme des sites individuels (Schule *et al.* 1988, et Strahle *et al.* 1988). La transcription de ces gènes peut être activée ou réprimée en réponse à l'hormone. Pour qu'un récepteur active la transcription d'un gène, il doit interagir directement ou indirectement avec la machinerie transcriptionnelle (McEwan *et al.* 1993, et Wright *et al.* 1991), ou il doit délier la structure de la chromatine (Cordingley *et al.* 1987). Les récepteurs à glucocorticoïdes ont la capacité de dimériser avec les récepteurs à minéralocorticoïdes (Trapp *et al.* 1994), ce qui ajoute une complexité dans la régulation stéroïdienne des gènes.

L'activation de la transcription de gènes régulés par les corticostéroïdes nécessite plusieurs domaines physiquement distincts sur le récepteur, et qui sont codés par le gène du récepteur à glucocorticoïde (Encio et Detera-Wadleigh 1991). La partie N-terminale du récepteur possède le domaine de transactivation (Hollenberg et Evans 1988). La portion centrale constitue le domaine de liaison à l'ADN; il est formé de deux motifs en doigts de zinc ayant la capacité d'enfermer un ion zinc par la présence de quatre résidus cystéine (Freedman *et al.* 1988). L'extrémité C-terminale peut lier l'hormone et interagir avec hsp90.

Plusieurs travaux ont étudié l'impact des minéralocorticoïdes, plus précisément l'aldostérone, sur le transport sodique des épithéliums (Bastl et Hayslett 1992, Benos 1991, Devuyst *et al.* 1995, Garty 1986, Garty et Asher 1991, Girardet *et al.* 1986, Horisberger et Rossier 1992, Palmer *et al.* 1991, Sariban-Sohraby et Fisher 1995, Stanton 1991a, et Verrey 1995); on comprend déjà assez bien leur effet dans le rein. Toutefois, bien peu se sont attardés à l'effet des glucocorticoïdes dans le poumon, sauf peut-être chez le fœtus où ils jouent un rôle dans la

Voie de signalisation empruntée par les glucocorticoïdes

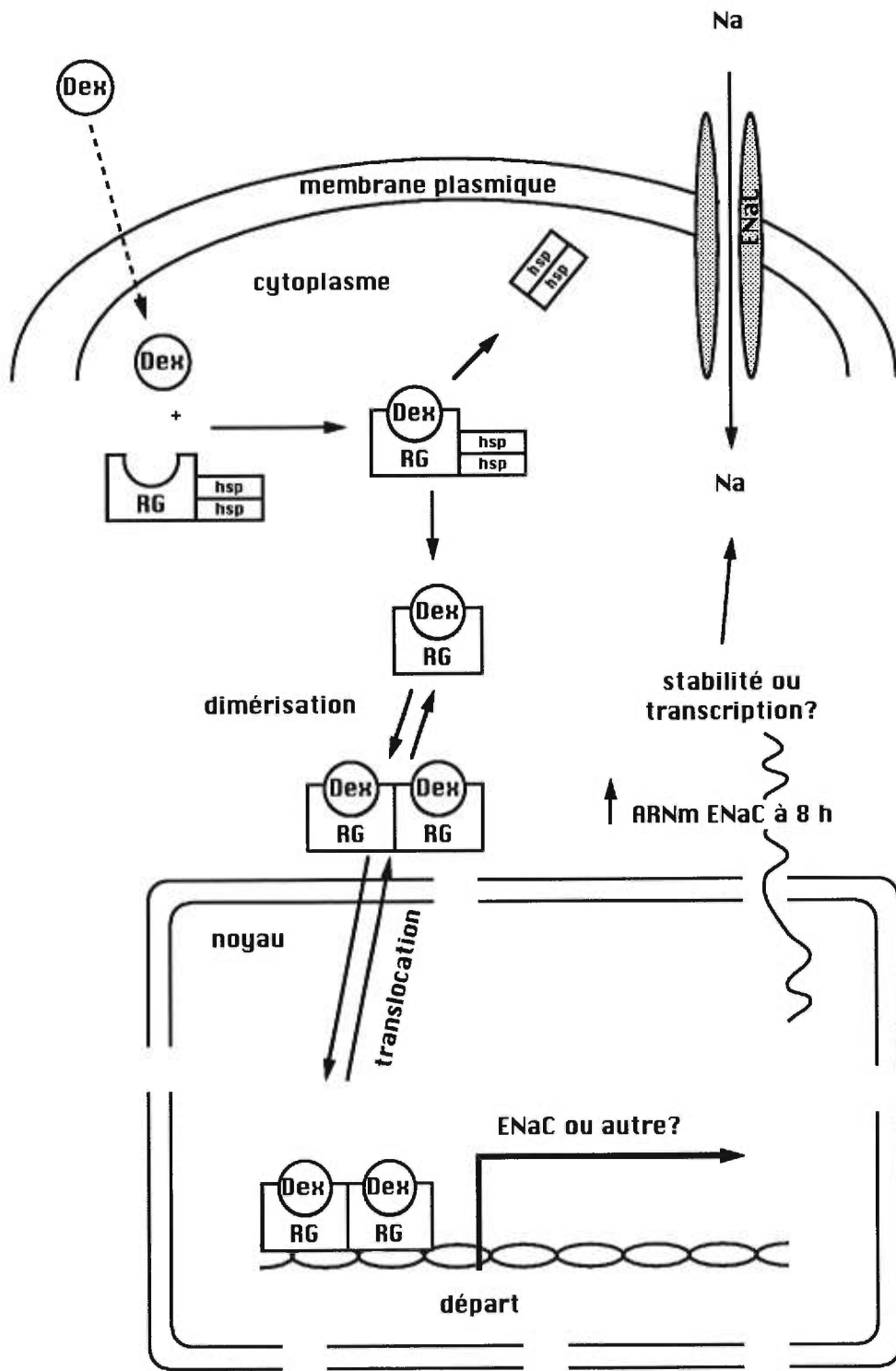


figure 4

maturation et la production de surfactant (Ballard 1986). Cette maturation est nécessaire au fœtus qui doit modifier son mode de respiration; ces modifications impliquent des changements dans le transport transépithélial du sodium. L'identification de récepteurs à glucocorticoïdes dans le poumon fœtal et adulte (Granberg et Ballard 1977) et chez les cellules alvéolaires de type II (Ballard 1986) nous porte à penser que la régulation par les glucocorticoïdes pourrait avoir un impact sur le transport transépithélial du sodium. D'ailleurs, on retrouve principalement les récepteurs à glucocorticoïdes dans le poumon (Krozowski et Funder 1981), plus précisément sur les cellules alvéolaires de type II (Champigny *et al.* 1994).

2.5.3. RÉGULATION DES COMPOSANTES DE LA MACHINERIE DU TRANSPORT SODIQUE DANS LE POUMON

2.5.3.1. ENaC

Aucune étude ne montre de lien direct entre la cascade β -adrénergique et l'activation d'ENaC. Ce sont des travaux antérieurs *in vivo* ou *in vitro* (Berthiaume 1991, Crandall *et al.* 1986, Goodman *et al.* 1984, et Saumon *et al.* 1987) qui nous permettent de prédire ce lien.

Plusieurs travaux sur le poumon intact et sur les cultures cellulaires suggèrent que les glucocorticoïdes régulent l'expression des sous-unités α , β et γ d'ENaC. D'abord, O'Brodovich *et al.* (1993) rapportent qu' α -rENaC est exprimé dans le poumon du fœtus mature, et dans les cellules de type II fœtales et adultes en culture, et que l'expression d' α -rENaC est accentuée par des hormones qui favorisent la maturation du poumon fœtal. Les corticostéroïdes, tels que la dexaméthasone ou l'aldostérone, produisent une augmentation de la transcription d' α -ENaC chez les cellules alvéolaires de type II fœtales; cet effet est potentialisé par l'hormone thyroïdienne; le courant sensible à

l'amiloride et les messagers d' α -rENaC sont augmentés (Champigny *et al.* 1994). L'étude du patron d'expression des sous-unités α , β et γ de rENaC dans le poumon en développement a permis d'établir un parallèle entre l'expression d' α -rENaC et le niveau de corticostéroïdes endogènes (Tchepichev *et al.* 1995); il y aurait une régulation différentielle de chacune des sous-unités durant la période fœtale et post-natale. Chez les animaux adultes, la surrénalectomie, qui supprime la sécrétion de corticostéroïdes, réduit considérablement l'expression des sous-unités α , β et γ d'ENaC dans le poumon au niveau des messagers et de la protéine (Renard *et al.* 1995). Un traitement à la dexaméthasone chez ces animaux surrénalectomisés rétablit le taux normal d'expression des trois sous-unités. Tous ces travaux contribuent donc à nous convaincre qu' α -rENaC est influencé au niveau transcriptionnel par les corticostéroïdes.

2.5.3.2. LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase

La régulation de la pompe Na^+/K^+ -ATPase est sous le contrôle de plusieurs hormones en circulation qui agissent à court et à long terme sur l'activité et la synthèse de la pompe. Cette régulation varie d'un tissu à l'autre en fonction des besoins de l'organisme. Des études *in vivo* et *in vitro* suggèrent fortement la participation de la pompe Na^+/K^+ -ATPase à la résorption de l'œdème pulmonaire par le transport transépithélial du sodium (Basset *et al.* 1987b, Goodman *et al.* 1987, Jayr *et al.* 1994, Nici *et al.* 1991, Olivera *et al.* 1994, Olivera *et al.* 1995, Rutschman *et al.* 1993, Sakuma *et al.* 1994, Smedira *et al.* 1991, et Sznajder *et al.* 1995). Chez le fœtus, plusieurs études permettent d'établir un lien entre le changement du transport transépithélial du sodium et l'absorption du liquide pulmonaire, et l'augmentation (4 à 10 fois) de l'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase autour de la naissance (Bland *et al.* 1982, Bland 1983, Crump *et al.* 1995, Ingbar *et al.* 1996, et Orłowski et Lingrel 1988) et l'augmentation de son activité (Bland et

Nielson 1992, et Ingbar *et al.* 1996). L'isoforme α_1 jouerait un rôle important dans le maintien liquidien de l'alvéole pulmonaire (Mason *et al.* 1982, et Matthay *et al.* 1982). Chez les cellules alvéolaires de type II en culture, la voie de signalisation dépendante de l'AMPc semble très probablement impliquée dans le processus de transport transépithélial du sodium (Cheek *et al.* 1989, Cott *et al.* 1986, et Goodman *et al.* 1984). Dans notre laboratoire, Suzuki *et al.* (1995) ont démontré l'implication de la cascade β -adrénergique dans l'augmentation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase.

À court terme, la cascade de l'AMPc pourrait permettre la phosphorylation par la PKA directement sur la pompe afin de stimuler son activité, ou indirectement par la phosphorylation de d'autres protéines stimulatrices de la pompe (Chibalin *et al.* 1992, et Ewart et Klip 1995). À long terme, l'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase est stimulée au niveau transcriptionnel par l'AMPc (Ahmad *et al.* 1994, Whorwood et Stewart 1995) grâce à la présence de deux éléments amplificateurs CRE dans le promoteur du gène de la sous-unité α (Shull *et al.* 1990, et Yagawa *et al.* 1990).

Beaucoup d'études ont été produites concernant l'effet de l'aldostérone sur la pompe Na^+/K^+ -ATPase. L'aldostérone est un minéralocorticoïde connu pour normaliser l'activité et la synthèse de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans le rein de rats surrénalectomisés (Gick *et al.* 1988). Cette hormone contrôle le transport transépithélial du sodium en stimulant entre autre la synthèse de nouvelles pompes Na^+/K^+ -ATPases (Girardet *et al.* 1986). L'action de l'aldostérone peut être rapide et stimuler l'activité de la pompe en dedans d'une heure (Ewart et Klip 1995, et Gick *et al.* 1988). L'activation à court terme de la pompe par l'aldostérone pourrait dépendre de l'entrée de sodium dans la cellule et ainsi provoquer la mobilisation de pompes inactives à la membrane plasmique, possiblement via le réseau microtubulaire (Ewart

et Klip 1995); les corticostéroïdes augmenteraient le nombre de pompes en modifiant leur pool (Barlet-Bas *et al.* 1990). L'activation peut aussi être plus lente et impliquer une synthèse de pompes *de novo* (Verrey *et al.* 1987). La présence d'un élément de réponse aux hormones (HRE) dans le promoteur des gènes formant la pompe pourrait être à l'origine de cette réponse (Horisberger et Rossier 1992, et Oguchi *et al.* 1993). D'ailleurs, Whorwood et Stewart (1995) concluent à une activation directe de la transcription par les corticostéroïdes.

Dans le poumon isolé chez le rat, l'aldostérone favorise la clairance liquidienne (Olivera *et al.* 1992, résumé). Le courant transépithélial sodique de l'épithélium pulmonaire de *Xenopus laevis* augmente après une heure de traitement à l'aldostérone pour atteindre un effet maximal à 4 ou 5 heures (Fischer et Clauss 1990, et Illek *et al.* 1990). L'impact des glucocorticoïdes sur l'expression de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase semble avoir été beaucoup moins étudié que celui des minéralocorticoïdes. De plus, les glucocorticoïdes sont connus pour favoriser le développement du poumon, et c'est pourquoi peu d'études se sont attardées sur la régulation de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase dans le poumon adulte. Tchepichev *et al.* (1995) ne rapportent aucun accroissement des messagers de la pompe dans le poumon suite à un traitement à la dexaméthasone chez le rat fœtal. Par contre, chez le rat en bas âge, Wang *et al.* (1994) ont démontré que la transcription des sous-unités α_1 et β_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase est directement stimulée par les glucocorticoïdes. Chez l'adulte, l'injection de dexaméthasone à des animaux surrénalectomisés permet de rétablir l'activité de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase dans le rein (Gick *et al.* 1988); *in vitro*, on observe des résultats tout à fait semblables pour les tubules rénaux (Gick *et al.* 1988). Des cultures primaires de tubules proximaux traitées à la dexaméthasone montrent un accroissement de l'activité et du nombre de messagers d'ARN de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase (Lee *et al.* 1995); un traitement à la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse

protéique, confirme que la dexaméthasone agit avant le mécanisme de traduction.

D'autres éléments régulateurs de la pompe Na^+/K^+ -ATPase existent. Ils ne seront cependant pas d'une grande utilité en ce qui concerne les travaux présentés ici. Toutefois, ces éléments qui démontrent la grande complexité de ce type de régulation pourraient s'avérer intéressants dans de futures études; en voici une liste de références: Bertorello et Katz 1993, Bertorello et Katz 1995, Ewart et Klip 1995, Gick et Ismail-Beigi 1990, Horisberger et Rossier 1992, Ismail-Beigi 1992, Lingrel *et al.* 1990, Lo et Klein 1992, Pressley 1992, Rossier et Palmer 1992, et Whorwood *et al.* 1994.

2.5.3.3. CO-RÉGULATION D'ENaC ET DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase

Puisque la clairance pulmonaire relève du transport transépithélial du sodium, et que ce transport s'effectue par l'entrée apicale de sodium par ENaC suivie passivement d'eau ou de liquide, et par sa sortie basolatérale via la pompe Na^+/K^+ -ATPase, nous croyons qu'il est possible que ces deux éléments de la machinerie du transport sodique soient co-régulés. D'ailleurs, quelques études démontrent qu'aux alentours de la naissance, les ARNm ou la protéine de la pompe Na^+/K^+ -ATPase augmentent de 4 à 10 fois (Crump *et al.* 1995, Ingbar *et al.* 1996, et Orłowski et Lingrel 1988); on note aussi une augmentation de son activité à cette même période (Bland et Nielson 1992, et Ingbar *et al.* 1996). On peut établir ici un parallèle avec ENaC. Dans notre laboratoire, Dagenais *et al.* (1997) notent un patron d'expression des messagers très similaire entre α -mENaC et la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase chez la souris. Les mêmes observations sont rapportées chez le rat (O'Brodovich *et al.* 1993, et Tchepichev *et al.* 1995).

Dans l'épithélium d'amphibiens, Verrey (1995) suggère un lien entre l'augmentation des messagers de la pompe et d'ENaC suite à une stimulation hormonale à l'aldostérone. Cependant, aucune étude sur les cellules alvéolaires de type II en culture ne démontre cette corrélation.

2.5.4. RÔLE DE LA GMPc DANS LE TRANSPORT ÉPITHÉLIAL SODIQUE DU POUMON

La cGMP est reconnu pour transmettre l'effet de l'ANF. Son augmentation intracellulaire et extracellulaire est reliée à l'action de l'ANF. Il agit d'ailleurs en tant que second messenger (Lewicki 1989, Hamet et Tremblay 1990, et Zeidel 1990). L'ANF possède des propriétés vasodilatatrice et natriurétique, et il pourrait aussi influencer le transport sodique. Ce système a surtout été étudié au niveau du canal collecteur médullaire interne et montre un effet inhibiteur sur la réabsorption du sodium électrogénique. L'ANF favorise l'excrétion du sodium par différents mécanismes (Knepper *et al.* 1991, Stanton 1991b). D'abord, la GMPc réduit la probabilité d'ouverture du canal cationique sensible à l'amiloride situé du côté apical (Light *et al.* 1989, et Light *et al.* 1990). Puis elle produit une régulation négative en activant la protéine kinase dépendante de la GMPc qui phosphoryle la protéine G du canal (Light *et al.* 1990). Il est important de préciser que ces deux mécanismes se produisent à court terme (à l'intérieur de quelques secondes ou minutes).

Dans le poumon, on retrouve l'hormone ou le récepteur de l'ANF en grande quantité *in vitro* et *in vivo* (revu par Perreault et Gutkowska 1995), ainsi que chez les cellules alvéolaires de type II (Ishii *et al.* 1989). Ceci nous permet de croire que le système de second messenger dépendant de la GMPc pourrait jouer un rôle important dans l'épithélium pulmonaire, étant donné les ressemblances avec les

épithéliums du rein. Cependant, les travaux de Eichinger et Walker (1996) démontrent que la GMPc n'affecte aucunement le mouvement de fluide dans le poumon du rat.

D'un point de vue cellulaire, Goodman *et al.* (1984) a démontré que le dbGMPc, un analogue de la GMPc, n'a pas d'impact sur la formation des dômes chez les cellules alvéolaires de type II formant une monocouche. Ces structures sont associées au transport transépithélial du sodium et d'eau. De plus, l'étude de Sahib *et al.* (1978) avait déjà démontré l'inefficacité de la GMPc dans le transport du sodium de l'épithélium de la vessie.

En bref, la voie de signalisation dépendante de la GMPc qui semble détenir un rôle important dans le maintien de l'homéostasie liquidienne dans le rein n'aurait pas la même influence dans le poumon. Ce constat nous a permis de penser que l'utilisation du dbGMPc pourrait servir de témoin négatif dans nos expériences.

3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La modulation de l'expression de la machinerie du transport sodique peut être étudiée à différents niveaux. Dans le processus de production de nouvelles protéines actives et fonctionnelles, le contrôle de leur expression peut s'exercer à plusieurs niveaux: 1) la fréquence de la transcription du gène, 2) la maturation de l'ARN (l'épissage, par exemple), 3) le transport de l'ARN du noyau vers le cytoplasme, 4) la traduction par les ribosomes, 5) la dégradation ou la stabilité accrue des ARNm, 6) les modifications post-traductionnelles des protéines, et 7) les modifications de l'activité des protéines. L'étude des ARNm par buvardage Northern permet dans cette optique d'observer des changements quantitatifs qui sont le produit d'une modification de la transcription ou de la stabilité des messagers, et c'est ce que nous allons tenter de démontrer.

Avant de procéder aux questions essentielles proposées dans ce mémoire, nous voulons nous assurer de la validité de notre modèle, c'est-à-dire que nous voulons d'abord savoir comment se comporte l'expression d' α -rENaC chez les cellules alvéolaires de type II maintenues en culture pendant 7 jours.

Notre objectif suivant consiste à démontrer l'impact possible de la voie de signalisation de l'AMPc sur l'expression du canal α -rENaC chez les cellules de type II maintenues en culture. Étant donné que rENaC semble être la porte d'entrée principale du sodium chez ces cellules, et qu'*in vivo*, cette voie de signalisation semble augmenter la clairance liquidienne pulmonaire, nous pensons qu' α -rENaC répondrait à cette voie de signalisation suite à une stimulation.

Étant donné que l'expression d' α -rENaC semble modulée par la voie de l'AMPc, nous voulons savoir si cette augmentation des messagers à 8 h est d'ordre transcriptionnel ou non. Nous pensons qu'il y aurait peut-

être la présence d'un élément CRE dans le promoteur qui a la capacité de stimuler la transcription d'un gène donné en présence d'AMPc, via la phosphorylation de CREB.

D'autres voies de signalisation pourraient être impliquées dans la régulation des messagers d' α -rENaC chez les cellules de type II. D'abord, la voie de la GMPc. Notre hypothèse est que la GMPc pourrait servir de témoin négatif puisqu'il a été démontré qu'elle n'a pas d'impact sur la formation des dômes chez les cellules de type II en culture. Elle n'aurait donc possiblement pas d'impact sur l'expression d' α -rENaC.

Ensuite, nous pensons que les glucocorticoïdes pourraient influencer l'expression d' α -rENaC chez les cellules adultes en utilisant leur propre voie de signalisation, puisqu'ils semblent si importants dans le développement du fœtus. Notre objectif est donc de démontrer l'impact possible des glucocorticoïdes sur l'expression des messagers d' α -rENaC chez les cellules de type II en culture.

Suite aux expériences précédentes qui démontrent un effet positif de la voie de l'AMPc et des glucocorticoïdes sur l'expression du canal, nous voulons savoir comment se comporte l'expression des messagers lorsque les deux agents sont administrés simultanément. Nous pensons que l'effet pourrait être synergique.

Finalement, nous pensons qu' α -rENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase pourraient être co-régulés afin de participer en parallèle au transport transépithélial du sodium. Notre objectif est donc de démontrer que la pompe Na^+/K^+ -ATPase suit les mêmes patrons d'expression qu' α -rENaC lors d'une stimulation des voies de l'AMPc et de la GMPc, et par les glucocorticoïdes.

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1. MISE EN CULTURE DES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II (Dobbs *et al.* 1986)

Les cellules alvéolaires de type II proviennent de rats mâles Sprague-Dawley (175-200 g) (Charles River Ltée, St-Constant, Qué.) anesthésiés au pentobarbital (Somnotol®, MTC Pharmaceuticals, Ont.) (0.001 mg/g dilué dans une solution saline 0.9% stérile) par injection intrapéritonéale. La veine cave inférieure est coupée et la trachée est canulée. Les poumons sont ensuite perfusés via le ventricule droit et l'artère pulmonaire avec la solution II (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, tampon phosphate 2.5 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2.0 mM et MgSO₄ 1.3 mM), additionnée de 8.8 µg/ml de gentamycine (Garamycin™, Schering, Canada), en emplissant simultanément les poumons de 10 ml d'air à la fois afin de vider les poumons de leur sang. Les poumons sont retirés de la cage thoracique puis lavés avec la solution I (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM tampon phosphate de sodium, 10 mM HEPES, 6 mM glucose et 0.2 mM EGTA pH 7.4), additionnée de 8.8 µg/ml de gentamycine, environ huit fois 10 ml.

À l'aide de la canule trachéale, les poumons sont graduellement perfusés avec 40 ml de solution d'élastase (Worthington Biochemical Corporation, É.-U.) (4 Unités/ml de solution II) afin de digérer le tissu. On retire ensuite la trachée et le cœur pour ne conserver que le tissu pulmonaire. Les poumons sont émincés à l'aide de ciseaux dans une solution de DNase I provenant de pancréas bovin (250 µg/ml de solution II; Boehringer Mannheim, Allemagne) qui sert à prévenir la formation de grappes cellulaires. On ajoute 5 ml de FBS (Gibco BRL, num. cat. 26140-079) pour bloquer la réaction enzymatique à l'élastase.

Cette suspension tissulaire est passée à travers une série de filtres de différentes grosseurs. La première est constituée de deux puis quatre épaisseurs de gaze, et la deuxième série est constituée de deux filtres de nylon, l'un de 150 μm et l'autre de 30 μm . On récolte les cellules dans un tube de polypropylène et on lave les filtres avec du MEM (Gibco BRL, num. cat. 11700-010) jusqu'à l'obtention de 50 ml. Les cellules sont centrifugées à 130 x g durant 8 minutes et on retire le surnageant contenant les débris cellulaires. Le culot est remis en suspension dans 7.5 ml de MEM. On obtient ainsi une suspension cellulaire contenant les cellules alvéolaires de type II dont le principal contaminant cellulaire se trouve à être les macrophages.

Les cellules alvéolaires de type II sont enrichies par la méthode d'adhésion des macrophages aux IgG (Dobbs *et al.* 1986) dans le but d'augmenter leur pureté. Brièvement, cette technique consiste à couvrir une boîte de pétri bactériologique (100 mm x 15 mm) de 5 ml de solution d'IgG 0.5% (Sigma, M0, É.-U.) dans la base TRIS à 50 mM, à pH 9.5. On laisse reposer 3 h à 22°C pour permettre l'adhésion des IgG au plastique. Les boîtes sont ensuite rincées 3 fois avec 5 ml de PBS (Sigma), puis 2 fois avec 5 ml de MEM. On y ajoute la suspension cellulaire (environ 10 à 30 x 10⁶ cellules/boîte), puis on les place dans l'incubateur à 37°C, CO₂ à 5% et air à 95%, pendant 45 min. Les macrophages adhèrent ainsi aux IgG, fixées au plastique, grâce à la présence des récepteurs Fc à la surface de leur membrane cellulaire. D'ailleurs, la plupart des cellules contaminantes possèdent ces récepteurs Fc (Basten *et al.* 1972, Bianco *et al.* 1970, Coupland et Leslie 1983, Kulczycki *et al.* 1981, Messner et Jelinek 1970, et Uhr et Phillips 1966) et s'attachent donc à la boîte de culture recouverte d'IgG. On récolte le liquide des boîtes contenant les cellules alvéolaires de type II non adhérentes qui représentent 89% des cellules (Dobbs *et al.* 1986), et on centrifuge à 130 x g pendant 8 min. On obtient environ 40 x 10⁶ cellules, constituant 20 à 35% des cellules de type II des poumons pour 1 rat (Crapo *et al.* 1978). Les cellules alvéolaires du culot sont prêtes à

être mises en culture.

Les cellules alvéolaires de type II sont remises en suspension dans le milieu de culture: MEM, FBS 10%, glutamine 2 mM et gentamycine 0.08%. Chaque flacon en polystyrène pour culture cellulaire (Corning) de 25 cm² contient de 9.5 à 10.5 x 10⁶ cellules dans 10 ml de milieu. Le premier changement de milieu s'effectue 72 h après l'isolement, et le milieu est subséquemment remplacé toutes les 48 h.

4.2. SOLUTIONS ET PRODUITS CHIMIQUES

Le dbAMPc (Sigma, St-Louis, MO) a été solubilisé dans du MEM à une concentration de 100 mM pour être entreposé à -40°C. La concentration finale d'utilisation est de 1 mM.

La forskoline (Sigma, St-Louis, MO) a été dissoute dans du DMSO à une concentration de 10 mM pour être entreposée à 4°C. La concentration finale d'utilisation est de 20 µM, donc 20 µl de solution stock par flacon de culture contenant 10 ml de milieu. On a ajouté aux flacons de culture servant de contrôle 20 µl de véhicule DMSO.

Le dbGMPc (Sigma, St-Louis, MO) a été solubilisé dans du MEM à une concentration de 100 mM pour être entreposé à -20°C. La concentration finale d'utilisation est de 1 mM.

L'actinomycine D (Sigma, St-Louis, MO) a été dissoute dans le MEM à une concentration de 0.5 mg/ml pour être entreposée à 4°C. La concentration finale d'utilisation est de 5 µg/ml.

La dexaméthasone à 4 mg/ml (Sabex, Boucherville, Qué.) est d'abord diluée 100 fois dans de l'eau. La concentration finale d'utilisation est de 100 nM.

4.3. QUANTIFICATION DU MESSAGER DU CANAL

Le buvardage de type Northern a été retenu comme technique permettant d'évaluer les changements dans l'expression du canal α -rENaC et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Les ARNm totaux sont extraits selon la méthode au guanidinium-phénol-chloroforme (Chomczynski et Sacchi 1987). Chacun des flacons contenant les cellules alvéolaires de type II constitue un échantillon. Les flacons de culture sont rincés 2 fois avec 5 ml de PBS; on y retire le maximum de liquide. Puis on extrait l'ARN en ajoutant 600 μl de solution D. Cette dernière est préparée comme suit: thiocyanate de guanidine 4 M (Gibco BRL), citrate de sodium 25 mM, à pH 7, sarcosyl 0.5% et β -2-mercaptoéthanol 0.1 M. On récolte le lysat et on y ajoute dans l'ordre 40 μl d'acétate de sodium 3 M, à pH 4, 600 μl de phénol tamponé à l'eau, puis 170 μl d'un mélange chloroforme-alcool isoamyl (49:1). On agite vigoureusement, puis on laisse reposer 15 min sur la glace. On centrifuge les échantillons à 10000 g pendant 20 min à 4°C. On récolte les ARN dans la phase supérieure aqueuse qu'on va précipiter avec 1 volume d'isopropanol (~ 600 μl) pendant 1 h ou plus à -20°C. On centrifuge à nouveau les échantillons à 10000 g pendant 20 min à 4°C. On solubilise le culot d'ARN avec 300 μl de solution D et on précipite de nouveau avec 1 volume d'isopropanol (300 μl) pendant 1 h à -20°C. On centrifuge encore les échantillons à 10000 g pendant 20 min à 4°C. On lave le culot avec de l'éthanol 75%, puis on centrifuge les échantillons à 10000 g pendant 5 min à 4°C. On retire l'éthanol et on lyophilise les culots pendant environ 3 à 5 min. À ce moment-ci, les échantillons sont solubilisés dans 35 μl d'eau désionisée pour le dosage, puis entreposés à -80°C.

Le dosage de l'ARN total se fait par la mesure de la DO à 260 nm puis à 280 nm, pour une dilution de 0.01x (4 μl d'ARN en solution dilué dans 396 μl d'eau désionisée); un ratio s'approchant de 2 des mesures à 260 nm et à 280 nm nous informe de la pureté des extraits. La concentration d'ARN en $\mu\text{g}/\text{ml}$ se calcule comme suit: mesure à 260 nm x 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ x

dilution (0.01), pour une solution d'ARN dont la DO à 260 nm égale approximativement 1.

Les ARN sont séparés à l'aide d'un gel d'agarose 1%-formaldéhyde (Sambrook *et al.* 1989). Huit μg d'ARN par échantillon (9 μl) additionnés de 4 μl de tampon de migration 5X à pH 7 (MOPS 0.1 M à pH 7, acétate de sodium 40 mM et EDTA 5 mM à pH 8), de 7 μl de formaldéhyde et de 20 μl de formamide sont dénaturés à 65°C pendant 15 min. Les échantillons sont refroidis, puis on y ajoute 3 μl de tampon colorant de chargement (glycérol 50%, EDTA 1mM à pH 8, bleu de bromophénol 0.25% et xylène cyanol FF 0.25%). On utilise une échelle d'ARN (0.24-9.5 Kb) (Gibco BRL) afin de déterminer le poids moléculaire des ARN désirés.

L'électrophorèse baignant dans le tampon de migration 1X fonctionne à 100 V pendant environ 3 h. Deux des gels ont été teints au bromure d'éthidium 0.005% afin de mesurer les distances de migration de l'échelle d'ARN.

Les gels sont ensuite transférés par capillarité durant 16 h avec du SSC 10X sur une membrane de nylon HybondTM-N+ (Amersham, R.-U.). Les ARN sont fixés sur la membrane aux UV, puis par séchage à 80°C pendant 2 h. La membrane est préhybridée 2 h, puis hybridée 16 h en présence d'une sonde radioactive dans le tampon Church (tampon de phosphate de sodium à pH 7.2, SDS 7% (w/v) et EDTA 1 mM à pH 8) dans un four à hybridation à 60°C (Tek Star^{MC}).

Les sondes utilisées pour hybrider les membranes sont décrites ci-dessous:

- 1) La sonde α -mENaC provient d'un fragment de 760 pb incluant la région codante en 3'. Cette sonde origine de la souris, mais sa séquence est très conservée (94% d'homologie) pour le rat et la souris, et code pour les acides aminés his₄₄₅ au codon stop₆₉₉ de la séquence d' α -rENaC.

- 2) La sonde α_1 -Na⁺/K⁺-ATPase nous a été fournie généreusement par le Dr J. Orłowski (Département de Physiologie, Université McGill, Montréal). Elle se compose d'un fragment de 332 pb codant pour les nucléotides 89 à 421, depuis l'extrémité 5' non traduit jusqu'à l'arg₆₁, entre un site NarI et StuI, provenant de l'isoforme α du cerveau et du rein du rat (Shull *et al.* 1986).
- 3) La sonde β -actine provient d'un clone d'ADNc du cerveau de rat d'environ 1.5 Kb dans le vecteur pBR322, inséré de part et d'autre d'un site PstI. Ce plasmide a été obtenu au laboratoire du Dr P. Hamet (Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal).

Les sondes sont marquées à l'aide d'une trousse Random Priming (Gibco BRL) et d' $[\alpha$ -³²P]dCTP radioactif (Amersham, IL) qui utilise le fragment Klenow de la polymérase I d'*E. coli*. On purifie la sonde marquée en la passant à travers une colonne de Séphadex G-50 (Pharmacia, Suède).

À la suite de l'hybridation, la membrane est rincée une première fois pendant 30 min dans un tampon phosphate 100 mM à pH 7.2 et SDS 0.1% (w/v), une deuxième fois pendant 30 min dans un tampon phosphate 40 mM à pH 7.2 et SDS 0.1%, puis une dernière fois pendant 30 min dans un tampon phosphate 40 mM à pH 7.2 et SDS 1%.

Toutes les membranes sont hybridées avec la sonde β -actine afin de permettre la standardisation des résultats.

La radioactivité présente en bandes sur les membranes est détectée par PhosphorImager^{MC}. Le logiciel ImageQuantTM permet de déterminer la sommation des valeurs en pixels d'un objet. Nous avons retenu le nombre total de pixels de l'objet, incluant toutes les valeurs supérieures au bruit de fond, en excluant les valeurs inférieures à ce même bruit de fond. Ceci signifie qu'on quantifie l'intensité totale de

la bande d'ARN tout en excluant les valeurs en pixels de la région entourant cette bande.

Certaines membranes ont aussi été autoradiographiées en présence de films Kodak X-OMAT AR pour des prises de photos.

4.4. ACTIVITÉ PKA

L'activité de l'enzyme protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) est déterminée à l'aide d'une trousse [Protein Kinase A (cAMP-Dependent Protein Kinase) Assay System, num. cat. 13128-012, Gibco BRL]. Chacun des flacons contenant les cellules alvéolaires de type II constitue un échantillon. Brièvement, les flacons de culture sont rincés avec du PBS, puis les protéines sont extraites avec 250 μ l d'*Extraction Buffer* par flacon, ce qui est suffisant comme volume pour détecter une activité de la PKA.

Le contenu protéinique a été déterminé par la méthode de Bradford (Bradford 1976), en utilisant une courbe standard au BSA.

Lors de cette analyse, on veut donc mesurer l'activité de la PKA chez les cellules non traitées (contrôles) et chez les cellules traitées. La PKA est activée lorsque, au moment où l'AMPc s'attache à la sous-unité régulatrice de la PKA, survient la dissociation de sa sous-unité catalytique (Edelman *et al.* 1987, Krebs 1989, et Taylor *et al.* 1988). Cette sous-unité catalytique, qui ne dépend plus de l'AMPc, ira phosphoryler des protéines substrats aux positions sérine et thréonine. Afin de mesurer cette activité, on utilise un peptide synthétique comme substrat ayant la séquence Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly appelé "Kemptide" (Cheng *et al.* 1986, Glass *et al.* 1989, Kemp *et al.* 1988, Maller *et al.* 1978, Roskoski 1983, et Whitehouse *et al.* 1983) qui sera phosphorylé en position sérine (Maller *et al.* 1978, et Pomerantz *et al.*

1977). Un pseudosubstrat agissant comme inhibiteur spécifique de l'activité PKA, ayant une séquence consensus similaire au "Kemptide", mais dont la position sérine est changée pour alanine (Cheng *et al.* 1986, Glass *et al.* 1989, et Kemp *et al.* 1988) va permettre de compléter l'analyse de cette activité PKA (Roskoski 1983, et Whitehouse *et al.* 1983). En principe, la PKA phosphoryle le substrat "Kemptide" à l'aide de l'ATP[γ -³²P] (Amersham, IL) qui lui transfère un phosphate radioactif traceur.

Le premier échantillon appelé A contient l'extrait cellulaire, traité ou non, sans inhibiteur; il constitue donc l'activité PKA intrinsèque de l'extrait cellulaire. Le deuxième échantillon appelé B contient l'extrait cellulaire plus l'inhibiteur; il représente donc l'activité PKA intrinsèque inhibée maximale, c'est-à-dire le bruit de fond. Pour chacun des échantillons, les informations obtenues sont traduites en pmol/min/ml d'extrait, en proportion de la quantité de protéines présentes dans l'extrait (dosage). On obtient ainsi une valeur A (échantillon A) dont on soustrait une valeur B (échantillon B), pour obtenir l'équivalent de l'activité PKA activée en pmol/min/ μ g de protéine.

4.5. STATISTIQUES

Pour les études de buvardage de type Northern, les résultats sont exprimés en unités arbitraires où l'échantillon contrôle équivaut à 100% d'expression du canal.

Pour toutes les études, l'échantillon traité est exprimé sous la forme d'une moyenne \pm son écart-type. Les comparaisons sont effectuées par une analyse de variance, complétée *a posteriori* par une analyse à comparaisons multiples de Fisher. Certaines données ont été analysées par un test t de Student non pairé. Une analyse de régression dans le

temps de traitement a aussi été utilisée dans les cas où l'analyse de variance ne montre pas de changement significatif entre les groupes, ceci afin de démontrer tout changement d'expression dans le temps. Une transformation des données en valeurs logarithmiques a été utilisée afin de réduire la variabilité lorsque nécessaire. Les différences sont considérées significatives si p est inférieur à 0.05. De plus, des analyses de corrélation ont été effectuées afin de comparer les patrons d'expression des transporteurs concernés.

5. RÉSULTATS

5.1. EXPRESSION SPONTANÉE D' α -rENaC DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE DURANT 7 JOURS

Les cellules alvéolaires de type II sont connues pour se modifier lorsqu'elles sont maintenues en culture (Dobbs *et al.* 1985, et Dobbs *et al.* 1988). Elles auraient la capacité de se différencier graduellement en cellules de type I. *In vivo*, les cellules de type II ont la capacité de se multiplier afin de remplacer les cellules de type I endommagées (Adamson et Bowden 1974, Evans *et al.* 1975, et Evans et Shami 1989). Toutefois, quelques travaux notent une conservation du phénotype morphologique des cellules de type II associée la présence de marqueurs lorsque ces cellules sont maintenues en culture (Ballard *et al.* 1986, Dobbs *et al.* 1980, Dobbs *et al.* 1985, Dobbs *et al.* 1986, Mason *et al.* 1982, et Mason *et al.* 1985).

Les études de Goodman et Crandall (1982) viennent appuyer le phénotype morphologique des cellules alvéolaires de type II, car ces dernières forment des dômes entre 4 et 18 jours de culture, caractérisant un transport transépithélial de sodium. Plus récemment, Yue *et al.* (1993) démontrent que les cellules de type II possèdent un courant de faible affinité pour l'amiloride, qu'elles soit fraîchement isolées ou en culture. Ce sont ces caractéristiques des cellules de type II qui nous intéressent le plus ici.

Dans un premier temps, ceci nous a amené à vouloir vérifier s'il y avait des changements de l'expression d' α -rENaC lorsque les cellules alvéolaires de type II de rat adulte sont maintenues en culture. Comme les expériences subséquentes ne dépasseront jamais 7 jours de culture, nous avons maintenu cet intervalle de temps pour cette expérience.

Suite à l'isolement des cellules de type II à partir du rat, considéré comme étant le Jour 0, les cellules sont immédiatement mises en culture. L'ARN total est extrait des cellules après 1 jour en culture (Jour 1), 2 jours (Jour 2), etc., jusqu'à 7 jours (Jour 7). Les résultats sont exprimés en comparant le groupe Jour 3 au groupe Jour 2. Les messagers d' α -rENaC sont détectés par buvardage de type Northern.

Ici, nous avons décidé de définir le Jour 3 comme étant le jour de référence par rapport à tous les autres groupes pour les raisons qui suivent. Il a été démontré précédemment que lorsque les cellules alvéolaires de type II sont cultivées sur un substrat de plastique, elles forment une monocouche complète parsemée de petits dômes (Goodman et Crandall 1982, Goodman *et al.* 1983, et Mason *et al.* 1982) entre 2 et 4 jours après la mise en culture. Ces structures hémisphériques sont produites par un transport ionique transépithélial actif en provenance du milieu vers le substrat, et qui sollicite le transport passif d'eau (Lever 1979).

Après avoir déterminé ces paramètres, la figure 5 montre que l'expression d' α -rENaC est en croissance avant le Jour 3, le jour de référence, et que cette progression se poursuit jusqu'au Jour 5. Le maximum d'expression du canal se situe au Jour 5, qui est statistiquement différent de tous les autres groupes de jour. Au Jour 6 et 7, l'expression du canal semble se stabiliser autour de 100% d'expression.

À partir du 3^{ème} jour de culture, c'est-à-dire au moment où les cellules alvéolaires de type II atteignent la confluence pour former une monocouche, l'expression du canal α -rENaC continue d'augmenter. En traitant les cellules au Jour 3, ceci nous laisse la possibilité d'augmenter ou de diminuer davantage son expression à l'aide de produits stimulateurs ou répresseurs. Pour toutes les expériences qui suivent, nous avons tenu compte de ce principe et nous avons

Expression spontanée d' α -rENaC chez les cellules de type II en culture durant 7 jours

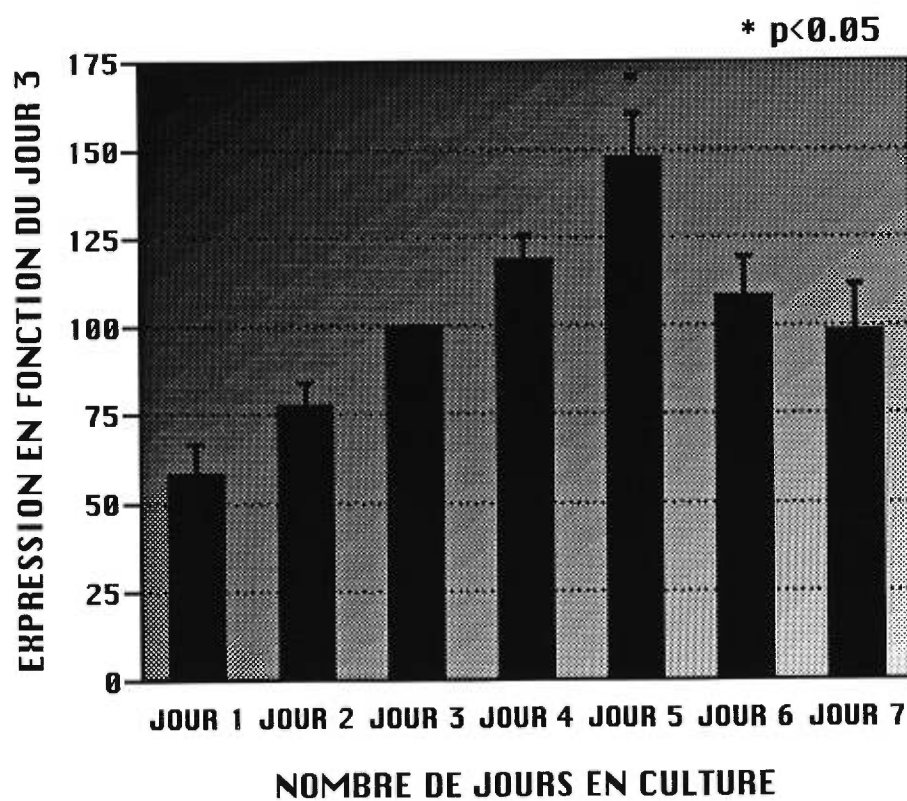


Figure 5

déterminé le Jour 3 comme jour de traitement. Cependant, comme l'expression du canal varie en fonction du temps de culture, nous avons dû utiliser un contrôle pour chaque intervalle de temps étudiés lors des expériences subséquentes.

5.2. MODULATION DE L'EXPRESSION D' α -rENaC PAR LA VOIE DÉPENDANTE DE L'AMPc DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE

Des études antérieures ont montré que les agents β -adrénergiques pourraient être impliqués dans la régulation du transport sodique. De plus, on sait que l'AMPc est le second messenger impliqué dans la cascade β -adrénergique. Les travaux de Berthiaume (1991) suggèrent que les voies de signalisation impliquant le système de second messenger dépendant de l'AMPc auraient la capacité de favoriser la clairance pulmonaire liquidienne *in vivo*. Au niveau cellulaire, les cellules alvéolaires de type II en culture formant une monocouche participent activement au transport du sodium et de liquide, du milieu de culture vers le substrat, et ce processus est stimulé par la présence d'agents β -adrénergiques, d'analogues de l'AMPc et d'inhibiteurs de la phosphodiesterase (Goodman *et al.* 1984). La terbutaline, un agent β -adrénergique, augmente aussi la réabsorption du sodium dans le poumon intact, isolé et perfusé (Crandall *et al.* 1986). Des études similaires démontrent que le transport sodique, sensible à l'amiloride, est aussi favorisé par l'AMPc (Goodman *et al.* 1989) et par une stimulation β -adrénergique (Saumon *et al.* 1987). Le dbAMPc a également un effet sur le poumon fœtal en modifiant sa perméabilité au sodium, c'est-à-dire en le faisant passer du mode sécrétoire au mode absorbant (Walters *et al.* 1990).

Cette série de faits contribue à nous convaincre que les voies de

signalisation empruntées par les agents β -adrénergiques, par le biais du second messenger AMPc, influencent le transport du sodium des cellules alvéolaires de type II en culture. Nous voulons tenter d'élucider une partie de ces voies de signalisation dépendantes de l'AMPc intracellulaire en observant les modulations de l'expression des messagers du canal α -rENaC chez ces cellules. En d'autres termes, l'AMPc intracellulaire a-t-elle un impact sur l'expression du canal en modifiant la quantité de ses messagers.

5.2.1. IMPACT D'UN TRAITEMENT AU dbAMPc À COURT TERME SUR DES CELLULES EN MONOCOUCHE

Nous avons d'abord étudié l'impact d'un analogue de l'AMPc, le dbAMPc, sur l'expression du canal α -rENaC pour des cellules de type II en monocouche. Le dbAMPc a la propriété de pénétrer aisément la membrane cellulaire pour augmenter la concentration intracellulaire en AMPc et ainsi pouvoir agir à la cible. Le dbAMPc a été utilisé à une concentration finale de 10^{-3} M comme rapporté précédemment, pour les cellules alvéolaires de type II en culture (Goodman *et al.* 1984 et Suzuki *et al.* 1995), pour des poumons isolés et perfusés (Saumon *et al.* 1987), puis *in vivo* (Berthiaume 1991).

La figure 6 indique que les cellules sont isolées au Jour 0, puis traitées au Jour 3 au moment où les cellules atteignent la confluence. L'ARN total est extrait à la suite d'un traitement d'une durée variable (1 h, 4 h, 8 h, 24h et 48 h); chaque échantillon traité possède son propre contrôle non traité. Le buvardage de type Northern permet la quantification des ARN messagers.

L'expression des messagers d' α -rENaC augmente d'un facteur de 2.1 par rapport au groupe contrôle après 8 h de traitement au dbAMPc 1 mM des cellules alvéolaires de type II en culture formant une monocouche

**Protocole de traitement des cellules
alvéolaires de type II isolées et mises
en culture**

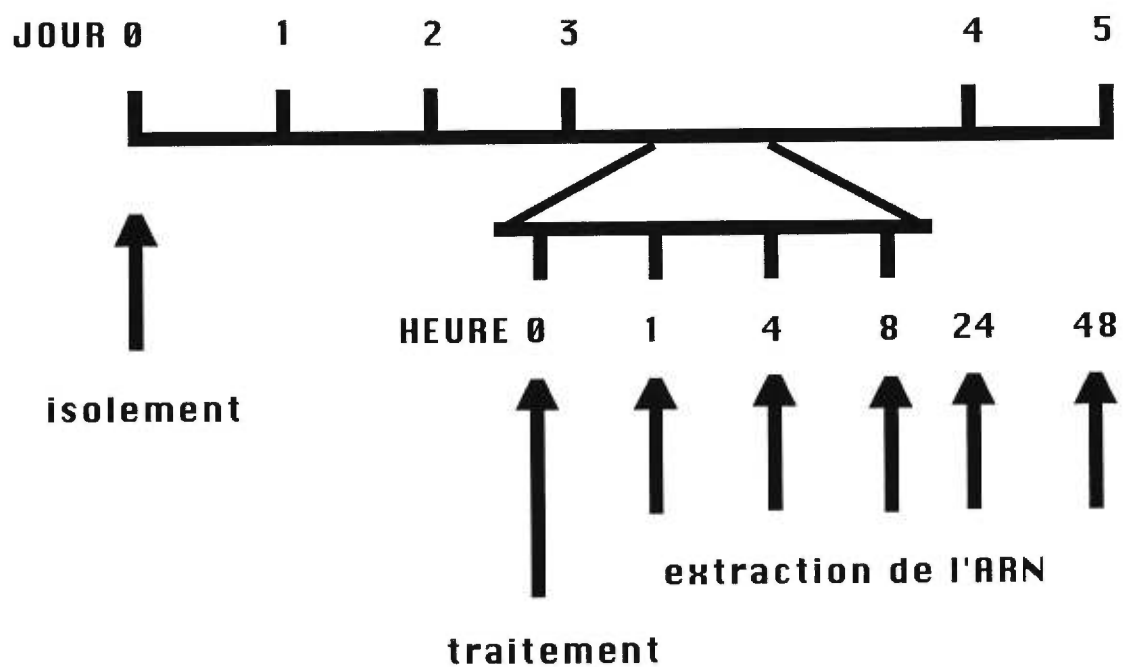


Figure 6

(figure 7). Cette hausse du messager n'est pas soutenue et son expression redevient semblable au contrôle lorsque les cellules sont traitées durant 24 h ou 48 h.

Cette augmentation de l'expression d' α -rENaC à 8 h se produit en présence d'un analogue de l'AMPc, le dbAMPc. Toutefois, ceci ne signifie pas implicitement que cette hausse est produite par une augmentation intracellulaire d'AMPc. Le dibutyrate, potentiellement issu de l'hydrolyse du composé dbAMPc utilisé ici pour stimuler les cellules de type II, pourrait favoriser la formation de dômes afin d'influencer le transport sodique; Lever 1979, et Mason *et al.* 1982 rapportent d'ailleurs que le butyrate de sodium stimule la formation des dômes. Le dibutyrate pourrait donc être responsable de cette augmentation de l'expression d' α -rENaC. En conséquence, nous avons évalué l'effet d'un autre agent pouvant impliquer une augmentation de l'AMPc intracellulaire.

5.2.2. STIMULATION EN AMONT DES VOIES DE SIGNALISATION PAR LA FORSKOLINE

Suite à l'expérience précédente, nous voulons nous assurer que cette intensification des messagers d' α -rENaC est reliée à une augmentation intracellulaire de l'AMPc, donc dépendante des voies de signalisation de l'AMPc. La forskoline est un agent reconnu pour activer l'adénylate cyclase, une enzyme intracellulaire responsable de la transformation de l'ATP en AMPc (figure 3), donc qui augmente directement la concentration intracellulaire d'AMPc (revu par Seamon et Daly, 1986).

Les cellules alvéolaires de type II en culture ont été stimulées par la forskoline 20 μ M en suivant les indications du protocole décrit à la figure 6. La concentration finale de forskoline a été déterminée en tenant compte d'expériences rapportées ailleurs dans la littérature.

Expression d' α -rENaC suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM

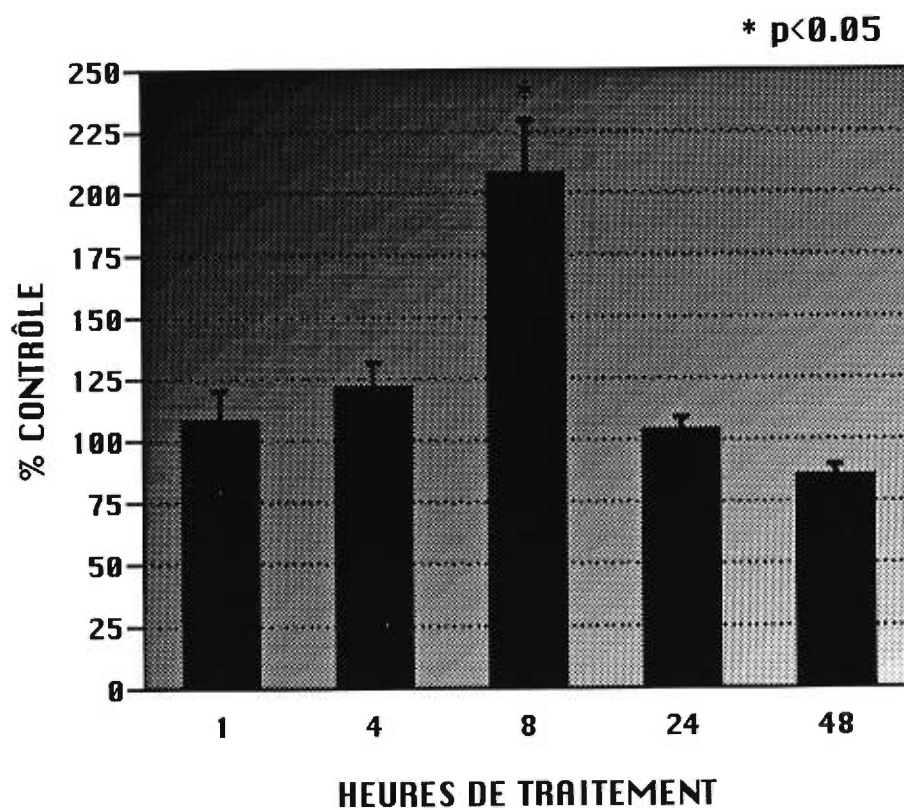


Figure 7

Des concentrations de forskoline semblables ont précédemment été décrites: sur des cellules alvéolaires de type II en culture à 5 μM (5×10^{-6} M) (Brown 1994, Gobran et Rooney, 1990, et Rice *et al.* 1985) et à 50 μM (5×10^{-5} M) (Suzuki *et al.* 1995); 10 μM (1×10^{-5} M) sur des cellules alvéolaires de type II de fœtus à terme de mouton (Tessier *et al.* 1996), sur des explants de poumons fœtaux de rat (Floros *et al.* 1991), et sur des poumons humains fœtaux en culture (Odom *et al.* 1990). Nous avons donc choisi de traiter les cellules à une concentration finale de forskoline de 20 μM (2×10^{-5} M).

Le patron d'expression des messagers d' α -rENaC suite à une stimulation à la forskoline 20 μM est très similaire (résultats non présentés) à celui produit par le dbAMPc 1mM (voir figure 7). À 8 h de traitement, la forskoline 20 μM augmente l'expression d' α -rENaC de 1.9 fois (figures 8 et 9). Suite à une analyse à comparaisons multiples de Fisher, les groupes traités au dbAMPc et à la forskoline sont statistiquement identiques, mais différents du contrôle (dbGMPc).

En stimulant en amont des voies de signalisation dépendantes de l'AMPc à l'aide de la forskoline qui sollicite l'adénylate cyclase, on obtient des résultats similaires à ceux obtenus après un traitement au dbAMPc. Il semble donc qu'une augmentation de l'AMPc intracellulaire chez les cellules alvéolaires de type II formant une monocouche soit responsable du doublement de l'expression des messagers d' α -rENaC suite à un traitement de 8 h.

5.2.3. EFFET D'UN TRAITEMENT AU dbGMPc

Trois arguments nous ont convaincus de tester le dbGMPc sur les cellules alvéolaires de type II: la similitude dans la structure moléculaire entre la GMPc et l'AMPc, l'effet hypothétique du dibutyrate présenté plus tôt, et la présence importante de l'ANF et de son second

Expression d' α -rENaC, de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ et du gène standard de la β -actine suite à une stimulation des cellules de type II au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μM et au dbGMPc 1 mM

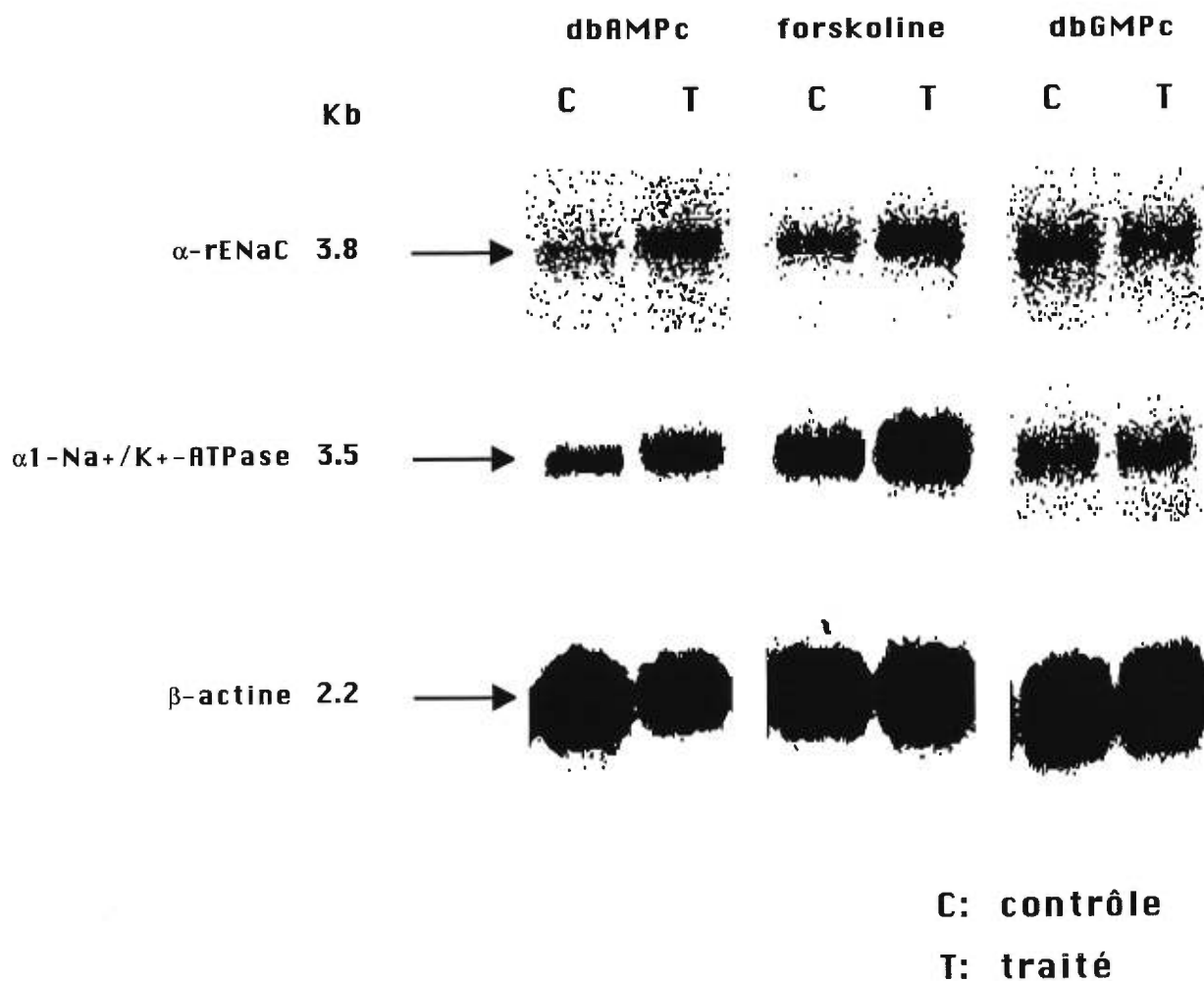


Figure 8

Expression d' α -rENaC suite à une stimulation de 8 h au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μ M et au dbGMPc 1 mM

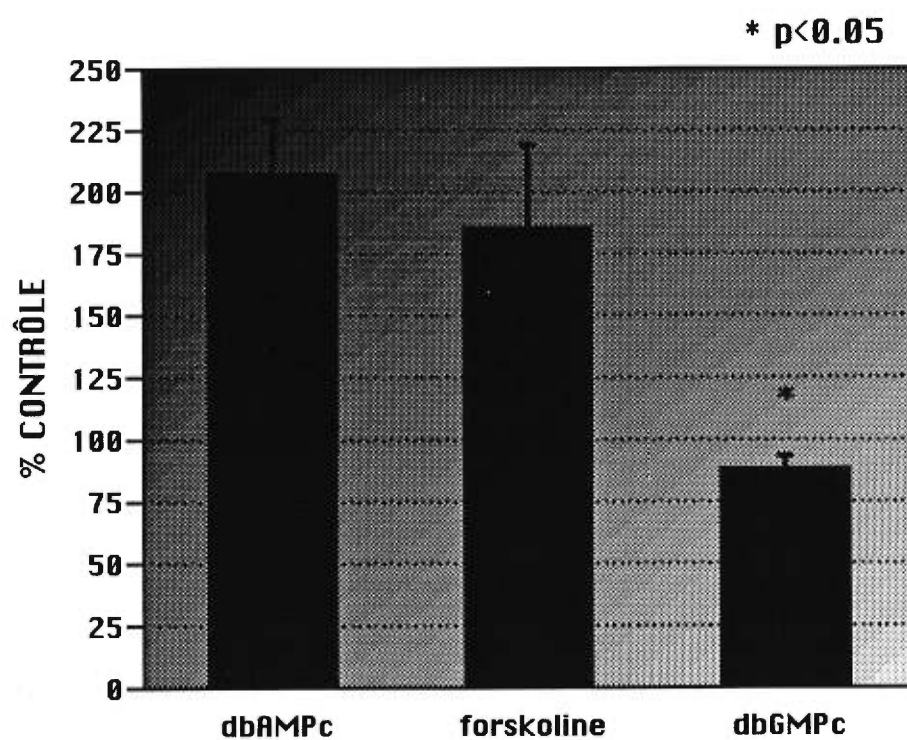


Figure 9

messenger, la GMPc, dans le poumon.

Premièrement, nous voulons observer le comportement de l'expression des messagers du canal α -rENaC en présence d'un autre nucléotide cyclique apparenté à l'AMPc, la GMPc. La structure moléculaire des nucléotides cycliques pourrait être responsable de la hausse des messagers du canal observée à 8 h.

Deuxièmement, le dibutyrate pourrait produire cette augmentation des messagers du canal suite à l'hydrolyse du dbAMPc. D'ailleurs, Lever (1979) et Mason *et al.* (1982) décrivent une augmentation de la formation de dômes chez les cellules de type II mises en présence du butyrate de sodium, ce qui laisse supposer des changements dans le transport sodique.

Troisièmement, comme on détecte une quantité importante de récepteurs de l'ANF dans le poumon *in vitro* (Olins *et al.* 1986) et *in vivo* (Willenbrock *et al.* 1992), on peut penser que le second messenger, la GMPc, pourrait avoir une implication dans la modulation de la machinerie du transport sodique. Toutefois, le dbGMPc 1mM a déjà été testé sur des cellules alvéolaires de type II formant une monocouche (Goodman *et al.* 1984); on y rapporte que le dbGMPc n'a pas d'impact sur la formation des dômes, contrairement au dbAMPc, ce qui suggère que le GMPc n'affecte pas le système de transport de sodium et d'eau.

En effet, lorsque l'on prend compte des résultats aux figures 8 et 9, on note que les cellules alvéolaires de type II en monocouche traitées au dbGMPc 1 mM durant 8 h n'affichent pas d'accroissement des messagers du canal α -rENaC, à l'opposé des cellules traitées au dbAMPc et à la forskoline, pour le même temps d'exposition.

On peut donc alléguer que le dbGMPc n'est pas impliqué dans la modulation de l'expression d' α -rENaC chez les cellules de type II, et

que la hausse des messagers suite à la présence du dbAMPc n'est pas dépendante ni de la structure moléculaire des nucléotides cycliques, ni de la présence possible de dibutyrate. Ce constat va nous permettre d'établir le groupe traité au dbGMPc en tant que contrôle négatif à 8 h.

5.2.4. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PKA

Suite aux expériences précédentes, nous pouvons conclure que chez les cellules alvéolaires de type II en culture, l'AMPc intracellulaire semble impliquée dans le doublement de l'expression des messagers d' α -rENaC. À partir de cette information, nous voulons savoir si la cascade des voies de signalisation est affectée en aval de cette augmentation intracellulaire d'AMPc produite par le dbAMPc et la forskoline après 8 h de traitement des cellules alvéolaires de type II en monocouche, c'est-à-dire si l'activité de la PKA est augmentée.

Afin de mesurer l'activité PKA de nos cellules, les protéines totales sont extraites des cellules de type II en culture depuis le Jour 3 (voir figure 6), préalablement traitées ou non au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μ M ou au dbGMPc 1 mM, pendant 8 h. L'activité PKA est compilée en pmol/min/ μ g de protéine.

La figure 10 nous indique qu'à 8 h, l'activité PKA des cellules traitées au dbAMPc 1 mM ou à la forskoline 20 μ M est quadruplée par rapport aux cellules contrôles traitées au dbGMPc 1 mM et que cette hausse est significative. À 8 h, on retrouve donc une activité PKA augmentée qui indiquerait une activation de la voie dépendante du second messenger AMPc.

**Activité PKA suite à un traitement de
8 h au dbAMPc 1 mM, à la forskoline
20 μ M et au dbGMPc 1 mM**

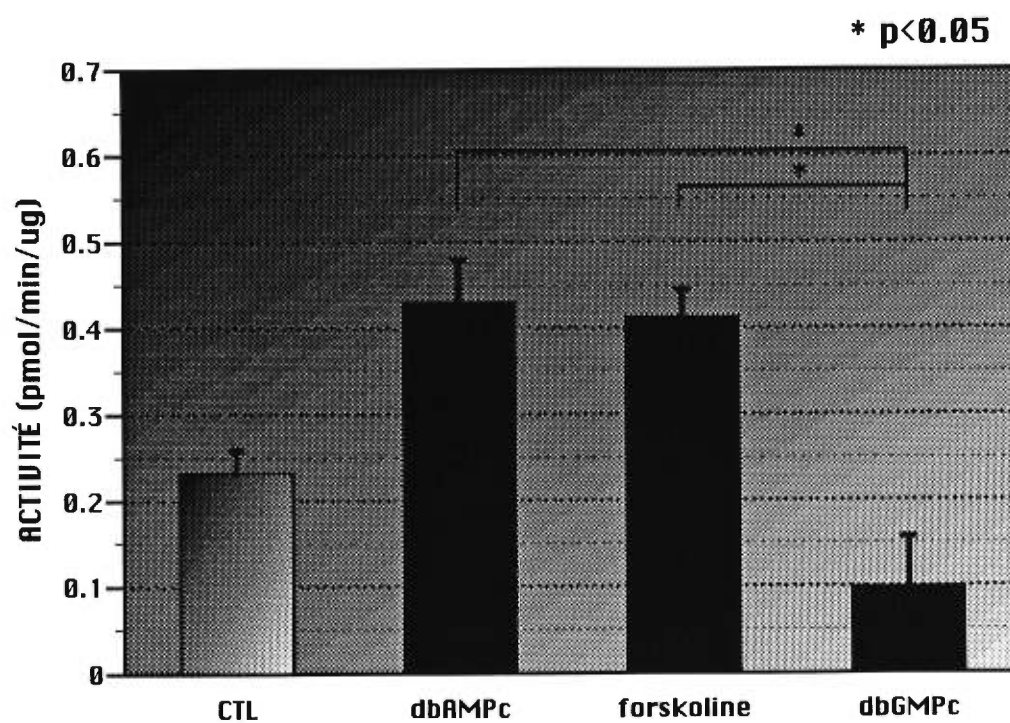


Figure 10

5.3. IMPACT D'UN TRAITEMENT À L'ACTINOMYCINE D SUR LA TRANSCRIPTION DU CANAL

L'accroissement des messagers du canal α -rENaC à la suite d'une augmentation de l'AMPc intracellulaire nous laisse entrevoir deux situations. L'une implique une stabilité accrue des messagers, tandis que l'autre comprend une stimulation de la transcription des messagers du canal α -rENaC directement ou indirectement par la phosphorylation de protéines nucléaires. Le traitement à l'actinomycine D peut nous permettre de répondre en partie à cette question.

L'actinomycine D est connue pour ses propriétés inhibitrices de la synthèse d'ARN (Busch et Smetana 1970). Une dose élevée de 2.0 μ g/ml d'actinomycine D bloque la transcription chez toutes les espèces (Perry et Kelly 1968, 1970). Elle inhibe la transcription en s'attachant à l'amorce d'ADN (Goldberg et Reich 1964). Ainsi, elle stabilise et accroît la demi-vie du complexe covalent topoisomérase I-ADN (Trask et Muller 1988).

L'actinomycine D à 5 μ g/ml a déjà été utilisée sur les cellules épithéliales pulmonaires de fœtus de rat en culture primaire (Champigny *et al.* 1994) et sur des explants pulmonaires pour une période de 12 h (Gonzales *et al.* 1994); nous avons conservé cette concentration.

Les cellules alvéolaires de type II en monocouche sont mises en présence du dbAMPc 1 mM, \pm l'actinomycine D (5 μ g/ml). Après 8 h de traitement, la figure 11 atteste que lorsque les cellules de type II sont traitées en concomitance (dbAMPc + actinomycine D), l'actinomycine D bloque complètement la synthèse des messagers induite par le dbAMPc sur l'expression des messagers du canal.

Cette étude démontre que l'AMPc a un effet transcriptionnel positif,

**Blocage de la transcription d' α -rENaC par ⁷⁷
l'actinomycine D suite à une stimulation au
dbAMPc 1 mM**

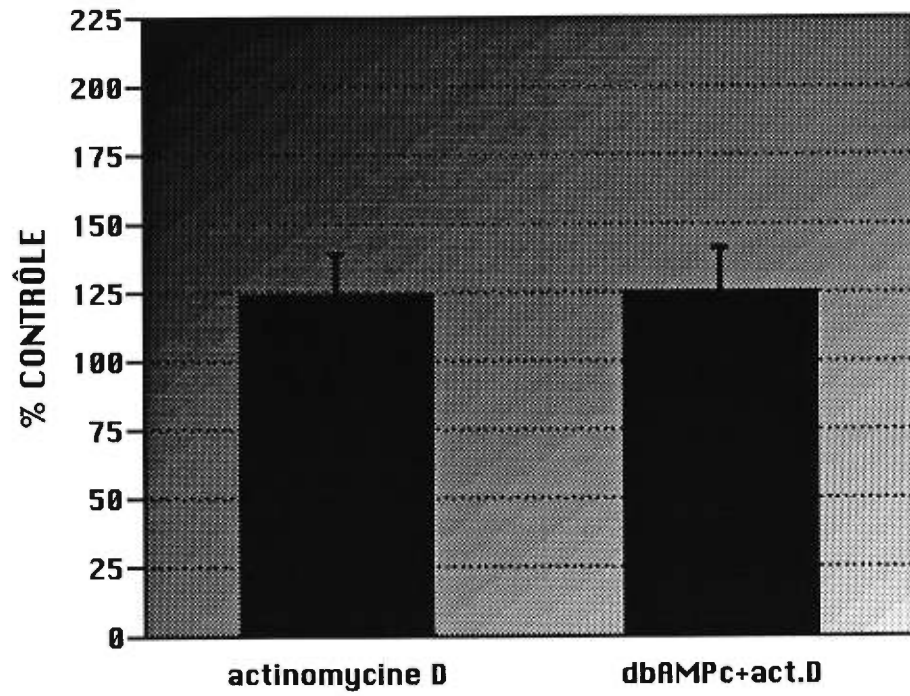


Figure 11

direct ou indirect, sur l'expression d' α -rENaC, puisque l'actinomycine D empêche complètement l'effet produit par le dbAMPc.

5.4. RÔLE MODULATEUR DES CORTICOSTÉROÏDES SUR L'EXPRESSION D' α -rENaC DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE

Les cellules alvéolaires de type II possèdent des récepteurs glucocorticoïdes (Ballard 1986). D'ailleurs, Gonzales *et al.* (1986) constatent l'effet de maturation produit par les glucocorticoïdes sur des explants de poumons humains chez le fœtus. Quelques groupes ont aussi examiné le rôle que jouent les hormones stéroïdes sur l'expression d'ENaC dans le développement du poumon chez le fœtus (O'Brodovich *et al.* 1993 et Tchepichev *et al.* 1995) et sur des cellules fœtales en culture (Champigny *et al.* 1994).

Suite à cette série d'études chez le fœtus, nous avons donc voulu déterminer l'impact possible des corticostéroïdes sur l'expression des messagers d' α -rENaC chez les cellules alvéolaires de type II adultes cette fois-ci.

5.4.1. TRAITEMENT DES CELLULES DE TYPE II À LA DEXAMÉTHASONE

Les cellules alvéolaires de type II en culture de rat adulte, formant une monocouche, ont été traitées à la dexaméthasone, un corticostéroïde synthétique. Ce dernier composé a été utilisé à une concentration de 100 nM tel que rapporté précédemment sur les cellules épithéliales fœtales du poumons (Champigny *et al.* 1994), sur des explants de poumons fœtaux du rat (Floros *et al.* 1991), et dans les milieu de culture

de cellules de type II cultivées sur des filtres (Mason *et al.* 1982).

Le protocole est décrit à la figure 6. Les cellules sont isolées au Jour 0, puis traitées au Jour 3 lorsqu'elles forment une monocouche. La dexaméthasone 100 nM est donnée durant 1 h, 4 h, 8 h, 24 h et 48 h, puis l'ARN total est extrait. Chaque échantillon traité possède son propre contrôle non traité. Le buvardage de type Northern permet la quantification des ARNm.

La figure 12 montre que la dexaméthasone 100 nM augmente graduellement l'expression des messagers d' α -rENaC de 1 h à 48 h de traitement, jusqu'à un maximum observé de 3.8 fois à 48 h. Il existe une relation significative positive entre l'expression du canal et le temps de traitement à la dexaméthasone; cette relation est démontrée par une analyse de régression des valeurs logarithmiques de l'expression du canal.

5.4.2. EFFET D'UN TRAITEMENT SIMULTANÉ À LA DEXAMÉTHASONE ET AU dbAMPc SUR L'EXPRESSION DU CANAL

Dans les explants de poumons fœtaux humains, l'expression des messagers d'ARN pour l'enzyme acide gras synthase montrent un synergisme dans l'action de l'AMPc et de la dexaméthasone (Gonzales *et al.* 1994). Les acides gras sont des précurseurs des phospholipides présents dans le surfactant; cette enzyme productrice d'acides gras est donc nécessaire à la fabrication du surfactant. De plus, la production de surfactant est directement associée aux cellules alvéolaires de type II par la présence des corps lamellaires. Nous nous sommes donc demandé si le canal α -rENaC pouvait être stimulé de manière synergique par ces deux voies de signalisation, soit celle dépendante de l'AMPc et celle des corticostéroïdes.

Expression d' α -rENaC suite à une stimulation à la dexaméthasone 100 nM

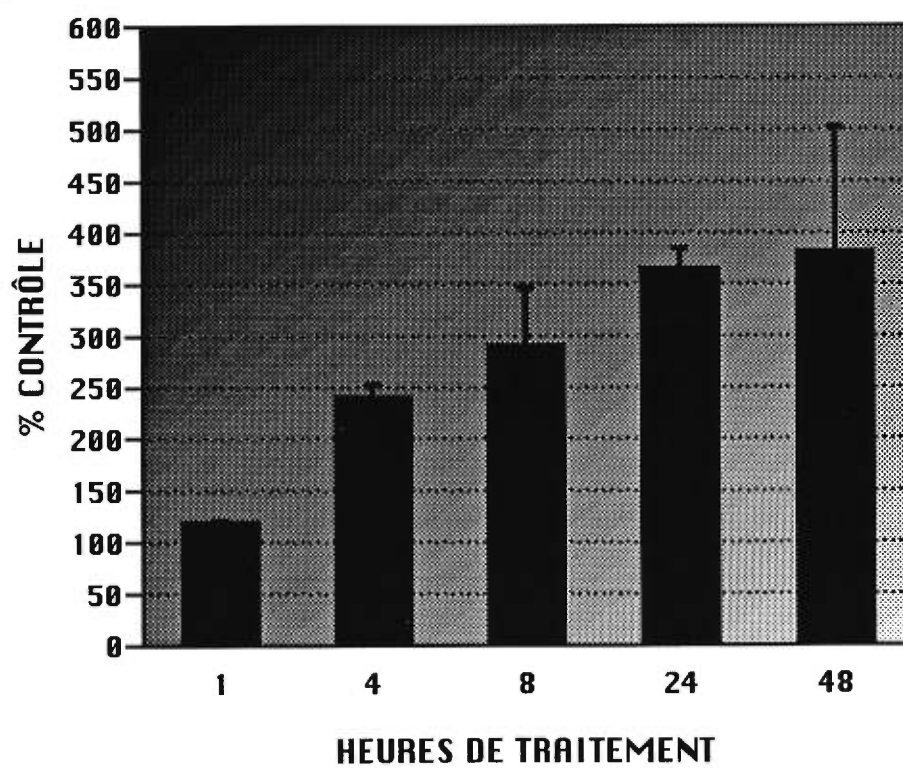


Figure 12

Nous avons suivi le protocole de base montré à la figure 6. Les cellules de type II en monocouche ont été traitées au dbAMPc 1 mM, ± la dexaméthasone 100 nM pendant 8 h. La figure 13 montre que le dbAMPc 1 mM et la dexaméthasone 100 nM seuls augmentent les messagers d' α -rENaC respectivement de 2.1 et 2.9 fois. Un traitement simultané des deux agents produit quant à lui une augmentation de 6.6 fois des messagers du canal, et ce groupe est significativement plus élevé que les deux autres groupes seuls. Dans ces conditions, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une action synergique des deux agents; toutefois, l'effet est au moins additif.

5.5. CO-RÉGULATION D' α -rENaC ET DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase AU NIVEAU DES ARNm

Plusieurs études démontrent, *in vivo* et *ex vivo*, qu'il y a réabsorption de liquide depuis le compartiment alvéolaire vers la circulation pulmonaire contre un gradient de pression oncotique, et que ce processus est bloqué par l'amiloride ou l'ouabaine (Basset *et al.* 1987a, b, Berthiaume *et al.* 1987, Effros *et al.* 1987, Goodman *et al.* 1987 et Matthay *et al.* 1982), deux inhibiteurs du transport de sodium. Ces informations viennent renforcer le modèle qui veut que le transport actif du sodium se fait par son entrée du côté apical de la cellule alvéolaire épithéliale polarisée (du côté de l'espace alvéolaire) pour en ressortir du côté basolatéral (du côté plasmatique), suivi passivement d'un flot de liquide.

Des données plus précises fournies par Schneeberger et McCarthy (1986), et par Nici *et al.* (1991) indiquent que les cellules alvéolaires de type II contiennent une grande quantité de pompes Na^+/K^+ -ATPases, contrairement aux autres cellules présentes dans les voies respiratoires inférieures, ce qui démontre la propension des cellules de

**Comparaison d'un traitement au dbAMPc 1 mM,
à la dexaméthasone 100 nM et d'un traitement
concomitant sur l'expression d' α -rENaC**

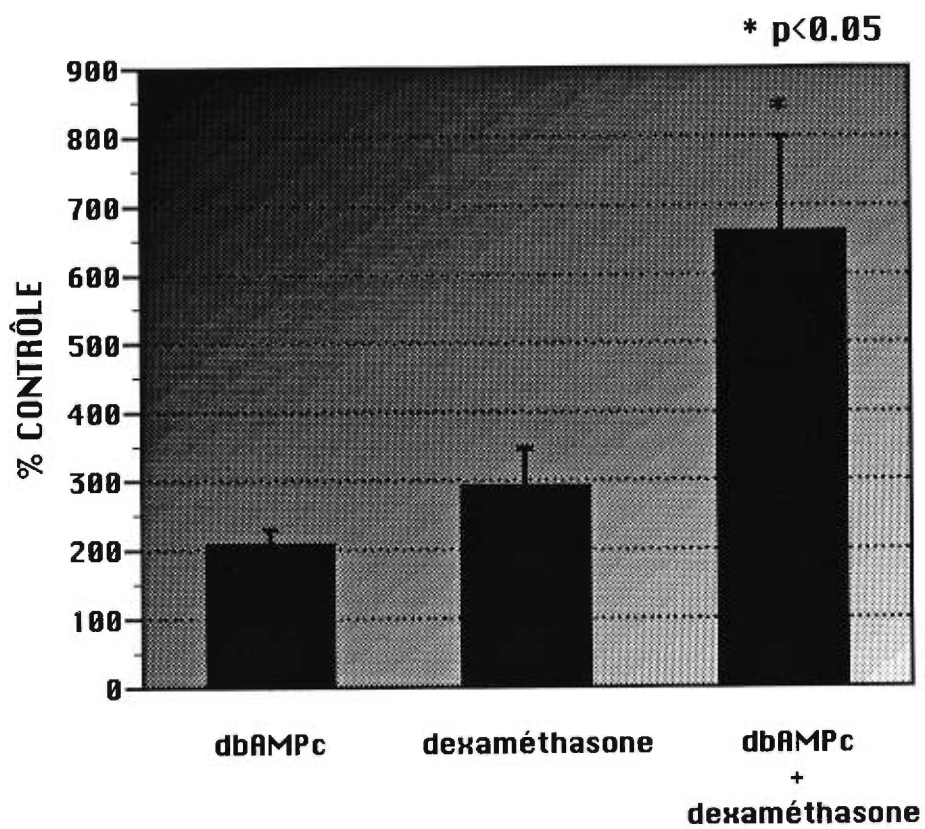


Figure 13

type II au transport actif du sodium. Ces mêmes auteurs localisent la pompe Na^+/K^+ -ATPase au niveau basolatéral des cellules de type II par immunocytochimie.

Quant aux canaux sodiques permettant l'entrée du sodium dans les cellules de type II, leur présence apicale a été confirmée autant pour les cellules fraîchement isolées que pour les cellules mises en culture (Moberly et Fanestil 1987, Sorscher *et al.* 1988, et Turner *et al.* 1985). Des études menées à l'aide des cellules alvéolaires de type II formant une monocouche suggèrent que les voies de signalisation dépendantes de l'AMPc intracellulaire sont impliquées dans le processus de mouvement transépithélial du sodium et d'eau (Cheek *et al.* 1989, Cott *et al.* 1986, et Goodman *et al.* 1984). Plus précisément, dans notre propre laboratoire, Suzuki *et al.* (1995) concluent que l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase est modulée par les agents β -adrénergiques et par une augmentation intracellulaire d'AMPc.

D'ailleurs, le clonage du promoteur de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase démontre la présence d'un élément amplificateur de type CRE (CREB/ATF) (Shull *et al.* 1990, et Yagawa *et al.* 1990). Grâce à ce dernier, le gène de la pompe Na^+/K^+ -ATPase a la capacité d'être régulé au niveau transcriptionnel par l'AMPc intracellulaire (Ahmad et Medford 1995, et Suzuki-Yagawa *et al.* 1992). De plus, suite à une analyse de séquences nucléotidiques, Shull *et al.* (1990) et Yagawa *et al.* (1990) démontrent la présence d'un élément consensus GRE répondant aux glucocorticoïdes.

Tous ces renseignements ci-haut mentionnés contribuent à nous faire suspecter la possibilité d'une co-régulation entre α -rENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase, deux canaux impliqués dans le transport transépithélial du sodium présents dans les cellules alvéolaires de type II.

5.5.1. INFLUENCE DES VOIES DE SIGNALISATION DÉPENDANTES DE L'AMPc SUR L'EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase

En premier lieu, nous avons voulu étudier le profil d'expression des messagers d'ARN pour la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase lorsque les cellules alvéolaires de type II en monocouche subissent le traitement au dbAMPc 1 mM à différents temps (1 h, 4 h, 8 h, 24 h et 48 h). L'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase est doublée (2.0 fois) à 8 h (figure 14), tout comme celle d' α -rENaC (voir figure 7). Son patron d'expression est aussi très similaire à celui d' α -rENaC; l'expression augmente jusqu'à un maximum à 8 h, puis redescend au niveau du contrôle (100%) (voir figure 7). D'ailleurs, une étude de corrélation montre que leur profil d'expression est très semblable ($R=0.9$).

En deuxième lieu, nous avons voulu comparer l'expression des messagers d' α -rENaC à ceux de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase lorsque les cellules alvéolaires de type II en culture sont exposées durant 8 h à la forskoline 20 μM ou au dbGMPc 1 mM. L'expression de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase est doublée (2.1 fois) lors du traitement de 8h à la forskoline, et elle est comparable au contrôle chez les cellules traitées au dbGMPc (0.9 fois) (figure 15). La forskoline comme le dbAMPc semblent donc moduler l'expression des messagers d' α -rENaC et ceux de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase de façon similaire après 8h de traitement (figures 8 et 15).

Troisièmement, nous avons voulu déterminer l'impact d'un traitement à l'actinomycine D sur la transcription de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. À la figure 16, le groupe traité à l'actinomycine D est statiquement identique au groupe traité à l'actinomycine D plus le dbAMPc. Ceci

**Expression de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe
Na⁺/K⁺-ATPase suite à une stimulation au
dbAMPc 1 mM**

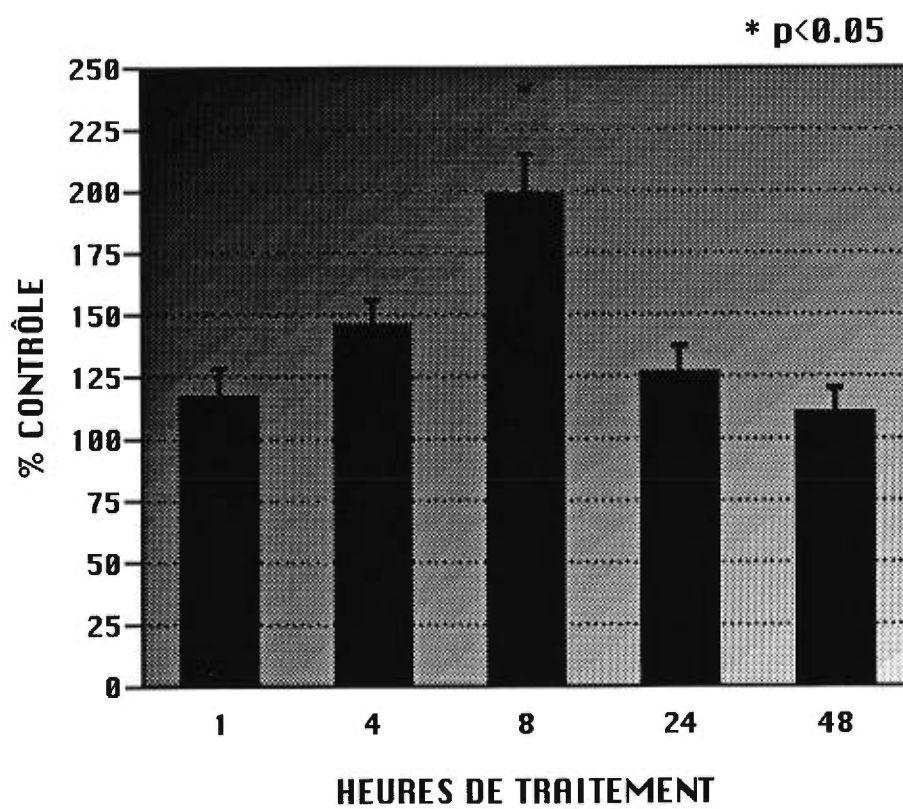


Figure 14

Expression de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ suite à une stimulation de 8 h au dbAMPc 1 mM, à la forskoline 20 μM et au dbGMPc 1 mM

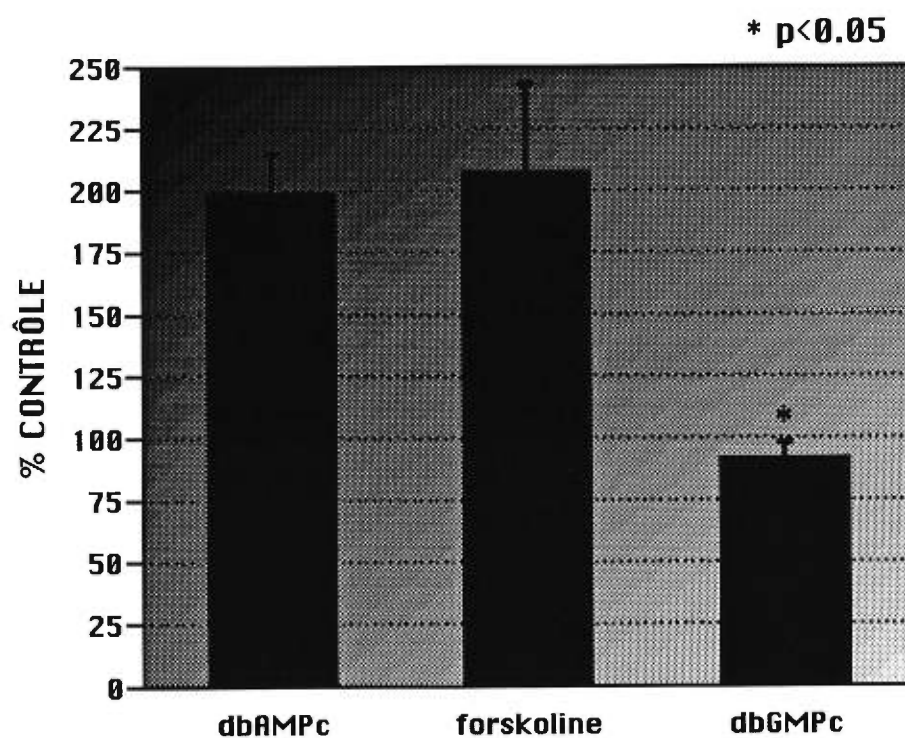


Figure 15

démontre que le doublement de l'expression des messagers d'ARN de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase produit par le dbAMPc 1 mM n'a pas lieu en présence de l'actinomycine D (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) lorsque les cellules alvéolaires de type II en monocouche sont traitées durant 8 h. On peut donc conclure que l'AMPc intracellulaire influence positivement la transcription du gène de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, tout comme celui du gène du canal α -rENaC (voir figure 11).

Jusqu'à maintenant, les mêmes variations dans l'expression des messagers sont observés pour le canal α -rENaC ainsi que pour la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase.

5.5.2. INFLUENCE DES CORTICOSTÉROÏDES SUR L'EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase

Dans le poumon, très peu de travaux ont étudié la régulation de la pompe Na^+/K^+ -ATPase par les glucocorticoïdes. On sait cependant que l'aldostérone, un minéralocorticoïde, favorise la clairance liquidienne (Olivera *et al.* 1992, résumé), et augmente le courant transépithélial sodique de l'épithélium pulmonaire (Fischer et Clauss 1990, et Illek *et al.* 1990). Cependant, un traitement du poumon fœtal à la dexaméthasone ne montre pas d'augmentation des messagers de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Tchepichev *et al.* 1995).

Les cellules sont isolées, mises en culture puis traitées en suivant le protocole de la figure 6. L'ARN total est extrait à la suite d'un traitement à la dexaméthasone 100 nM d'une durée variable (1 h, 4 h, 8 h, 24h et 48 h); chaque échantillon traité possède son propre contrôle non traité. Le buvardage de type Northern permet la quantification des ARN messagers.

Blocage de la transcription de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ par l'actinomycine D suite à une stimulation au dbAMPc 1 mM

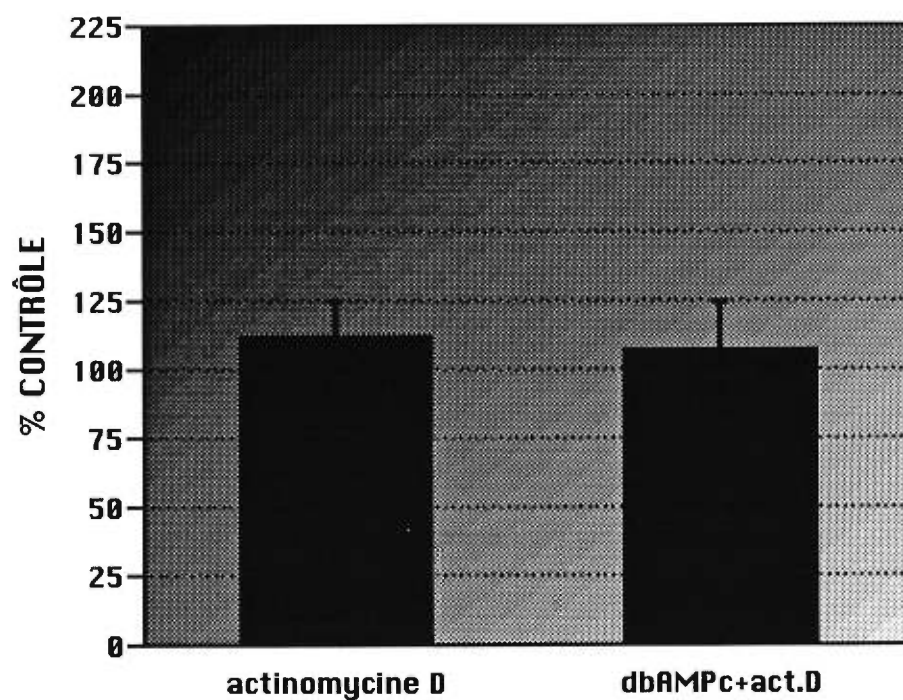


Figure 16

Le messenger de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase montre une expression maximale de 1.8 fois plus grande que le contrôle après 8 h de traitement à la dexaméthasone des cellules alvéolaires de type II en culture formant une monocouche (figure 17). Un test t de Student non pairé montre que le groupe traité durant 4 h est différent du groupe traité durant 8 h. On retrouve donc une hausse des messagers maximale moins importante pour la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (1.8 fois à 8 h) que pour le canal α -rENaC (3.8 fois à 48 h) (voir figure 12). De plus, l'expression maximale de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase semble atteinte à 8 h, contrairement à α -rENaC qui progresse jusqu'à 48 h et peut-être plus longtemps encore (voir figure 12). Le canal et la pompe montrent une réponse positive à la dexaméthasone, mais le profil serait différent.

5.5.3. RELATION ENTRE LES VOIES DE SIGNALISATION AMPc-DÉPENDANTE ET CORTICOSTÉROÏDE-DÉPENDANTE POUR L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA SOUS-UNITÉ α_1 DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPase

Ahmad et Medford (1995) sont les seuls à rapporter une possible interaction des voies de signalisation empruntées par l'aldostérone et l'AMPc dans la régulation de l'expression de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans les cellules HeLa. Rien n'a directement été produit chez les cellules alvéolaires de type II.

Nous avons suivi le protocole de base montré à la figure 6. Les cellules de type II en monocouche ont été traitées au dbAMPc 1 mM, \pm la dexaméthasone 100 nM pendant 8 h. La figure 18 montre que le dbAMPc 1 mM et la dexaméthasone 100 nM seuls augmentent les messagers de la sous-unité α_1 de la pompe Na^+/K^+ -ATPase respectivement de 2.0 et 1.8 fois. Un traitement simultané des deux agents produit quant à lui

**Expression de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe
Na⁺/K⁺-ATPase suite à une stimulation à la
dexaméthasone 100 nM**

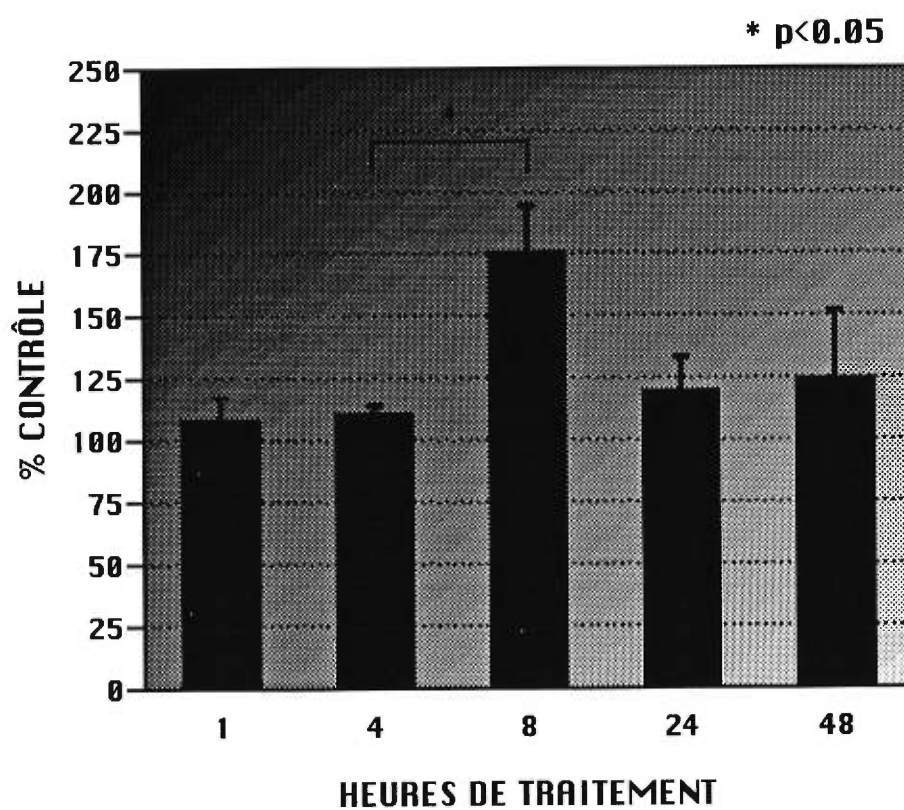


Figure 17

Comparaison d'un traitement au dbAMPc 1 mM, à la dexaméthasone 100 nM et d'un traitement concomitant sur l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$

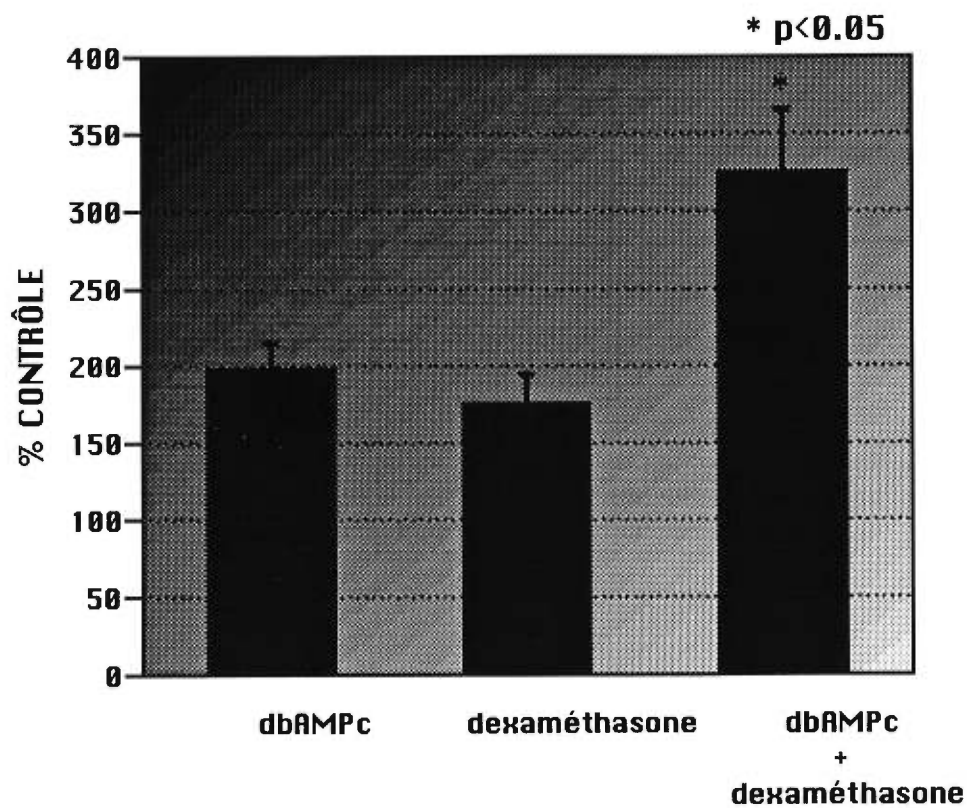


Figure 18

une augmentation additive de 3.3 fois des messagers de la pompe, et ce groupe est significativement plus élevé que les deux autres groupes seuls.

6. DISCUSSION

Nos résultats démontrent que la voie de l'AMPc et les glucocorticoïdes modulent l'expression des messagers des transporteurs sodiques, soit α -rENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase, des cellules alvéolaires de type II du rat maintenues en culture. Nous pensons que le transport transépithélial du sodium *in vitro* via ces transporteurs pourrait être modulé afin de réguler l'homéostasie liquidienne des poumons *in vivo*.

6.1. MODIFICATION DES CELLULES ALVÉOLAIRES DE TYPE II EN CULTURE

Nous avons découvert que les cellules alvéolaires de type II du rat maintenues en culture pendant plusieurs jours se modifient. L'expression des messagers d' α -rENaC varie lorsque ces cellules sont cultivées sur un substrat de plastique. La figure 5 montre une progression de l'expression d' α -rENaC depuis l'isolement jusqu'au Jour 5.

Nous avons pris le Jour 3 comme jour de référence pour plusieurs raisons. D'abord, la progression observée dans l'expression du canal depuis l'isolement nous laisse penser que la procédure d'isolement des cellules de type II puisse endommager leurs fonctions. Ensuite, parce que les cellules alvéolaires de type II forment des dômes à ce moment. Les dômes sont des indices de transport transépithélial, donc leur aspect fonctionnel est rétabli. De plus, nos cellules étaient stimulées au Jour 3 pour des raisons similaires; comme on observe une progression dans l'expression d' α -rENaC du Jour 1 au Jour 5, le fait de stimuler les cellules au Jour 3 nous assure que l'expression du messager n'est ni à son minimum, ni à son maximum. Le messager peut donc en théorie être activé ou réprimé. Quel que soit le jour de référence utilisé, le profil

d'expression ainsi que les ratio respectifs d'une journée à l'autre sont conservés.

La raison de ces variations observées chez les cellules de type II peut être de deux ordres. Premièrement, lorsque les cellules alvéolaires de type II sont maintenues en culture, elles subissent une série de modifications et perdent leurs caractéristiques spécifiques au phénotype de type II (Brody et Williams 1992, et Dobbs 1990). De plus, ces cellules acquièrent graduellement des caractéristiques morphologiques et antigéniques particulières aux cellules de type I *in vivo* (Brody et Williams 1992, Christensen *et al.* 1993, Danto *et al.* 1992, Dobbs *et al.* 1985, et Dobbs *et al.* 1988). Ceci a comme conséquence qu'on ignore quel est le phénotype des cellules obtenu après un certain temps en culture. La progression de l'expression d' α -rENaC observée depuis l'isolement jusqu'au Jour 5 (figure 5) nous montre que même si les cellules de type II perdent leurs caractéristiques propres, et même si elles gagnent celles des cellules de type I, le canal α -rENaC est toutefois exprimé. De plus, nous avons observé des dômes à partir du Jour 2 en culture (résultats non présentés); le transport transépithélial de sodium suivi passivement d'eau a donc cours. Toutefois, il est impossible de savoir à ce jour si les cellules de type I possèdent ou non des canaux sodiques.

Deuxièmement, on rapporte que le canal rENaC pourrait se dégrader chez des cellules cultivées (Hu *et al.* 1991, résumé, et Turner *et al.* 1985). La méthode d'isolement pourrait être responsable du processus de dégradation du canal, car plusieurs changements sont observés après la procédure, dont l'induction de l'expression des protéines de choc thermique (Brandes et Finkelstein 1989) et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Harbeck *et al.* 1988). À la figure 5, on observe que les messagers d'ARN d' α -rENaC sont exprimés de façon croissante depuis l'isolement jusqu'au Jour 5. Toutefois, cela ne nous renseignent pas sur la dégradation possible de la protéine du canal et

sur son aspect fonctionnel.

Nous pensons que le processus de différenciation des cellules de type II en cellules de type I pourrait être impliqué dans ces changements d'expression. Mais comme nous voulions appuyer des études antérieures utilisant des modèles *in vivo* qui, quant à eux, démontrent une grande complexité, le modèle des cellules de type II en culture est quant à lui beaucoup plus simplifié. Le poumon est constitué de plusieurs types cellulaires et tissulaires. L'utilisation d'un modèle à l'échelle cellulaire nous permet de mieux disséquer les éléments responsables du transport transcellulaire du sodium. Les cellules alvéolaires de type II représentent un outil important dans l'étude biologique de l'espace alvéolaire (Dobbs 1990, Kikkawa et Yoneda 1974, et Mason et Williams 1991). Elles représentent un système *in vitro* approprié dans l'étude de plusieurs fonctions biologiques (Paine et Simon 1996). La formation de dômes confirme l'importance du transport transépithélial de sodium chez les cellules de type II en culture.

En bref, l'étude de l'expression spontanée sur sept jours d' α -rENaC (figure 5) nous montre que le modèle des cellules alvéolaires de type II est valide, même si des variations de l'expression d' α -rENaC sont observées. Cependant, cette fluctuation de l'expression d' α -rENaC nous a contraint d'utiliser un contrôle pour chaque intervalle de temps. Il est aisé de voir que nous n'aurions pas pu utiliser un même contrôle au Jour 3 lorsque les cellules sont extraites au Jour 3, au Jour 4 et au Jour 5 puisque selon l'analyse à comparaisons multiples de Fisher, le Jour 3 est statistiquement différent du Jour 5.

6.2. IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'AMPc DANS LA MODULATION D' α -rENaC

Nos travaux démontrent que la voie de signalisation de l'AMPc est impliquée dans la modulation de l'expression des messagers d' α -rENaC chez les cellules de type II formant une monocouche. Cette conclusion nous vient du fait que nous avons d'abord montré que le dbAMPc 1 mM augmente de 2 fois l'expression des messagers d' α -rENaC après 8 h de traitement (figures 7, 8 et 9). Ensuite, nous avons découvert qu'une stimulation de ces cellules en amont de la voie de signalisation à l'aide de la forskoline 20 μ M avait le même impact sur l'expression du canal, c'est-à-dire un doublement des messagers à 8 h (figures 8 et 9), et un patron d'expression similaire entre 1 h et 48 h de stimulation (voir figure 7). Puis la figure 10 nous indique que la voie de signalisation est affectée en aval puisque l'activité PKA est quadruplée par rapport au traitement au dbGMPc lorsque les cellules sont stimulées au dbAMPc et à la forskoline durant 8 h. Enfin, nous avons démontré que cet impact n'est pas reproductible lorsqu'on stimule une autre voie de signalisation, soit celle de la GMPc (figures 8 et 9). Finalement, nos résultats montrent que cet impact de l'AMPc intracellulaire serait en partie d'ordre transcriptionnel puisque l'actinomycine D bloque totalement l'effet produit par le dbAMPc suite à un traitement de 8 h.

Nous avons démontré de deux façons que l'AMPc intracellulaire double les messagers du canal après 8 h de stimulation des cellules de type II en monocouche. D'abord, nous avons utilisé le dbAMPc, un analogue de l'AMPc qui pénètre la membrane plasmique. Ce produit est connu pour augmenter directement la concentration intracellulaire en AMPc. Puis en stimulant la voie de signalisation en amont à l'aide de la forskoline, ce qui a comme conséquence d'augmenter indirectement la concentration intracellulaire d'AMPc. Ces deux agents provoquent une réponse similaire sur les messagers d'ARN du canal (figures 7, 8 et 9). De plus, les travaux de mon collègue, le Dr Minakata, démontrent aussi

qu'une stimulation en amont de la cascade augmentent les messagers d' α -rENaC de 1.8 fois par rapport au contrôle (communication personnelle). Il a utilisé la terbutaline, un agoniste des récepteurs β_2 -adrénergiques; les cellules de type II sont stimulées dès l'isolement pendant deux jours.

Deux éléments de nos travaux nous indiquent que l'effet de doublement des messagers d' α -rENaC chez les cellules de type II après 8 h de traitement au dbAMPc est en partie d'ordre transcriptionnel. D'abord, l'expérience utilisant l'actinomycine D et l'AMPc montre que la transcription du canal est en partie responsable de cette réponse observée à 8 h. Le clonage du promoteur d' α -rENaC permettrait de déterminer la présence ou non d'un élément CRE. D'ailleurs, la région en 5' du gène γ -hENaC a été cloné (Thomas *et al.* 1996), et elle contient plusieurs sites probables pour l'attachement de facteurs de transcription, dont un élément CRE et AP-2 qui ont une capacité de réponse à l'AMPc. Comme les trois sous-unités d'ENaC possèdent une certaine homologie de séquence entre elles, il est possible que la région du promoteur soit conservée. À partir de ces résultats, on pouvait se demander si la voie de l'AMPc était affectée en aval des mécanismes menant à une augmentation intracellulaire d'AMPc. Ensuite, le profil d'expression des messagers d' α -rENaC est très semblable à celui de gènes dont la transcription est modulée par l'AMPc et qui ont une réponse lente (Jungmann *et al.* 1983, Milsted *et al.* 1987, et Roesler *et al.* 1988); donc le fait que la réponse obtenue suite à une stimulation des cellules de type II au dbAMPc ou à la forskoline se situe à 8 h de traitement pourrait impliquer la transcription.

En plus d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc pour démontrer l'implication de la voie de signalisation dépendante de l'AMPc, nous avons stimulé les cellules de type II en monocouche en vue de démontrer que cette cascade est affectée aussi en aval. Nous avons noté l'activité PKA à cet effet. La figure 10 montre une persistance de

l'activation de la PKA à 8 h lorsque les cellules sont traitées au dbAMPc ou à la forskoline, et ces groupes sont différents statistiquement du contrôle négatif traité au dbGMPc. Il est étonnant de souligner une persistance de l'activité PKA après 8 h de stimulation puisque des cellules alvéolaires de type II traitées à la forskoline ou à la terbutaline montrent une activité PKA augmentée après 2 min, et cette activation persiste jusqu'à 20-30 min d'exposition des agonistes (Rice *et al.* 1985). Il est donc possible que l'activité PKA notée à 8 h soit la pointe de l'iceberg, c'est-à-dire au moment d'une décroissance. Il aurait donc été intéressant de noter l'activité PKA entre 0 et 30 min.

D'autres expériences nous auraient permis de déterminer l'implication de cette cascade de signalisation. Une chute des messagers du canal à 8 h en présence du H-89, un inhibiteur spécifique de la PKA, nous aurait aussi indiqué que la PKA est impliquée dans ce doublement des messagers à 8 h. L'acide okadaïque, un puissant inhibiteur de la phosphatase 2A, permettrait de déterminer l'implication de CREB.

Malgré que nous ayons une augmentation des messagers d'ARN du canal α -rENaC après une augmentation intracellulaire en AMPc, ceci ne nous renseigne pas sur l'état de la protéine. C'est-à-dire que cette augmentation des messagers se traduit-elle par une hausse au niveau protéique? Est-ce que la quantité de canaux sera augmentée? Et ces canaux sont-ils fonctionnels? L'emploi de la cycloheximide, un bloqueur de la synthèse protéique, permettrait de déterminer la présence d'un contrôle post-traductionnel. De plus, des mesures d'augmentation d'un courant court-circuit, de captation de sodium traceur et des études de *patch clamp* pourraient nous renseigner davantage sur l'aspect fonctionnel d' α -rENaC. D'ailleurs, Renard *et al.* (1995) suggèrent que des mécanismes post-transcriptionnels pourraient réguler l'activité du canal.

Des résultats préliminaires utilisant le buvardage de type Western à

l'aide d'un anticorps polyclonal (Rotin *et al.* 1994) nous indiquent qu'il n'y a pas d'augmentation dans la quantité de protéines du canal après 8, 10 et 12 h de traitement au dbAMPc (résultats non présentés). Cette absence d'augmentation de la quantité de canaux pourrait être expliquée par le fait que l'anticorps était plus ou moins fiable. Selon le Dr Rotin, cet anticorps fonctionne bien avec des formes purifiées de la protéine et moins bien avec des lysats cellulaires (communication personnelle). Malheureusement, aucun résultat satisfaisant n'a été produit à partir de cet anticorps dans le laboratoire. Nous n'avons donc pas poursuivi cette route. De plus, il pourrait y avoir une dégradation du complexe protéique (Hu *et al.* 1991, et Turner *et al.* 1985) en raison des conditions de culture (Brandes et Finkelstein 1989, et Harbeck *et al.* 1988).

Pour établir la spécificité de la réponse à l'AMPc, nous avons stimulé les cellules alvéolaires de type II en monocouche avec le dbGMPc, démontrant ainsi qu'il n'a pas d'effet sur l'expression d' α -rENaC après 8 h de stimulation (figures 8 et 9). Le choix du dbGMPc comme agent stimulateur nous est apparu évident pour trois raisons. D'abord, parce que Goodman *et al.* (1984) ont démontré que la formation de dômes chez les cellules alvéolaires de type II n'est pas affectée par la présence de dbGMPc. On pense donc que le transport transépithélial de sodium n'est pas modifié par la présence de dbGMPc. La GMPc n'a pas d'effet sur le transport sodique de l'épithélium de la vessie (Sahib *et al.* 1978). Eichinger et Walker (1996) abondent aussi en ce sens au niveau du poumon puisqu'ils concluent que la GMPc n'affecte pas le mouvement de fluide. Considérant ces faits, le dbGMPc constituait un contrôle négatif potentiel. Ensuite, parce que nous voulions un contrôle compte tenu de la structure nucléotidique semblable de l'AMPc qui aurait pu être responsable de la réponse observée à 8 h chez les cellules de type II. Finalement, parce que la portion dibutyrate retrouvée dans l'analogue de l'AMPc utilisé (dbAMPc) pourrait, suite à son hydrolyse, favoriser une augmentation du transport sodique puisque le butyrate

de sodium augmente la formation des dômes chez les cellules de type II en culture (Lever 1979, et Mason *et al.* 1982). Cependant, certains rapportent l'influence négative qu'aurait le système GMPc-ANF sur la réabsorption du sodium dans le canal collecteur médullaire interne (Knepper *et al.* 1991, et Stanton 1991b). Light *et al.* (1989, 1990) rapportent que la GMPc réduit la probabilité d'ouverture du canal cationique sensible à l'amiloride. Dans le poumon, l'ANF diminuerait le transport sodique actif mais augmenterait la perméabilité de l'épithélium alvéolaire (Olivera *et al.* 1993). Comme on retrouve une grande quantité de l'hormone et du récepteur de l'ANF chez les cellules de type II, on a pensé que cette voie de signalisation pouvait jouer un rôle dans l'excrétion du sodium, et peut-être dans la régulation négative de l'expression du canal α -rENaC. Les résultats obtenus à partir d'une stimulation des cellules de type II par la GMPc indiquent que ce produit est adéquat en tant que contrôle (figure 9). L'expression d' α -rENaC est toujours sous les 100% par rapport au contrôle non traité. Même si l'effet produit par le dbGMPc semble légèrement négatif, il n'est jamais différent statistiquement du contrôle non traité. Donc la GMPc ne semble pas être impliquée dans l'expression des messagers d' α -rENaC.

La réponse obtenue suite à une augmentation de l'AMPc intracellulaire chez les cellules de type II, en l'occurrence le doublement des messagers d'ARN du canal α -rENaC, a été produite en présence de sérum dans le milieu. La présence de sérum de rat inhibe la progression du phénotype de type I chez les cellules de type II en culture par rapport à un milieu sans sérum ou avec sérum bovin de nouveau-né (Borok *et al.* 1995). L'utilisation d'un milieu sans sérum permet par contre le maintien prolongé des propriétés bioélectriques des cellules de type II formant une monocouche (Cheek *et al.* 1991, résumé). Nous pouvons donc nous interroger sur l'effet potentialisateur que pourrait démontrer le sérum. Un facteur de croissance pourrait potentialiser la réponse au dbAMPc. La présence ou l'absence de sérum dans le milieu

de culture ne montrent aucune différence significative sur l'expression des messagers du canal lorsque les cellules de type II en monocouche sont traitées au dbAMPc durant 8 h (résultats non présentés). Il semblerait donc que le sérum n'a pas d'impact sur la modulation de l'expression des messagers d' α -rENaC par l'AMPc.

En résumé, nous avons démontré que l'AMPc intracellulaire est impliqué dans le doublement des messagers d' α -rENaC chez les cellules de type II du rat maintenues en culture après 8 h de stimulation. Cet impact produit par l'AMPc est en partie d'ordre transcriptionnel et pourrait impliquer la présence d'un élément CRE dans le promoteur du gène. Il semble donc que cette réponse emprunte la voie de signalisation de l'AMPc, car des éléments tant en amont qu'en aval de la voie de signalisation sont affectés. De plus, la voie de la GMPc n'affecte pas les messagers du canal. Enfin, l'effet de l'AMPc sur l'expression des messagers d' α -rENaC est indépendante de la présence du sérum dans le milieu.

6.3. MODULATION D' α -rENaC PAR LES GLUCOCORTICOÏDES

Nous avons démontré que la dexaméthasone a un impact majeur sur l'expression d' α -rENaC chez les cellules alvéolaires de type II en monocouche. Les résultats obtenus à la figure 12 démontrent bien l'importance que joue la dexaméthasone dans les cellules de type II: déjà à 8 h, nous pouvons observer une augmentation des messagers du canal de près de trois fois (figure 12); cette hausse se poursuit à 24 h et 48 h, jusqu'à un maximum de 3.8 fois après 48 h de traitement. Nous savons qu'il y a une progression de l'expression du canal dans le temps d'après une analyse de régression, mais nous ne savons pas si cette progression se poursuit après 48 h.

D'ailleurs, Champigny *et al.* (1994) avaient rapporté que des cellules épithéliales fœtales en culture primaire traitées à la dexaméthasone atteignent un maximum d'expression des messagers d'ARN du canal α -rENaC à 8 h de traitement; l'aldostérone produirait le même effet. Dans le poumon entier, la dexaméthasone augmente aussi les messagers du canal. En utilisant des agonistes et des antagonistes des récepteurs à minéralocorticoïdes et à glucocorticoïdes, Champigny *et al.* (1994) ont déterminé que la dexaméthasone exerçait son action par les récepteurs à glucocorticoïdes. Les résultats de Renard *et al.* (1995) sur les rats surrénalectomisés vont aussi dans cette direction. L'ensemble de ces résultats suggère que les glucocorticoïdes sont les principaux agents régulateurs de l'expression de rENaC dans le poumon; leur taux circulant *in vivo* est suffisamment élevé pour assurer une transcription maximale des trois sous-unités. Les minéralocorticoïdes, comme l'aldostérone, agiraient via les récepteurs à glucocorticoïdes dans le poumon.

Par contre, chez le rat, l'injection de dexaméthasone ne modifie pas l'expression d' α -rENaC dans le poumon (Renard *et al.* 1995). Toutefois, les rats surrénalectomisés montrent une expression beaucoup plus faible d' α -rENaC. Renard *et al.* (1995) concluent que les trois sous-unités de rENaC seraient exprimées constitutivement dans le poumon et ne répondraient donc pas aux hormones stéroïdiennes. En supprimant les hormones corticoïdes circulantes par la surrénalectomie, l'expression constitutive des sous-unités est abolie et peut donc être modifiée par l'addition de dexaméthasone. Nous croyons alors que lorsque nous utilisons les cellules alvéolaires de type II en culture primaire, nous sommes aussi dans des conditions où il n'y a pas d'hormones corticoïdes circulantes. La présence d'hormone corticoïdes proviendrait du milieu de culture uniquement. C'est sans doute pourquoi on observe une forte réponse à la dexaméthasone sur l'expression d' α -rENaC.

Même si l'on sait que les glucocorticoïdes présentent un effet marqué sur l'expression d' α -rENaC, nous ne savons pas à quel niveau la régulation se situe. Toutefois, chez les cellules de type II fœtales, on sait que les glucocorticoïdes affectent la transcription de gènes, soit le canal lui-même, soit des protéines activatrices; Champigny *et al.* (1994) démontrent qu'une hausse des messagers en présence de dexaméthasone provient d'une synthèse *de novo* de protéines puisqu'elle est bloquée par l'actinomycine D. Le clonage du promoteur de γ -hENaC ne permet cependant pas d'identifier de séquence GRE. Ceci nous ouvre alors trois possibilités: soit que le promoteur d' α -rENaC est différent de γ -rENaC, et peut-être possède-t-il un élément GRE, soit que l'activation de la transcription est indirecte, c'est-à-dire par le biais d'autres protéines, soit que les deux choix précédents sont possibles. Le clonage du promoteur d' α -rENaC pourrait être très utile afin de répondre à cette question.

Au niveau de la protéine du canal, son expression est aussi réduite chez les rats surrénalectomisés; cela est dû à une chute des corticoïdes circulants (Renard *et al.* 1995). Des travaux d'électrophysiologie sur les cellules alvéolaires de type II fœtales indiquent que l'aldostérone et la dexaméthasone induisent un courant sensible à l'amiloride. Ceci nous laisse donc penser que le nombre de protéines ou leur activité est augmenté. Deux hypothèses ont été émises concernant ce type de réponse. D'abord, une synthèse *de novo* de protéines du canal ou de protéines régulatrices du canal pourrait être stimulée (Asher et Garty 1988). Puis, le recrutement à partir d'un pool de canaux non fonctionnels internalisés pourrait être activé (Palmer *et al.* 1982). Nous savons que les cellules fœtales ont un comportement différent des cellules alvéolaires de type II, *in vivo* et *in vitro*. C'est pourquoi des études électrophysiologiques mesurant une augmentation du courant court-circuit et mesurant la captation du sodium traceur chez les cellules alvéolaires de type II adultes en monocouche pourraient être menées dans le même sens à l'aide de la dexaméthasone, en

parallèle avec celles de l'AMPc. Ces travaux nous permettraient de connaître l'impact physiologique de ces deux types d'agents sur le transport sodique des cellules de type II.

En résumé, nos résultats indiquent que la dexaméthasone provoque une augmentation importante des messagers du canal α -rENaC de manière progressive dans le temps chez les cellules alvéolaires de type II adultes maintenues en culture. En raison des travaux cités précédemment, il est probable que les récepteurs à glucocorticoïdes soient responsables de cette réponse en l'absence d'hormones corticoïdes circulantes. D'ailleurs, *in vivo*, Noda et al. (1997, résumé) ont démontré très récemment que la dexaméthasone augmente l'absorption liquidienne alvéolaire chez le rat; cette absorption se ferait via des canaux sodiques puisqu'elle est bloquée par l'amiloride. Les glucocorticoïdes sont utilisés fréquemment dans le traitement de l'asthme chez l'humain, et les modifications observées des canaux sodiques pourraient être responsables de certains effets secondaires.

6.4. CO-RÉGULATION D' α -rENaC ET D' α_1 -Na⁺/K⁺-ATPase

Nos résultats démontrent que les deux transporteurs sodiques, soit α -rENaC et la sous-unité α_1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase, sont régulés de manière semblable chez les cellules alvéolaires de type II en monocouche par la voie de l'AMPc, et que les glucocorticoïdes augmentent les messagers des deux transporteurs.

Il semble donc que la voie de l'AMPc affecte les deux transporteurs de manière comparable. La pompe Na⁺/K⁺-ATPase montre le même patron d'expression qu' α -rENaC (voir figure 7) lors d'un traitement au dbAMPc durant 1 h, 4 h, 8 h, 24 h et 48 h des cellules alvéolaires de type II en monocouche (figure 14) (coefficient de corrélation R=0.9). Un maximum

d'expression est observé à 8 h, et les messagers d'ARN des deux transporteurs sont doublés. Une réponse identique est observée chez les deux transporteurs lorsque les cellules sont stimulées à la forskoline, ou au dbGMPc, pendant 8 h (figures 8 et 9). Une stimulation β -adrénergique par la terbutaline au moment de l'isolement des cellules alvéolaires de type II produit une augmentation des transcrits à peu près équivalente de 1.8 et 1.5 fois le contrôle respectivement pour α -rENaC et α_1 -Na⁺/K⁺-ATPase lorsque ces cellules sont extraites après deux jours de culture (communication personnelle du Dr Y. Minakata). Or à la naissance, on sait que les poumons du fœtus sont remplis de liquide, et qu'ils doivent se vider rapidement pour passer à la respiration aérienne. Le transport transépithélial de sodium est un mécanisme sans doute fort important à cet effet. Comme il y a une hausse substantielle du taux de catécholamines chez le fœtus à la naissance, on peut penser qu'elles seraient responsables de la stimulation du transport transépithélial du sodium, et donc responsables de la clairance liquidienne. Les transporteurs majeurs impliqués dans ce processus, les canaux sodiques (ENaC) et la pompe Na⁺/K⁺-ATPase répondent en parallèle à cette stimulation β -adrénergique via la voie de signalisation dépendante de l'AMPc (Dagenais *et al.* 1997). L'impact de l'actinomycine D sur l'expression de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase nous indique que l'AMPc agit en partie au niveau de la transcription du gène. D'ailleurs, le promoteur d' α_1 -Na⁺/K⁺-ATPase contient un élément de réponse fonctionnel à l'AMPc. Des analyses de corrélation de l'expression d' α -rENaC et d' α_1 -Na⁺/K⁺-ATPase nous indiquent un lien certain (R=0.9). Cette corrélation forte nous permet de soupçonner qu'il y aurait un lien dans la régulation de ces deux transporteurs.

De plus, nos travaux démontrent l'absence d'impact de la GMPc sur les deux transporteurs, ce qui nous laisse penser que ce second messager n'influencerait pas le transport transépithélial du sodium par les

mécanismes de régulation à long terme au niveau cellulaire. Il demeure toutefois possible qu'elle puisse agir à court terme sur l'activité du canal tel que rapporté au niveau des tubules rénaux.

Finalement, nous avons démontré que la pompe Na^+/K^+ -ATPase répond aussi à la dexaméthasone, mais possiblement de manière différente à α -rENaC; l'analyse de corrélation ne permet pas de définir un lien entre la régulation de ces deux transporteurs ($R=0.1$). On observe une hausse de 1.8 fois par rapport au contrôle à 8 h de stimulation à la dexaméthasone (figure 17), comparativement à 3 fois pour α -rENaC (figure 12).

Parmi les éléments de régulation de la pompe aux glucocorticoïdes, il y a la présence d'un élément de réponse aux hormones (HRE) dans le promoteur du gène de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. D'autres mécanismes de régulation à long terme peuvent aussi être envisagés, dont une augmentation de l'activité globale de la pompe, qui n'est évidemment pas détectable par buvardage Northern. D'ailleurs, les résultats de Tchepichev *et al.* (1995) vont dans ce sens car ils ne détectent pas d'augmentation des messagers de la pompe suite à une stimulation à la dexaméthasone du poumon fœtal. Tout comme l'aldostérone, la dexaméthasone pourrait augmenter davantage l'activité enzymatique de la pompe (Ewart et Klip 1995, et Gick *et al.* 1988). De plus, Barlet-Bas *et al.* (1990) rapportent que les corticostéroïdes agissent sur le pool de pompes et favorisent leur migration vers la membrane plasmique. Toutefois, la dexaméthasone pourrait jouer un rôle secondaire dans la régulation de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, et son activité pourrait plutôt être stimulée par l'augmentation de la concentration du sodium intracellulaire (Barlet-Bas et Doucet 1988, Doucet et Barlet-Bas 1989, et Stanton et Kaissling 1989) via son entrée par ENaC. Des études mesurant l'activité enzymatique de la pompe et quantifiant la protéine de la pompe par buvardage de type Western pourraient nous renseigner sur l'impact global à long terme que produit

la dexaméthasone sur la pompe Na^+/K^+ -ATPase.

Nous pouvons donc conclure qu'il est possible qu'il existe un processus de corégulation entre α -rENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans le but de participer parallèlement au transport transépithélial du sodium. À ce moment-ci, il est toutefois difficile de l'affirmer. Nous avons apporté une réponse très partielle qui n'exclut pas cette possibilité. La voie de l'AMPc plus particulièrement, semble affecter les deux transporteurs de manière concertée. La comparaison des séquences des promoteurs d' α -rENaC et d' α_1 - Na^+/K^+ -ATPase nous donnerait de bons indices quant à une co-régulation possible. De plus, des mécanismes autres que transcriptionnels peuvent intervenir dans cette co-régulation, tels que le sodium intracellulaire, les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles, l'activité des transporteurs, etc.

6.5. INTERACTION DE L'AMPc ET DES GLUCOCORTICOÏDES DANS LA MODULATION DES COMPOSANTES DE LA MACHINERIE DU TRANSPORT SODIQUE

À ce moment-ci, il est difficile de démontrer une quelconque relation entre l'action de l'AMPc et des glucocorticoïdes chez les cellules de type II maintenues en culture. Nos travaux démontrent que les messagers d' α -rENaC et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase sont régulés de manière au moins additive par le dbAMPc et la dexaméthasone lorsque les cellules de type II forment une monocouche (figures 13 et 18).

Aucune étude ne s'est attardée sur une possible interaction entre ces deux voies de signalisation dans le poumon, dans l'expression des deux transporteurs sodiques étudiés. Des travaux observent toutefois un synergisme dans l'action de l'AMPc et la dexaméthasone dans un autre

système, plus précisément sur l'enzyme acide gras synthase dans des explants de poumons fœtaux humains (Gonzales *et al.* 1994). Cette enzyme est d'ailleurs nécessaire à la production de surfactant, une des fonctions menées par les cellules alvéolaires de type II.

L'interaction entre ces deux voies de signalisation pourrait se situer plus en amont des voies, par exemple entre les β -récepteurs et les glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes pourraient augmenter la présence des récepteurs β -adrénergiques (Cheng *et al.* 1980, Giannopoulos et Smith 1982, Maniscalco et Shapiro 1983, et Roberts *et al.* 1985) chez les cellules alvéolaires de type II. L'administration de glucocorticoïdes pourrait donc potentialiser l'effet des catécholamines endogènes et exogènes chez les cellules épithéliales de l'alvéole (Ballard 1986).

Brièvement, l'expression des deux transporteurs sodiques étudiés est régulée de manière au moins additive lors d'un traitement concomitant au dbAMPc et la dexaméthasone. Il n'est donc pas possible de démontrer un synergisme dans l'action de ces deux agents chez les cellules de type II en monocouche.

6.6. TRAITEMENT DE L'ŒDÈME PULMONAIRE VIA ENaC?

La conséquence du transport actif sur la clairance liquidienne a été clairement démontrée *in vivo*; il existe une corrélation positive entre la capacité de transporter activement le sodium par l'épithélium alvéolaire humain et le taux de résorption de l'œdème pulmonaire non cardiogénique (Matthay et Weiner-Kronish 1990). Chez les animaux (*in vivo*) (Berthiaume *et al.* 1987, et Smedira *et al.* 1991), dans les poumons isolés et perfusés (Basset *et al.* 1987a, b, et Goodman *et al.* 1987), et dans les cellules alvéolaires de type II (Goodman *et al.* 1983, Kim *et al.*

1991, et Mason *et al.* 1982), le même lien a été déduit. Étant donné que les canaux sodiques représentent au moins 50% de la voie d'entrée du sodium du côté apical (Yue *et al.* 1993), ENaC est donc en grande partie responsable de ce transport transépithélial, donc de la clairance liquidienne pulmonaire. De plus, à la naissance, ENaC semble montrer une grande importance dans le processus de clairance liquidienne pulmonaire car des souris homozygotes (ENaC^{-/-}) meurent d'un syndrome respiratoire aigu (Hummler *et al.* 1996).

Ce transport transépithélial sodique est régulé positivement par des agents β -adrénergiques *in vivo* (Berthiaume *et al.* 1987), dans les poumons isolés et perfusés (Crandall *et al.* 1986) et *in vitro* sur l'épithélium alvéolaire (Goodman *et al.* 1984, et Saumon *et al.* 1987). Ce constat permet de croire que ces agents pourraient être utilisés dans le but de réduire l'œdème pulmonaire chez les patients souffrant du syndrome de détresse respiratoire aiguë.

L'ensemble des travaux proposés dans ce mémoire confirme d'abord la présence d' α -rENaC chez les cellules alvéolaire de type II en culture. Ensuite, la régulation de ce canal et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase au niveau des messagers d'ARN par la voie de l'AMPc semble assez évidente. L'AMPc pourrait donc aussi être utile à des fins thérapeutiques, tout comme les agents β -adrénergiques. Finalement, les glucocorticoïdes qui semblent réguler les messagers des deux transporteurs sodiques étudiés sont aussi des agents potentiellement activateurs du transport transépithélial du sodium, et, donc de la clairance liquidienne *in vivo*.

7. RÉFÉRENCES

- Adamson IY, Bowden DH: The Type 2 Cell as Progenitor of Alveolar Epithelial Regeneration - A Cytodynamic Study in Mice after Exposure to Oxygen. *Lab Invest* 1974; 30(1):35-42.
- Ahmad M, Olliff L, Weisberg N, Medford RM: Transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α 1 gene expression by 8-bromo-cAMP in renal cells. Dans: Bamberg E, Schoner W (éds), *The Sodium Pump*, New York, Steinkopff Darmstat et Springer, 1994, 45-48.
- Ahmad M, Medford RM: Evidence for the regulation of Na⁺,K⁺-ATPase α 1 gene expression through the interaction of aldosterone and cAMP-inducible transcriptional factors. *Steroids* 1995; 60(1):147-152.
- Akopyanz NS, Broude NE, Bekman EP, Marzen EO, Sverdlov ED: Tissue-specific expression of Na,K-ATPase β -subunit. Does β 2 expression correlate with tumorigenesis? *FEBS Lett* 1991; 289(1):8-10.
- Alberts AS, Montminy M, Shenolikar S, Feramisco JR: Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994; 14(7):4398-4407.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Biologie moléculaire de la cellule*, Paris, Médecine-Sciences Flammarion, 1990.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; 237(4812):268-275.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM: The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1988; 1(9):887-900.

- Asher C, Garty H: Aldosterone increases the apical Na⁺ permeability of toad bladder by two different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(19):7413-7417.
- Ballard, PL: Hormones and Lung Maturation. *Monogr Endocrinol* 1986; 28:1-354.
- Ballard PL, Ertsey R, Gonzales LK, Liley HG, Williams MC: Isolation and characterization of differentiated alveolar type II cells from fetal human lung. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883:335-344.
- Barker PM, Brown MJ, Ramsden CA, Strang LB, Walters DU: The effect of thyroidectomy in the fetal sheep on lung liquid reabsorption induced by adrenaline or cyclic AMP. *J Physiol* 1988; 407:373-383.
- Barlet-Bas C, Doucet A: Aldosterone and sodium induce kidney Na-K-ATPase in vitro by two different mechanisms. *Dans: Skou JC, Nørby JG, Maunsbach AB, Esmann M (éds), The Na⁺, K⁺ Pump, Part B: Cellular Aspects*, New York, Alan R. Liss, 1988, 339-344.
- Barlet-Bas C, Khadouri C, Marsy S, Doucet A: Enhanced Intracellular Sodium Concentration in Kidney Cells Recruits a Latent Pool of Na-K-ATPase Whose Size Is Modulated by Corticosteroids. *J Biol Chem* 1990; 265(14):7799-7803.
- Barnes PJ: Beta-adrenergic Receptors and Their Regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:838-860.
- Basset G, Crone C, Saumon G: Fluid absorption by rat lung *in situ*: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol* 1987a; 384:325-345.
- Basset G, Crone C, Saumon G: Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J Physiol* 1987b; 384:311-324.
- Basset G, Bouchonnet F, Crone C, Saumon G: Potassium transport across rat alveolar epithelium: evidence for an apical Na⁺-K⁺ pump. *J Physiol* 1988; 400:529-543.

- Basten A, Miller JFAP, Sprent J, Pye J: A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance. *J Exp Med* 1972; 135:610-626.
- Basti CP, Hayslett JP: The cellular action of aldosterone in target epithelia. *Kidney Int* 1992; 42:250-264.
- Benos DJ, Saccomani G, Brenner BM, Sariban-Sohraby S: Purification and characterization of the amiloride-sensitive sodium channel from A6 cultured cells and bovine renal papilla. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8525-8529.
- Benos DJ, Saccomani G, Sariban-Sohraby S: The epithelial sodium channel. Subunit number and location of the amiloride binding site. *J Biol Chem* 1987; 262:10613-10618.
- Benos DJ: Purification of an epithelial sodium channel: mechanism of aldosterone action. *Dans: Bonvalet JP, Farman N, Lombès M, Rafestin-Oblin ME (éds), Aldosterone - Fundamental Aspects, Paris, INSERM: John Libbey Eurotext, 1991, 261-271.*
- Berrebi-Bertrand I, Maixent JM, Lelieure LG: Comparative properties of alpha and alpha plus subunits in adult rat brain and heart. *Dans: Skou JC, Nørby JG, Maunsbach AB, Esmann M (éds), The Na⁺, K⁺ Pump, Part B: Cellular Aspects, New York, Alan R. Liss, 1988, 43-50.*
- Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA: Beta-Adrenergic Agonists Increase Lung Liquid Clearance in Anesthetized Sheep. *J Clin Invest* 1987; 79:335-343.
- Berthiaume Y: Effect of exogenous cAMP and aminophylline on alveolar and lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1991; 70(6):2490-2497.
- Bertorello AM, Katz AI: Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: Physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol* 1993; 265:F743-F755.
- Bertorello AM, Katz AI: Regulation of Na⁺-K⁺ Pump Activity: Pathways Between Receptors and Effectors. *News Physiol Sci* 1995; 10:253-259.

- Bianco C, Patrick R, Nussensweig U: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. *J Exp Med* 1970; 132:702-720.
- Bland RD, Hansen TN, Haberskern CM, Bressack MA, Hazinski TA, Raj JU, Goldberg RB: Lung fluid balance in lambs before and after birth. *J Appl Physiol* 1982; 53(4):992-1004.
- Bland RD: Dynamics of pulmonary water before and after birth. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1983; 305:12-20.
- Bland RD: Lung epithelial ion transport and fluid movement during the perinatal period. *Am J Physiol* 1990; 259:L30-L37.
- Bland RD, Nielson DW: Developmental changes in lung epithelium ion transport and liquid movement. *Annu Rev Physiol* 1992; 54:373-394.
- Bonting SL, Simon KA, Hawkins NM: Studies on Sodium-Potassium-Activated Adenosine Triphosphate. 1. Quantitative Distribution in Several Tissues of the Cat. *Arch Biochem Biophys* 1961; 95:416-423.
- Borok Z, Hami A, Danto SI, Zabski M, Crandall ED: Rat Serum Inhibits Progression of Alveolar Epithelial Cells toward the Type I Cell Phenotype *In Vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12(1):50-55.
- Borrelli E, Montmayeur JP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P: Signal Transduction and Gene Control: The cAMP Pathway. *Crit Rev Oncog* 1992; 3(4):321-338.
- Botero-Uelez M, Curtis JJ, Warnock DG: Brief report: Liddle's syndrome revisited - A disorder of sodium reabsorption in the distal tubule. *N Engl J Med* 1994; 330(3):178-181.
- Boucher RC, Cotton CU, Gatzky JT, Knowles MR, Yankaskas JR: Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J Physiol* 1988; 405:77-103.
- Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL: Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 1992; 256(5056):530-532.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

- Brandes M, Finkelstein J: Induction of the stress response by isolation of rabbit type II pneumocytes. *Exp Lung Res* 1989; 15:93-111.
- Brandt RE: Cell surface saccharides of rat lung alveolar type I and type II cells. *Federation Proc* 1982; 41:755a (résumé).
- Breeze RG, Wheeldon EB: The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116(4):705-777.
- Bresnick EH, Dalman FC, Sanchez ER, Pratt WB: Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1989; 264(9):4992-4997.
- Brody JS, Williams MC: Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu Rev Physiol* 1992; 54:351-371.
- Brown D, Sorscher EJ, Ausiello DA, Benos DJ: Immunocytochemical localization of Na⁺ channels in rat kidney medulla. *Am J Physiol* 1989; 256:F366-F369.
- Brown LA: Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol* 1994; 266:L172-L177.
- Brown MJ, Oliver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DU: Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb. *J Physiol* 1983; 344:137-152.
- Brown SE, Kim KJ, Goodman BE, Wells JR, Crandall ED: Sodium-amino acid cotransport by type II alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol* 1985; 59(5):1616-1622.
- Brown SE, Heming TA, Benedict CR, Bidani A: ATP-sensitive Na⁽⁺⁾-H⁺ antiport in type II alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1991; 261:C954-C963.
- Bubien J, Benos D, Matalon S: Identification of amiloride-inhibitable sodium currents across freshly-isolated alveolar type II pneumocytes. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:A636.

- Bubien JK, Ismailov II, Berdiev BK, Cornwell T, Lifton RP, Fuller CM, Richard JM, Benos DJ, Warnock DG: Liddle's disease: abnormal regulation of amiloride-sensitive Na⁺ channels by β -subunit mutation. *Am J Physiol* 1996; 270:C208-C213.
- Busch AE, Suessbrich H, Kunzelmann K, Hipper A, Greger R, Waldegger S, Mutschler E, Lindemann B, Lang F: Blockade of epithelial Na⁺ channels by triamterenes - underlying mechanisms and molecular basis. *Pflügers Arch* 1996; 432(5):760-766.
- Busch H, Smetana K: Nucleolar RNA of high molecular weight. *Dans: Busch H, Smetana K (éds), Nucleolus*, New York, Academic Press, 1970, 211-269.
- Cairns W, Cairns C, Pongratz I, Poellinger L, Okret S: Assembly of a glucocorticoid receptor complex prior to DNA binding enhances its specific interaction with a glucocorticoid response element. *J Biol Chem* 1991; 266(17):11221-11226.
- Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC: Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 1993; 361:467-470.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994; 367:463-466.
- Cassin S, Perks AM: Amiloride inhibits arginine vasopressin-induced decrease in fetal lung liquid secretion. *J Appl Physiol* 1993; 75(5):1925-1929.
- Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD: Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 1978; 77(3):853-880.
- Champigny G, Voilley N, Lingueglia E, Friend U, Barbry P, Lazdunski M: Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na⁺ channel by steroid hormones. *EMBO J* 1994; 13(9):2177-2181.

- Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rösler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP: Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 1996; 12(3):248-253.
- Chapman DL, Widdicombe JH, Bland RD: Developmental differences in rabbit lung epithelial cell Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol* 1990; 259:L481-L487.
- Cheek JM, Kim KJ, Crandall ED: Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol* 1989; 256:C688-C693.
- Cheek JM, Woodcock-Mitchell J, Li C, Katyal SL, Singh G, Plopper CG: Effects of serum-free medium on bioelectric properties and keratin expression in tight monolayers of alveolar epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:A209 (résumé).
- Cheng HC, Kemp BE, Pearson RB, Smith AJ, Misconi L, VanPatten SM, Walsh DR: A Potent Synthetic Peptide Inhibitor of the cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 1986; 261:989-992.
- Cheng JB, Goldfien A, Ballard PL, Roberts JM: Glucocorticoids increase pulmonary β -adrenergic receptors in fetal rabbit. *Endocrinology* 1980; 107(5):1646-1648.
- Chibalin AV, Vasilets LA, Hennekes H, Pralong D, Geering K: Phosphorylation of Na,K-ATPase α -Subunits in Microsomes and in Homogenates of *Xenopus* Oocytes Resulting from the Stimulation of Protein Kinase A and Protein Kinase C. *J Biol Chem* 1992; 267(31):22378-22384.
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
- Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH: Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 1993; 365:855-859.

- Clerici C, Soler P, Saumon G: Sodium-dependent phosphate and alanine transports but sodium-independent hexose transport in type II alveolar epithelial cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1063(1):27-35.
- Cordingley MG, Riegel AT, Hager GL: Steroid-dependent interaction of transcription factors with the inducible promoter of mouse mammary tumor virus *in vivo*. *Cell* 1987; 48(2):261-270.
- Cott GR, Sugahara K, Mason RJ: Stimulation of net active ion transport across alveolar type II cell monolayers. *Am J Physiol* 1986; 250:C222-C227.
- Cott GR: Modulation of bioelectric properties across alveolar type II cells by substratum. *Am J Physiol* 1989; 257:C678-C688.
- Coupland K, Leslie RGQ: The expression of Fc receptors on guinea-pig peritoneal macrophages and neutrophils. *Immunology* 1983; 48:647-656.
- Cowell IG, Skinner A, Hurst HC: Transcriptional repression by a novel member of the bZIP of transcription factors. *Mol Cell Biol* 1992; 12(7):3070-3076.
- Crandall ED, Heming TA, Palombo RL, Goodman BE: Effects of terbutaline on sodium transport in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* 1986; 60(1):289-294.
- Crapo JD, Peters-Goldes M, Marsh-Salin J, Shelburne JS: Pathologic changes in the lungs of oxygen-adapted rats. A morphometric analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:2844-2848.
- Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J: Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122:123-145.
- 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):332-337.
- Cross CE: The granular type II pneumocyte and lung antioxidant defense. *Ann Intern Med* 1974; 80:409-411.

- Crump RG, Askew GR, Wert SE, Lingrel JB, Joiner CH: In situ localization of sodium-potassium ATPase mRNA in developing mouse lung epithelium. *Am J Physiol* 1995; 269:L299-L308.
- Dagenais A, Kothary R, Berthiaume Y: The α subunit of the epithelial sodium channel in the mouse: developmental regulation of its expression. *Ped Res* 1997 (sous presse).
- Danto SI, Zabski SM, Crandall ED: Reactivity of Alveolar Epithelial Cells in Primary Culture with Type I Cell Monoclonal Antibodies. *AM J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6(3):296-306.
- de Groot RP, den Hertog J, Vandenneede JR, Goris J, Sassone-Corsi P: Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J* 1993a; 12(10):3903-3911.
- de Groot RP, Derua R, Goris J, Sassone-Corsi P: Phosphorylation and negative regulation of the transcriptional activator CREM by p34cdc2. *Mol Endocrinol* 1993b; 7:1495-1501.
- Delaney SJ, Wainwright BJ: New pharmaceutical approaches to the treatment of cystic fibrosis. *Nature Med* 1996; 2(4):392-393.
- Devuyt O, Beaujean U, Crabbé J: Aldosterone interaction on sodium transport and chloride permeability: influence of epithelial structure. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235:443-451.
- Diglio CA, Kikkawa Y: The type II epithelial cells of the lung. II. Adaptation and behavior of isolated type II cells in culture. *Lab Invest* 1977; 37(6):622-631.
- Dinudom A, Komwatana P, Young JA, Cook DI: Control of the amiloride-sensitive Na^+ current in mouse salivary ducts by intracellular anions is mediated by a G protein. *J Physiol* 1995; 487(3):549-555.
- Dobbs LG, Geppert EF, Williams MC, Greenleaf RD, Mason RJ: Metabolic properties and ultrastructure of alveolar type II cells isolated with elastase. *Biochim Biophys Acta* 1980; 618(3):510-523.

- Dobbs LG, Williams MC, Brant RE: Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985; 846(1):155-166.
- Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC: An Improved Method for Isolating Type II Cells in High Yield and Purity. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:141-145.
- Dobbs LG, Williams MC, Gonzalez R: Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type I cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 970:146-156.
- Dobbs LG: Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1990; 258:L134-L147.
- Doucet A, Barlet-Bas C: Involvement of Na⁺,K⁺-ATPase in Antinatriuretic Action of Mineralocorticoids in Mammalian Kidney. *Dans: Hoffman JF, Giebisch G, Schultz S (éds), Current Topics in Membrane and Transport, San Diego, CA, Academic Press, 1989, 185-208.*
- Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC: Cell-specific Expression of Epithelial Sodium Channel α , β , and γ Subunits in Aldosterone-responsive Epithelia from the Rat: Localization by In Situ Hybridization and Immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1994; 127(6):1907-1921.
- Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG: Protein serine-threonine kinases. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:567-613.
- Edelson JD, Shannon JM, Mason RJ: Alkaline Phosphatase: A Marker of Alveolar Type II Cell Differentiation. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:1268-1275.
- Effros RM, Mason GR, Sietsema K, Silverman P, Hukkanen J: Fluid Reabsorption and Glucose Consumption in Edematous Rat Lungs. *Circ Res* 1987; 60:708-719.

- Effros RM, Mason GR, Hukkanen J, Silverman P: New evidence for active sodium transport from fluid-filled rat lungs. *J Appl Physiol* 1989; 66(2):906-919.
- Eichinger MR, Walker BR: Nitric oxide and cGMP do not affect fluid flux in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1996; 80(1):69-76.
- Einbond A, Sudol M: Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett* 1996; 384(1):1-8.
- Encio IJ, Detera-Wadleigh SD: The genomic structure of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991; 266(11):7182-7188.
- Enhorning G, Chamberlain D, Contreras C, Burgoyne R, Robertson B: Isoxsuprine-induced release of pulmonary surfactant in the rabbit fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 129(2):197-202.
- Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G: Transformation of alveolar type II cells to type I cells following exposure to nitrogen dioxide. *Exp Mol Pathol* 1975; 22(1):145-150.
- Evans MJ, Shami SG: Lung Cell Kinetics. Dans: Massaro D (éd.), *Lung Cell Biology*, New York, Marcel Dekker, 1989, 1-36.
- Evans RM, Arriza JL: A Molecular Framework for the Action of Glucocorticoid Hormones in the Nervous System. *Neuron* 1989; 2(2):1105-1112.
- Ewart SH, Klip A: Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 1995; 269:C295-C311.
- Feng ZP, Clarke RB, Berthiaume Y: Identification of Nonselective Cation Channels in Cultured Adult Rat Alveolar Type II Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9(3):248-254.
- Fischer H, Clauss W: Regulation of Na⁺ channels in frog lung epithelium: a target tissue for aldosterone action. *Pflügers Arch* 1990; 416(1-2):62-67.

- Floros J, Gross I, Nichols KU, Ueletz SU, Dynia D, Lu HW, Wilson CM, Peterec SM: Hormonal effects on the surfactant protein B (SP-B) mRNA in cultured fetal rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4(5):449-454.
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P: CREM Gene: Use of Alternative DNA-Binding Domains Generates Multiple Antagonists of cAMP-Induced Transcription. *Cell* 1991; 64(4):739-749.
- Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P: Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to transcriptional activator. *Nature* 1992; 355(6355):80-84.
- Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Bassavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR: The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 1988; 334(6182):543-546.
- Garty H: Mechanisms of Aldosterone Action in Tight Epithelia. *J Membrane Biol* 1986; 90:193-205.
- Garty H, Benos DJ: Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺-channel. *Physiol Rev* 1988; 68:309-373.
- Garty H, Asher C: Does aldosterone induce *de novo* synthesis of Na⁺ channels? *Dans: Bonvalet JP, Farman N, Lombès M, Rafestin-Oblin ME (éds), Aldosterone - Fundamental Aspects*, Paris, INSERM: John Libbey Eurotext, 1991, 273-283.
- Garty H: Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺ channels. *FASEB J* 1994; 8:522-528.
- Giannopoulos G, Smith SK: Hormonal regulation of β -adrenergic receptors in fetal rabbit lung in organ culture. *Life Sci* 1982; 31(8):795-802.
- Gick GG, Ismail-Beigi F, Edelman IS: Overview: hormonal regulation of Na,K-ATPase. *Dans: Skou JC, Nørby JG, Maunsbach AB, Esmann M (éds), The Na⁺, K⁺ Pump, Part B: Cellular Aspects*, New York, Alan R. Liss, 1988, 277-295.

- Gick GG, Ismail-Beigi F: Thyroid hormone induction of Na⁺-K⁺-ATPase and its mRNAs in a rat liver cell line. *Am J Physiol* 1990; 258:C544-C551.
- Girardet M, Geering K, Gaeggler HP, Rossier BC: Control of transepithelial Na⁺ transport and Na-K-ATPase by oxytocin and aldosterone. *Am J Physiol* 1986; 251:F662-F670.
- Glass DB, Cheng H-C, Mende-Muller L, Reed J, Walsh DA: Primary Structural Determinants Essential for Potent Inhibition of cAMP-dependent Protein Kinase by Inhibitory Peptides Corresponding to the Active Portion of the Heat-stable Inhibitor Protein. *J Biol Chem* 1989; 264:8802-8810.
- Gobran LI, Rooney SA: Adenosine A₁ receptor-mediated inhibition of surfactant secretion in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1990; 258:L45-L51.
- Goldberg IH, Reich E: Actinomycin and nucleic acid function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1964; 3:183-234.
- Gonzales LW, Ballard PL, Ertsey R, Williams MC: Glucocorticoids and thyroid hormones stimulate biochemical and morphological differentiation of human fetal lung in organ culture. *J Clin Endocrin Metabol* 1986; 62(4):678-691.
- Gonzales LW, Ballard PL, Gonzales J: Glucocorticoid and cAMP increase fatty acid synthetase mRNA in human fetal lung explants. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215:49-58.
- Gonzalez GA, Montminy MR: Cyclic AMP Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell* 1989; 59:675-680.
- Gonzalez GA, Menzel P, Leonard J, Fischer WH, Montminy MR: Characterization of Motifs Which Are Critical for Activity of the Cyclic AMP-Responsive Transcription Factor CREB. *Molec Cell Biol* 1991; 11(3):1306-1312.
- Goodman BE, Crandall ED: Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1982; 243:C96-C100.

- Goodman BE, Fleischer RS, Crandall ED: Evidence for active Na⁺ transport by cultured monolayers of pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1983; 245:C78-C83.
- Goodman BE, Brown SE, Crandall ED: Regulation of transport across pulmonary alveolar epithelial cell monolayers. *J Appl Physiol* 1984; 57(3):703-710.
- Goodman BE, Kim KJ, Crandall ED: Evidence for active sodium transport across alveolar epithelium of isolated rat lung. *J Appl Physiol* 1987; 62:2460-2466.
- Goodman BE, Anderson JL, Clemens JW: Evidence for regulation of sodium transport from airspace to vascular space by cAMP. *Am J Physiol* 1989; 257:L86-L93.
- Granberg JP, Ballard PL: The role of sulfhydryl groups in the binding of glucocorticoids by cytoplasmic receptors of the lung and other mammalian tissues. *Endocrinology* 1977; 100(4):1160-1168.
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M: Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 1992; 70(1):105-113.
- Hai T, Liu F, Coukos WG, Green MR: Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* 1989; 3:2083-2090.
- Hamet P, Tremblay J: ANP and second messenger systems. *Dans: Samson WK, Quirion R (éds), Atrial Natriuretic Peptides*, Boca Raton, CRC Press, 1990, 95-109.
- Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP: A *de novo* missense mutation of the β subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995a; 92(25):11495-11499.

- Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier BC, Lifton RP: Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel γ subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 1995b; 11(1):7682.
- Harbeck RJ, Gegen NW, Struhar D, Mason RJ: Class II molecules on rat alveolar type II epithelial cells. *Cell Immunol* 1988; 111(1):139-147.
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Haberler JF: Cyclic AMP-responsive DNA-binding Protein: Structure Based on a Cloned Placental cDNA. *Science* 1988; 242(4884):1430-1433.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM: Primary structure of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985; 318(6047):635-641.
- Hollenberg SM, Evans RM: Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1988; 55(5):899-906.
- Horisberger J, Rossier BC: Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport. *Hypertension* 1992; 19:221-227.
- Horisberger JD, Puoti A, Canessa C, Rossier BC: The amiloride receptor. *Clin Invest* 1994; 72(9):695-697.
- Hu P, Oh Y, Jilling T, Benos DJ, Matlon S: Immunofluorescent Localization of Sodium Conductance in Cultured Rat Alveolar Type II Pneumocytes (ATII). *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:A208 (résumé).
- Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC: Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in α ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 1996; 12:325-328.
- Hummler E, Rossier BC: Physiological and Pathophysiological Role of the Epithelial Sodium Channel in the Control of Blood Pressure. *Kidney and Blood Press Res* 1996; 19(3-4):160-165.

- Illek B, Fischer H, Clauss W: Aldosterone regulation of basolateral potassium channels in alveolar epithelium. *Am J Physiol* 1990; 259:L230-L237.
- Ingbar DH, Burns Weeks C, Gilmore-Hebert M, Jacobsen E, Duvick S, Down R, Savik SK, Jamieson JD: Developmental regulation of Na,K-ATPase in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270:L619-L629.
- Ishii Y, Watanabe M, Watanabe S, Hasegawa S, Uchiyama Y: Effects of atrial natriuretic peptide on type II alveolar epithelial cells of the rat lung. Autoradiographic and morphometric studies. *J Anat* 1989; 166:85-95.
- Ismail-Beigi F: Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase Expression by Thyroid Hormone. *Sem Nephrol* 1992; 12(1):44-48.
- Ismailov II, Berdiev BK, Fuller CM, Bradford AL, Lifton RP, Warnock DG, Bubien JK, Benos DJ: Peptide block of constitutively activated Na⁺ channels in Liddle's disease. *Am J Physiol* 1996; 270:C214-C223.
- Jayr C, Garat C, Meignan M, Pittet JF, Zelter M, Matthay MA: Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats. *J Appl Physiol* 1994; 76(6):2636-2642.
- Jiang C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, McCray PB, Miller SS: Altered Fluid Transport Across Airway Epithelium in Cystic Fibrosis. *Science* 1993; 262(5132):424-427.
- Jungmann RA, Kelley DC, Miles MF, Milkowski DM: Cyclic AMP regulation of lactate dehydrogenase. Isoproterenol and N6,02-dibutyryl cyclic AMP increase the rate of transcription and change the stability of lactate dehydrogenase α subunit messenger RNA in rat C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1983; 258(8):5312-5318.
- Karpinski BA, Morle GD, Huggenuik J, Uhler MD, Leiden JM: Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(11):4820-4824.
- Kemp BE, Graves DJ, Benjamini E, Krebs EG: Role of Multiple Basic Residues in Determining the Substrate Specificity of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 1977; 252(14):4888-4894.

- Kemp BE, Cheng H-C, Walsh DR: Peptide Inhibitors of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Methods Enzymol* 1988; 159:173-183.
- Kikkawa Y, Yoneda K: The Type II Epithelial Cell of the Lung. I. Method of Isolation. *Lab Invest* 1974; 30(1):76-84.
- Kim KJ, Cheek JM, Crandall ED: Contribution of active Na⁺ and Cl⁻ fluxes to net ion transport by alveolar epithelium. *Resp Physiol* 1991; 85(2):245-256.
- Kleyman TR, Cragoe EJ Jr: Amiloride and Its Analogs as Tools in the Study of Ion Transport. *J Membrane Biol* 1988; 105:1-21.
- Kleyman TR, Cragoe EJ Jr: Cation Transport Probes: The Amiloride Series. *Meth Enzymol* 1990; 191:739-755.
- Kleyman TR, Kraehenbuhl JP, Ernst SA: Characterization and cellular localization of the epithelial Na⁺ channel. Studies using an anti-Na⁺ channel antibody raised by an antiidiotypic route. *J Biol Chem* 1991; 266:3907-3915.
- Kleyman TR, Coupaye-Gerard B, Ernst SA: Aldosterone Does Not Alter Apical Cell-surface Expression of Epithelial Na⁺ Channels in the Amphibian Cell Line A6. *J Biol Chem* 1992; 267(14):9622-9628.
- Knepper MA, Lankford SP, Terada Y: Renal tubular actions of ANF. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69:1537-1545.
- Knowles MR, Church NL, Waltner WE, Yankaskas JR, Gilligan P, King M, Edwards LJ, Helms RW, Boucher RC: A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1990; 322:1189-1194.
- Krebs EG: Role of the Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Signal Transduction. *J Am Med Assoc* 1989; 262(13):1815-1818.
- Krozowski Z, Funder JW: Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology* 1981; 109(6):1811-1813.
- Kulczycki A, Solanki L, Cohen L: Isolation and partial characterization of Fc γ -binding proteins of human leucocytes. *J Clin Invest* 1981; 68:1558-1565.

- Kwok RP, Lundblad JR, Chivria JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH: Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 1994; 370(6486):223-226.
- Lalli E, Sassone-Corsi P: Signal Transduction and Gene Regulation: The Nuclear Response to cAMP. *J Biol Chem* 1994; 269(26):17359-17362.
- Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P: The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J* 1993; 12(3):1179-1191.
- Lee CQ, Yun Y, Hoeffler JP, Habener JF: Cyclic-AMP-responsive transcriptional activation of CREB-327 involves interdependent phosphorylated subdomains. *EMBO J* 1990; 9(13):4455-4465.
- Lee KA, Hai TY, SivaRaman L, Thimmappaya B, Hurst HC, Jones NC, Green MR: A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(23):8355-8359.
- Lee YC, Lin HH, Tang MJ: Glucocorticoid upregulates Na-K-ATPase α - and β -mRNA via an indirect mechanism in proximal tubule cell primary cultures. *Am J Physiol* 1995; 268:F862-F867.
- Lefkowitz RJ, Caron MG: Adrenergic Receptors: Molecular Mechanisms of Clinically Relevant Regulation. *Clin Res* 1985; 33(3):395-406.
- Leighton J, Estes LW, Mansukhani S, Brada Z: A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer* 1970; 26(5):1022-1028.
- Lever JE: Regulation of dome formation in differential epithelial cell cultures. *J Supra Struct* 1979; 12:259-272.
- Lewicki JA: Cellular actions of atrial natriuretic peptide. Dans: Brenner BM, Stein JH (éds), *Atrial Natriuretic Peptides*, New York, Churchill Livingstone, 1989, 79-103.

- Leza MA, Hearing P: Independent cyclic AMP and E1A induction of adenovirus early region 4 expression. *J Virol* 1989; 63(7):3057-3064.
- Li XJ, Blackshaw S, Snyder SH: Expression and localization of amiloride-sensitive sodium channel indicate a role for non-taste cells in taste perception. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(5):1814-1818.
- Li XJ, Xu RH, Guggino WB, Snyder SH: Alternatively Spliced Forms of the α Subunit of the Epithelial Sodium Channel: Distinct Sites for Amiloride Binding and Channel Pore. *Mol Pharmacol* 1995; 47:1133-1140.
- Little GW, Bledsoe T, Coppage WS Jr: A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Assoc Am Physicians* 1963; 76:199-213.
- Light DB, Schwiebert EM, Karlson KH, Stanton BA: Atrial Natriuretic Peptide Inhibits a Cation Channel in Renal Inner Medullary Collecting Duct Cells. *Science* 1989; 243:383-385.
- Light DB, Corbin JD, Stanton BA: Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* 1990; 344(6264):336-339.
- Lin C, Kieber-Emmons T, Dillalobos AP, Foster MH, Wahlgren C, Kleyman TR: Topology of an Amiloride-binding Protein. *J Biol Chem* 1994; 269(4):2805-2813.
- Lin YS, Green MR: Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(10):3396-3400.
- Lindemann B: Fluctuation analysis of sodium channels in epithelia. *Ann Rev Physiol* 1984; 46:497-515.
- Lingrel JB, Young RM, Shull MM: Multiple forms of the Na,K-ATPase: Their genes and tissue specific expression. Dans: Skou JC, Nørby JG, Maunsbach AB, Esmann M (éds), *The Na⁺, K⁺ Pump, Part B: Cellular Aspects*, New York, Alan R. Liss, 1988, 105-112.

- Lingrel J, Orłowski J, Shull M, Price E: Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog Nuc Acid Res Mol Biol* 1990; 38:37-89.
- Lingrel J: Na,K-ATPase: Isoform Structure, Function, and Expression. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24(3):263-270.
- Lingueglia E, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M, Barbry P: Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel - A new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins. *FEBS Lett* 1993; 318:95-99.
- Lingueglia E, Renard S, Waldmann R, Voilley N, Champigny G, Plass H, Lazdunski M, Barbry P: Different Homologous Subunits of the Amiloride-sensitive Na⁺ Channel Are Differently Regulated by Aldosterone. *J Biol Chem* 1994; 269(19):13736-13739.
- Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M, Barbry P: Cloning of the amiloride-sensitive FMRamide peptide-gated sodium channel. *Nature* 1995; 378:730-733.
- Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M, Barbry P: Molecular biology of the amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel. *Exp Physiol* 1996; 81(3):483-492.
- Lo CS, Klein LE: Thyroidal and Steroidal Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase. *Sem Nephrol* 1992; 12(1):62-66.
- Lucas PC, Granner DK: Hormone response domains in gene transcription. *Ann Rev Biochem* 1992; 61:1131-1173.
- Maller JL, Kemp BE, Krebs EG: *In vivo* phosphorylation of a synthetic peptide substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:248-251.
- Maniscalco WM, Shapiro DL: Effects of dexamethasone on beta-adrenergic receptors in fetal lung explants. *Pediatr Res* 1983; 17(4):274-277.
- Mason RJ, Williams MC, Greenleaf RD, Clements JR: Isolation and Properties of Type II Alveolar Cells from Rat Lung. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115(6):1015-1026.

- Mason RJ, Dobbs LG: Synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by alveolar type II cells in primary culture. *J Biol Chem* 1980; 255:5101-5107.
- Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LD Jr: Transepithelial transport by pulmonary alveolar Type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:6033-6037.
- Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH: Fluid and Electrolyte Transport Across Monolayers of Alveolar Type II Cells *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:S24-S28.
- Mason RJ, Walker SR, Shields BR, Henson JE, Williams MC: Identification of Rat Type II Epithelial Cells with a Tannic Acid and Polychrome Stain. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:786-788.
- Mason RJ, Williams MC: Alveolar type II cells. *Dans: Crystal RG, West JB, Barnes PJ, Cherniack NS, Weibel ER, The Lung: Scientific Foundations*, New York, Raven Press, 1991, 235-246.
- Matalon S, Bridges RJ, Benos DJ: Amiloride-inhibitable Na⁺ conductive pathways in alveolar type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1991; 260:L90-L96.
- Matalon S, Kirk KL, Bubien JK, Oh Y, Hu P, Yue G, Shoemaker R, Cragoe EJ Jr, Benos DJ: Immunocytochemical and functional characterization of Na⁺ conductance in adult alveolar pneumocytes. *Am J Physiol* 1992; 262:C1228-C1238.
- Matalon S, Yue G, Hu P, Oh Y, Benos DJ: Mechanisms of Active Na⁺ Transport Across Freshly Isolated and Cultured Adult Alveolar Type II Pneumocytes. *Dans: Effros RM, Chang HK (éds), Fluid and Solute Transport in the Airspaces of the Lungs*, New York, Marcel Dekker, 1994, 179-217.
- Matsushita K, McCray PB, Sigmund RD, Welsh MJ, Stokes JB: Localization of epithelial sodium channel subunit mRNAs in adult rat lung by in situ hybridization. *Am J Physiol* 1996; 271:L332-L339.
- Matthay MR, Landolt CC, Staub NC: Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1982; 53:96-104.

- Matthay MA, Weiner-Kronish JP: Intact Epithelial Barrier Function Is Critical for the Resolution of Alveolar Edema in Humans. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1250-1257.
- Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS: Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am J Physiol* 1996; 270:L487-L503.
- McDonald FJ, Snyder PM, McCray PB Jr, Welsh MJ: Cloning, expression, and tissue distribution of a human amiloride-sensitive Na⁺ channel. *Am J Physiol* 1994; 266:L728-L734.
- McDonald FJ, Price MP, Snyder PM, Welsh MJ: Cloning and expression of the human epithelial sodium channel. *Am J Physiol* 1995; 268:C1157-C1163.
- McEwan IJ, Wright AP, Dahlman-Wright K, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JÅ: Direct interaction of the tau1 transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. *Molec Cell Biol* 1993; 13(1):399-407.
- McKnight GS, Clegg CH, Uhler MD, Chrivia JC, Cadd GG, Correll LA, Otten AD: Analysis of the cAMP-Dependent Protein Kinase System Using Molecular Genetic Approaches. *Rec Progr Horm Res* 1988; 44:307-335.
- Mendel DB, Bodwell JE, Gametchu B, Harrison RW, Munck A: Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes contain a 90-kDa non-steroid-binding phosphoprotein that is lost on activation. *J Biol Chem* 1986; 261(8):3758-3763.
- Messner RP, Jelinek J: Receptors for human γ 6 globulin on human neutrophils. *J Clin Invest* 1970; 49:2165-2171.
- Meyer TE, Habener JF: Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element Binding Protein (CREB) and Related Transcription-Activating Deoxyribonucleic Acid-Binding Proteins. *Endocrine Rev* 1993; 14(3):269-289.
- Middleton PG, Geddes DM, Alton EWF: Trimethoprim and Tetracycline Inhibit Airway Epithelial Sodium Absorption. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(1):18-23.

- Milsted A, Cox RP, Nilson JH: Cyclic AMP Regulates Transcription of the Genes Encoding Human Chorionic Gonadotropin with Different Kinetics. *DNA* 1987; 6(3):213-219.
- Misfeldt DS, Hamamoto ST, Pitelka DR: Transepithelial transport in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(4):1212-1216.
- Moberly JB, Fanestil DD: Heterogeneity of expression of apical membrane determinants in A6 epithelial cells. *Am J Physiol* 1987; 253:C37-C44.
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P: Inducibility and Negative Autoregulation of CREM: An Alternative Promoter Directs the Expression of ICER, An Early Response Repressor. *Cell* 1993; 75(5):875-886.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G: Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(18):6682-6686.
- Mullin JM, Diamond L, Kleinzeller A: Effects of ouabain and ortho vanadate on transport-related properties of the LLC-PK₁ renal epithelial cell line. *J Cell Physiol* 1980; 105(1):1-6.
- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Denis M, Gustafsson JÅ: The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry* 1990; 29(7):1880-1886.
- Nici L, Dowin R, Gilmore-Herbert M, Jamieson JD, Ingbar DH: Upregulation of rat lung Na-K-ATPase during hyperoxic injury. *Am J Physiol* 1991; 261:L307-L314.
- Noda M, Suzuki S, Sugita M, Song C, Tabata T, Ono S, Tanita T, Fujimura S: Dexamethazone accelerates alveolar fluid absorption via Na⁺ channel in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(4):A647 (résumé).
- Nord EP, Brown SE, Crandall ED: Characterization of Na⁺-H⁺ antiport in type II alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1987; 252:C490-C498.

- North RA: Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(4):474-483.
- O'Brodovich H, Rafii B, Post M: Bioelectric properties of fetal alveolar epithelial monolayers. *Am J Physiol* 1990; 258:L201-L206.
- O'Brodovich H: Epithelial ion transport in the fetal and perinatal lung. *Am J Physiol* 1991; 251:C555-C564.
- O'Brodovich H, Hannam U, Rafii B: Sodium Channel but Neither Na⁺-H⁺ nor Na-glucose Symport Inhibitors Slow Neonatal Lung Water Clearance. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1991; 5:377-384.
- O'Brodovich H, Canessa C, Ueda J, Rafii B, Rossier BC, Edelson J: Expression of the epithelial Na⁺ channel in the developing rat lung. *Am J Physiol* 1993; 265:C491-C496.
- Odom MW, Ertsey R, Ballard PL: Hormonally regulated proteins in cultured human fetal lung: analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Am J Physiol* 1990; 259:L283-L293.
- Oguchi A, Ikeda U, Kanbe T, Tsuruya Y, Yamamoto K, Kawakami K, Medford RM, Shimada K: Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265:H1167-H1172.
- Olins GM, Patton DR, Tjoeng FS, Blehm DJ: Specific receptors for atriopeptin III in rabbit lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140(1):302-307.
- Olivera W, Ridge K, Yeates D, Sznajder JI: Aerosolized aldosterone increases lung liquid clearance in isolated rat lungs. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(4):A366 (résumé).
- Olivera W, Ridge K, Wood LD, Sznajder JI: Active sodium transport and alveolar epithelial Na-K-ATPase increase during subacute hyperoxia in rats. *Am J Physiol* 1994; 266:L577-L584.
- Olivera WG, Ridge KM, Sznajder JI: Lung Liquid Clearance and Na,K-ATPase during Acute Hyperoxia and Recovery in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1229-1234.

- Oliver RE, Strang LB: Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the fetal lamb. *J Physiol* 1974; 241(2):327-357.
- Oliver RE, Schneeberger EE, Walters DU: Epithelial solute permeability, ion transport and tight junction morphology in the developing lung of the fetal lamb. *J Physiol* 1981; 315:395-412.
- Oliver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DU: The role of amiloride-blockade sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol* 1986; 376:321-340.
- Orlowski J, Lingrel J: Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoforms and beta subunit mRNAs. *J Biol Chem* 1988; 263:10436-10442.
- Orser BA, Bertlik M, Fedorko L, O'Brodovich H: Cation selective channel in fetal alveolar type II epithelium. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1094(1):19-26.
- Paine R, Simon RH: Expanding the frontiers of lung biology through the creative use of alveolar epithelial cells in culture. *Am J Physiol* 1996; 268:L484-L486.
- Palmer LG, Pácha J, Frindt G: Regulation of apical sodium channels in the rat cortical collecting tubule by aldosterone. Dans: Bonvalet JP, Farman N, Lombès M, Rafestin-Oblin ME (éds), *Aldosterone - Fundamental Aspects*, Paris, INSERM: John Libbey Eurotext, 1991, 285-293.
- Palmer LG: Epithelial Na channels: function and diversity. *Annu Rev Physiol* 1992; 54:51-66.
- Palmer, LG: Epithelial Na Channels and Their Kin. *News Physiol Sci* 1995; 10:61-67.
- Perreault T, Gutkowska J: Role of Atrial Natriuretic Factor in Lung Physiology and Pathology. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:226-242.
- Perry RP, Kelly DE: Persistent synthesis of 5S RNA when production of 28S and 18S ribosomal RNA is inhibited by low doses of actinomycine D. *J Cell Physiol* 1968; 72:235-246.

- Perry RP, Kelly DE: Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol* 1970; 76:127-140.
- Picard D, Yamamoto KR: Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1987; 6(11):3333-3340.
- Pomerantz AH, Allfrey UG, Merrifield RB, Johnson EM: Studies on the mechanism of phosphorylation of synthetic polypeptides by a calf thymus cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(10):4261-4265.
- Pressley TA: Ionic Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase Expression. *Sem Nephrol* 1992; 12(1):67-71.
- Price MP, Snyder PM, Welsh MJ: Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* 1996; 271:7879-7882.
- Puoti A, May A, Canessa C, Horisberger JD, Schild L, Rossier BC: The highly selective low-conductance epithelial Na channel of *Xenopus laevis* A6 kidney cells. *Am J Physiol* 1995; 269:C188-C197.
- Reh fuss RP, Walton KM, Loriaux MM, Goodman RH: The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem* 1991; 266(28):18431-18434.
- Renard S, Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M, Barbry P: Biochemical Analysis of the Membrane Topology of the Amiloride-sensitive Na⁺ Channel. *J Biol Chem* 1994; 269(17):12981-12986.
- Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P: Localization and regulation by steroids of the α , β and γ subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney. *Pflügers Arch* 1995; 430(3):299-307.
- Rice WR, Hull WM, Dion CA, Hollinger BA, Whitsett JA: Activation of cAMP Dependent Protein Kinase during Surfactant Release from Type II Pneumocytes. *Exp Lung Res* 1985; 9(1-2):135-149.

- Roberts JM, Jacobs MM, Cheng JB, Barnes PJ, O'Brien AT, Ballard PL: Fetal pulmonary beta-adrenergic receptors: Characterization in human and in vitro modulation by glucocorticoids in the rabbit. *Pediatr Pulmonol* 1985; 1:S69-S76.
- Roesler WJ, Vanderbark GR, Hanson RW: Cyclic AMP and the Induction of Eukaryotic Gene Transcription. *J Biol Chem* 1988; 263(19):9063-9066.
- Roskoski R: Assays of Protein Kinase. *Methods Enzymol* 1983; 99:3-6.
- Rossier BC, Geering K, Atkinson J, Roch-Ramel F: Renal Receptors. Dans: Seldin DW, Giebisch G (éds), *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, New York, Raven Press, 1985, 775-806.
- Rossier BC, Palmer LG: Mechanisms of Aldosterone Action on Sodium and Potassium Transport. Dans: Seldin DW, Giebisch G (éds), *The Kidney: Physiology & Pathophysiology*, 2^{ème} édition, New York, Raven Press, 1992; 1373-1409.
- Rossier BC, Canessa CM, Schild L, Horisberger JD: Epithelial sodium channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3(5):487-496.
- Rotin D, Bar-Sagi D, O'Brodovich H, Merilainen J, Lehto UP, Canessa CM, Rossier BC, Downey GP: An SH3 binding region in the epithelial Na⁺ channel (α ENaC) mediates its localization at the apical membrane. *EMBO J* 1994; 13(19):4440-4450.
- Russo RM, Lubman RL, Crandall ED: Evidence for amiloride-sensitive sodium channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 262:L405-L411.
- Sahib MK, Schwartz JH, Handler JS: Inhibition of toad urinary bladder sodium transport by carbamylcholine: possible role of cyclic GMP. *Am J Physiol* 1978; 235:F586-F591.
- Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA: Alveolar Fluid Clearance in the Resected Human Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:305-310.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Extraction, Purification, and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells. *Dans: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^{ème} édition, New York, Cold Spring Harbor, 1989, 7.1-7.87.
- Sariban-Sohraby S, Fisher RS: Guanine nucleotide-dependent carboxymethylation: A pathway for aldosterone modulation of apical Na⁺ permeability in epithelia. *Kidney Int* 1995; 48:965-969.
- Sassone-Corsi P: Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1994; 11:355-377.
- Saumon G, Basset G, Bouchonnet F, Crone C: cAMP and β -adrenergic stimulation of rat alveolar epithelium. Effects on fluid absorption and paracellular permeability. *Pflügers Archiv* 1987; 410(4-5):464-470.
- Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, Gautschi I, Lifton RP, Rossier BC: A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(12):5699-5703.
- Schild L, Lu Y, Gautschi I, Schneeberger E, Lifton RP, Rossier BC: Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J* 1996; 15(10):2381-2387.
- Schneeberger EE, McCarthy KM: Cytochemical localization of Na⁺-K⁺-ATPase in rat type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 1986; 60(5):1584-1589.
- Schule R, Muller M, Kaltschmidt C, Renkawitz R: Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 1988; 242(4884):1418-1420.
- Seamon KB, Daly JW: Forskolin: Its Biological and Chemical Properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 1986; 20:1-150.

- Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, Canessa CM, Rossier BC, Lifton RP: Liddle's syndrome: Heritable Human Hypertension Caused by Mutations in the β Subunit of the Epithelial Sodium Channel. *Cell* 1994; 79:407-414.
- Shull GE, Greeb J, Lingrel JB: Molecular cloning of three distinct forms of the Na^+, K^+ -ATPase α -subunit from rat brain. *Biochemistry* 1986; 25:8125-8132.
- Shull MM, Pugh DG, Lingrel JB: The Human Na, K -ATPase alpha 1 Gene: Characterization of the 5'-Flanking Region and Identification of a Restriction Fragment Length Polymorphism. *Genomics* 1990; 6(3):451-460.
- Smedira N, Gates L, Hastings R, Jayr C, Sakuma T, Pittet JF, Matthay MA: Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1991; 70(4):1827-1835.
- Snyder PM, Price MP, McDonald FJ, Adams CM, Volk KA, Zeiher BG, Stokes JB, Welsh MJ: Mechanism by Which Liddle's Syndrome Mutations Increase Activity of a Human Epithelial Na^+ Channel. *Cell* 1995; 83:969-978.
- Sommers Smith SK, Giannopoulos G: Identification of β -adrenergic receptors in pulmonary alveolar type II cells. *Life Sci* 1983; 33(21):2071-2078.
- Sorokin SP: Properties of alveolar cells and tissues that strengthen alveolar defenses. *Arch Intern Med* 1970; 126(3):450-453.
- Sorscher EJ, Accavitti MA, Keeton D, Steadman E, Frizzell RA, Benos DJ: Antibodies against purified epithelial channel proteins from bovine renal papilla. *Am J Physiol* 1988; 255:C835-C843.
- Stanton BA, Kaissling B: Regulation of renal ion transport and cell growth by sodium. *Am J Physiol* 1989; 257:F1-F10.

- Stanton BA: Aldosterone regulation of sodium and potassium transport by the distal tubule and collecting duct: structure-function relationships. *Dans: Bonnalet JP, Farman N, Lombès M, Rafestin-Oblin ME (éds), Aldosterone - Fundamental Aspects, Paris, INSERM: John Libbey Eurotext, 1991a, 187-197.*
- Stanton BA: Molecular mechanisms of ANP inhibition of renal sodium transport. *Can J Physiol Pharmacol* 1991b; 69:1546-1552.
- Staub O, Dho S, Henry PC, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D: WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle' syndrome. *EMBO J* 1996; 15(10):2371-2380.
- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simoneaux U, Prévot P, Sassone-Corsi P: Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993; 365(6444):314-320.
- Strahle U, Schmid W, Schutz G: Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J* 1988; 7(11):3389-3395.
- Strautnieks SS, Thompson RJ, Gardiner RM, Chung E: A novel splice-site mutation in the γ subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families. *Nat Genet* 1996; 13(2):248-250.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC: CFTR as a cAMP-Dependent Regulator of Sodium Channels. *Science* 1995; 269(5225):847-850.
- Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P: Characterization of a novel protein-binding module - the WW domain. *FEBS Lett* 1995; 369(1):67-71.
- Suzuki S, Zuege D, Berthiaume Y: Sodium-independent modulation of Na⁺-K⁺-ATPase activity by β -adrenergic agonist in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1995; 268:L983-L990.

- Suzuki-Yagawa Y, Kawakami K, Nagano K: Housekeeping Na,K-ATPase α 1 subunit gene promoter is composed of multiple cis elements to which common and cell type-specific factors bind. *Mol Cell Biol* 1992; 12:4046-4055.
- Sweadner K: Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988:185-220.
- Sznajder JI, Olivera WG, Ridge KM, Rutschman DH: Mechanisms of Lung Liquid Clearance During Hyperoxia in Isolated Rat Lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(5):1519-1525.
- Tamura H, Schild L, Enomoto N, Matsui N, Marumo F, Rossier BC, Sasaki S: Liddle Disease Caused by a Missense Mutation of β Subunit of the Epithelial Sodium Channel Gene. *J Clin Invest* 1996; 97(7):1780-1784.
- Taylor SS, Bubis J, Toner-Webb J, Saraswat LD, First EA, Buechler JA, Knighton DR, Sowadski J: cAMP-dependent protein kinase: prototype for a family of enzymes. *FASEB J* 1988; 2(11):2677-2685.
- Tchepichev S, Ueda J, Canessa C, Rossier BC, O'Brodoovich H: Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *Am J Physiol* 1995; 269:C805-C812.
- Tessier GJ, Lester GD, Langham MR, Cassin S: Ion transport properties of fetal sheep alveolar epithelial cells in monolayer culture. *Am J Physiol* 1996; 270:L1008-L1016.
- Thomas CP, Doggett NA, Fisher R, Stokes JB: Genomic Organization and the 5' Flanking Region of the γ Subunit of the Human Amiloride-sensitive Epithelial Sodium Channel. *J Biol Chem* 1996; 271(42):26062-26066.
- Tousson A, Alley CD, Sorscher EJ, Brinkley BR, Benos DJ: Immunochemical localization of amiloride-sensitive sodium channels in sodium-transporting epithelia. *J Cell Sci* 1989; 93:349-362.

- Trapp T, Rupprecht R, Castrén M, Reul JM, Holsboer F: Heterodimerisation between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 1994; 13(6):1457-1462.
- Trask DK, Muller MT: Stabilization of type-I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1417-1421.
- Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JÅ, Tsai MJ, O'Malley BW: Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 1988; 55(2):361-369.
- Tsilibary EC, Williams MC: Actin in peripheral lung: S₁ labeling and structural changes induced by cytochalasin. *J Histochem Cytochem* 1983; 31(11):1289-1297.
- Turner RJ, Thompson J, Sariban-Sohraby S, Handler JS: Monoclonal Antibodies As Probes of Epithelial Membrane Polarization. *J Cell Biol* 1985; 101:2173-2180.
- Uhr JW, Phillips JM: In vitro sensitization of phagocytes and lymphocytes by antigen-antibody complexes. *Ann NY Acad Sci* 1966; 129:793-798.
- Valentich JD, Tchao R, Leighton J: Hemicyst formation stimulated by cyclic AMP in dog kidney cell line MDCK. *J Cell Physiol* 1979; 100(2):291-304.
- Verrey F, Schaerer E, Zoerkler P, Paccolat MP, Geering K, Kraehenbuhl JP, Rossier BC: Regulation by Aldosterone of Na⁺,K⁺-ATPase mRNAs, Protein Synthesis, and Sodium Transport in Cultured Kidney Cells. *J Cell Biol* 1987; 104(5):1231-1237.
- Verrey F: Transcriptional Control of Sodium Transport in Tight Epithelia by Adrenal Steroids. *J Membrane Biol* 1995; 144(2):93-110.
- Voilley N, Lingueglia E, Champigny G, Mattéi MG, Waldmann R, Lazdunski M, Barbry P: The amiloride-sensitive Na⁺ channel in lung epithelial cells: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:247-251.

- Voilley N, Bassilana F, Mignon C, Merscher S, Mattéi MG, Carle GF, Lazdunski M, Barbry P: Cloning, Chromosomal Localization, and Physical Linkage of the β and γ Subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the Human Epithelial Amiloride-Sensitive Sodium Channel. *Genomics* 1995; 28:560-565.
- Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF Jr, Lickteig RL, Johnson GL, Klemm DJ: Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 1993; 13(5):2822-2834.
- Waldmann R, Champigny G, Lazdunski M: Functional Degenerin-containing Chimeras Identify Residues Essential for Amiloride-sensitive Na⁺ Channel Function. *J Biol Chem* 1995a; 270(20):11735-11737.
- Waldmann R, Champigny G, Bassilani F, Voilley N, Lazdunski M: Molecular Cloning and Functional Expression of a Novel Amiloride-sensitive Na⁺ Channel. *J Biol Chem* 1995b; 270(46):27411-27414.
- Waldmann R, Champigny G, Voilley N, Lauritzen I, Lazdunski M: The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 1996; 271:10433-10436.
- Walters DU, Oliver RE: The Role of Catecholamines in Lung Liquid Absorption at Birth. *Pediat Res* 1978; 12:239-242.
- Walters DU, Ramsden CA, Oliver RE: Dibutyryl cAMP induces a gestation-dependent absorption of fetal lung liquid. *J Appl Physiol* 1990; 68(5):2054-2059.
- Wang ZM, Yasui M, Celsi G: Glucocorticoids regulate the transcription of Na⁺-K⁺-ATPase genes in the infant rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 267:C450-C455.
- Weibel ER, Gehr P, Haies D, Gil J, Bachofen M: THE CELL POPULATION OF THE NORMAL LUNG. Dans: Bouhuys A (éd.), *Lung Cells in Disease* Amsterdam, North-Holland, 1976, 3-16.

- Wheat WH, Poesler WJ, Klemm DJ: Simian virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 1994; 14(9):5881-5890.
- Whitehouse S, Feramisco JR, Casnellie JE, Krebs EG, Walsh DA: Studies on the Kinetic Mechanism of the Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 1983; 258:3693-3701.
- Whorwood CB, Ricketts ML, Stewart PM: Regulation of Sodium-Potassium Adenosine Triphosphate Subunit Gene Expression by Corticosteroids and 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity. *Endocrinology* 1994; 135(3):901-910.
- Whorwood CB, Stewart PM: Transcriptional regulation of Na/K-ATPase by corticosteroids, glycyrrhetic acid and second messenger pathways in rat kidney epithelial cells. *J Molec Endocrinol* 1995; 15:93-103.
- Willenbrock R, Lambert R, Tremblay J, Bavaria G, Langlois Y, Léveillé J, Flanagan R, Hamet P: In Vivo Measurement of Atrial Natriuretic Peptide Receptors Using Nuclear Imaging. *Am J Hypertens* 1992; 5:832-836.
- Willumsen NJ, Boucher RC: Transcellular sodium transport in cultured cystic fibrosis human nasal epithelium. *Am J Physiol* 1991; 261:C332-C341.
- Wrange Ö, Eriksson P, Perlmann T: The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J Biol Chem* 1989; 264(9):5253-5259.
- Wright AP, McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ: High level expression of the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor in yeast cells inhibits endogenous gene expression and cell growth. *Molec Endocr* 1991; 5(10):1366-1372.
- Wright AP, Zilliacus J, McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Almlöf T, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JÅ: Structure and function of the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 47:11-19.

- Yagawa Y, Kawakami K, Nagano K: Cloning and analysis of the 5'-flanking region of rat Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 subunit gene. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049:286-292.
- Yue G, Hu P, Oh Y, Jilling T, Shoemaker RL, Benos DJ, Cragoe EJ Jr, Matalon S: Culture-induced alterations in alveolar type II cell Na⁺ conductance. *Am J Physiol* 1993; 265:C630-C640.
- Yue G, Russell WJ, Benos DJ, Jackson RM, Olman MA, Matalon S: Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8418-8422.
- Zeidel ML: Renal actions of atrial natriuretic peptide: regulation of collecting duct sodium and water transport. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:747-759.
- Zetterqvist Ö, Ragnarsson U, Humble E, Berglund L, Engström L: The minimum substrate of cyclic AMP-stimulated protein kinase, as studied by synthetic peptides representing the phosphorylatable site of pyruvate (type L) of rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 70(3):696-703.
- Ziff EB: Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet* 1990; 6(3):69-72.