

Université de Montréal

Étude de stratégies thérapeutiques complémentaires visant à favoriser la résolution des paramètres du Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë dans des modèles *in vivo*

Par

Mélissa Aubin Vega

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

en Sciences biomédicales, option médecine expérimentale

Avril 2023

© Mélissa Aubin Vega, 2023

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

Étude de stratégies thérapeutiques complémentaires visant à favoriser la résolution des paramètres du Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë dans des modèles *in vivo*

Présenté par

Mélissa Aubin Vega

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Sze Man Tse

Présidente-rapporteuse

Emmanuelle Brochiero

Directrice de recherche

Jean-François Lauzon-Joset

Membre du jury

Ahmed Chraïbi

Examineur externe

Philippe Jovet

Représentant du doyen

Résumé

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une forme de défaillance respiratoire sévère, cause majeure de mortalité (~30-45%) chez les adultes et enfants dans les unités de soins intensifs. En dépit des progrès dans la prise en charge du patient, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pharmacologique efficace. Le SDRA peut se développer à la suite d'une atteinte pulmonaire directe (ex. pneumonie) ou indirecte (ex. septicémie) dont les principales caractéristiques sont des lésions épithéliales alvéolaires et endothéliales vasculaires, le développement d'un œdème pulmonaire et une réponse inflammatoire exacerbée durant la phase aiguë exsudative. La résolution de ces paramètres est critique afin d'éviter l'établissement irréversible de fibrose, entraînant une défaillance respiratoire. Le caractère hétérogène du SDRA et l'implication d'une multitude de mécanismes lésionnels rendent le développement de nouvelles thérapies plus difficile. Nous avons posé l'hypothèse que la restauration de l'intégrité épithéliale, en parallèle de la résolution de l'inflammation et la résorption de l'œdème, est critique pour la résolution de la phase exsudative du SDRA. Nous avons donc postulé que des stratégies combinant des effets bénéfiques sur la clairance liquidienne et proréparatrice constitueraient une voie intéressante pour la restauration de l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium alvéolaire.

L'objectif général de mon projet de doctorat était donc d'évaluer différentes stratégies, ciblant 1) l'inflammation, 2) le canal sodique ENaC impliqué dans la clairance liquidienne et 3) les canaux potassiques ayant un rôle pro-réparateur, avec des modèles complémentaires *in vivo* de lésions aiguës induites, mimant des paramètres de SDRA.

Nous pensons que cette étude aura apporté de nouvelles connaissances sur la physiopathologie du SDRA et les mécanismes de résolution des paramètres caractéristiques de ce syndrome. Mon projet met particulièrement en lumière que de cibler une seule composante telle que l'inflammation ou la clairance liquidienne n'est pas suffisante et que des composés permettant de restaurer l'intégrité fonctionnelle alvéolaire sont nécessaires.

Mots-clés : canaux potassiques, épithélium alvéolaire, inflammation pulmonaire, dommages pulmonaires, réparation épithéliale, œdème pulmonaire, syndrome de détresse respiratoire aiguë, transport ionique membranaire

Abstract

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a severe form of respiratory failure, a leading cause of death (~30-45%) among adults and children in intensive care units. Despite advances in the management and care of ARDS patients, there is currently no effective curative pharmacological treatment. The ARDS can develop following a direct (e.g. pneumonia) or indirect (e.g. sepsis) lung injury, the main features of which are alveolar epithelial and endothelial vascular injury, the development of pulmonary edema, and an exacerbated inflammatory response during the exsudative acute phase. The resolution of these parameters is critical to avoid the irreversible establishment of fibrosis leading to respiratory failure. The heterogeneous nature of ARDS and the involvement of various lesional mechanisms complicate the development of new therapeutic strategies. We hypothesized that the epithelial restoration, in parallel with inflammatory resolution and edema resorption, is critical for the resolution of the acute exsudative phase of ARDS. Therefore, we postulated that strategies combining beneficial effects on fluid clearance and pro repair may be an interesting way to restore the functional integrity of the alveolar epithelium.

The general objective of my PhD project was to evaluate different strategies targeting 1) the inflammation, 2) the sodium channel ENaC involved in fluid clearance, and 3) potassium channels playing pro repair role, using complementary *in vivo* models of acute lung injury mimicking ARDS parameters.

We believe that these studies have provided new insight on the pathophysiology of ARDS and the mechanisms of resolution of the characteristic parameters of this syndrome. In particular, my project highlights that focusing on a single component such as inflammation or fluid clearance is not sufficient and that compounds will restore functional alveolar integrity are needed.

Keywords: potassium channels, alveolar epithelium, pulmonary inflammation, lung damage, epithelial repair, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, ion membrane transport

Table des matières

| | |
|--|----|
| Résumé | 5 |
| Abstract | 7 |
| Table des matières | 9 |
| Liste des tableaux | 15 |
| Liste des figures | 17 |
| Liste des sigles et abréviations | 19 |
| Remerciements | 23 |
| Chapitre 1 – Introduction | 25 |
| 1.1 L'appareil respiratoire | 25 |
| 1.1.1 Description anatomique | 25 |
| 1.1.1.1 Vascularisation pulmonaire | 26 |
| 1.1.2 Description histologique | 27 |
| 1.1.2.1 Cellules alvéolaires | 29 |
| 1.1.2.2 La barrière alvéolo-capillaire | 30 |
| 1.2 Physiologie de l'épithélium alvéolaire | 30 |
| 1.2.1 L'épithélium alvéolaire : une barrière physique et dynamique | 31 |
| 1.2.1.1 Rôle des jonctions cellulaires dans l'intégrité de l'épithélium alvéolaire | 31 |
| 1.2.1.2 La stabilité alvéolaire par le surfactant pulmonaire | 35 |
| 1.2.1.2.1 Composition du surfactant | 35 |
| 1.2.1.2.2 Biogenèse, régulation et recyclage du surfactant | 37 |
| 1.2.2 Transport des fluides et des ions | 38 |
| 1.2.2.1 Mouvement liquidien | 39 |

| | |
|---|----|
| 1.2.2.1.1 Homéostasie liquidienne du fœtus à l'adulte | 39 |
| 1.2.2.1.2 Canaux aquaporines..... | 43 |
| 1.2.2.2 Transport sodique | 45 |
| 1.2.2.2.1 Canal épithélial sodique (ENaC) | 45 |
| 1.2.2.2.2 Pompe sodique Na ⁺ /K ⁺ -ATPase..... | 51 |
| 1.2.2.3 Transport potassique | 54 |
| 1.2.2.3.1 Canaux dépendants du voltage (Kv) | 56 |
| 1.2.2.3.2 Canaux dépendants du calcium | 61 |
| 1.2.2.3.3 Canaux K ⁺ à deux pores..... | 62 |
| 1.2.2.3.4 Canaux K ⁺ à rectification entrante | 64 |
| 1.3 La fonction des canaux K ⁺ dans la physiologie de l'épithélium alvéolaire..... | 66 |
| 1.3.1 Canaux K ⁺ sensibles à l'oxygène..... | 66 |
| 1.3.2 Contrôle du transport transépithélial ionique et liquidien par les canaux K ⁺ | 67 |
| 1.3.3 Régulation de la réponse inflammatoire | 69 |
| 1.3.3.1 Mécanisme d'action du macrophage alvéolaire résident..... | 70 |
| 1.3.3.2 La contribution des cellules alvéolaires à la réponse inflammatoire | 71 |
| 1.3.3.3 Le recrutement et la migration des neutrophiles..... | 71 |
| 1.3.3.4 La réponse inflammatoire médiée par les canaux K ⁺ | 73 |
| 1.3.4 Les mécanismes de la réparation épithéliale..... | 74 |
| 1.3.4.1 Interaction des facteurs de croissance, des intégrines et des canaux K ⁺ dans les processus de la réparation épithéliale | 77 |
| 1.4 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) | 79 |
| 1.4.1 Origine et définition | 79 |
| 1.4.2 Le diagnostic..... | 80 |

| | |
|--|-----|
| 1.4.3 Épidémiologie et prise en charge du patient | 82 |
| 1.4.4 La pathophysiologie du SDRA..... | 83 |
| 1.4.5 Amélioration de la prise en charge ventilatoire et traitements pharmacologiques à l'étude | 86 |
| 1.4.6 Modèles expérimentaux <i>in vivo</i> | 87 |
| Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs..... | 95 |
| 2.1 Hypothèse de recherche | 95 |
| 2.2 Objectif général | 95 |
| 2.2.1 Objectifs spécifiques | 96 |
| 2.2.1.1 Étude #1 | 96 |
| 2.2.1.2 Étude #2 | 96 |
| 2.2.1.3 Étude #3 | 96 |
| 2.2.1.4 Étude #4 | 97 |
| 2.2.1.5 Étude #5 | 97 |
| Chapitre 3 : Absence d'effet bénéfique du dexaméthasone dans la résolution des lésions pulmonaires aiguës dans un modèle murin..... | 98 |
| 3.1 Statut de l'article #1 | 98 |
| 3.2 Mise en contexte..... | 98 |
| 3.3 Manuscrit de l'article #1..... | 99 |
| Chapitre 4 : Impact de la déficience d'expression du canal ENaC chez des souris transgéniques sur les paramètres du SDRA induit par la bléomycine..... | 127 |
| 4.1 Statut de l'article #2 | 127 |
| 4.2 Mise en contexte..... | 127 |
| 4.3 Manuscrit de l'article #2..... | 128 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 5 : Impact de la modulation du canal potassique KvLQT1 sur l'homéostasie liquidienne alvéolaire dans un modèle murin d'oedème pulmonaire induit par la thiourée | 153 |
| 5.1 Statut de l'article #3 | 153 |
| 5.2 Mise en contexte | 153 |
| 5.3 Manuscrit de l'article #3..... | 154 |
| Chapitre 6 : Rôle du canal KvLQT1 sur les paramètres de la phase aigue exsudative du syndrome de détresse respiratoire aigue induits par la bléomycine <i>in vivo</i> | 192 |
| 6.1 Statut de l'article #4 | 192 |
| 6.2 Mise en contexte..... | 192 |
| 6.3 Matériel et méthodes | 193 |
| 6.4 Résultats | 199 |
| Chapitre 7 : Effets bénéfiques de l'activation du canal K ⁺ KvLQT1 sur les dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine..... | 219 |
| 7.1 Statut de l'article #5 | 219 |
| 7.2 Mise en contexte..... | 219 |
| 7.3 Matériel et méthodes | 220 |
| 7.4 Résultats | 226 |
| Chapitre 8 – Discussion | 244 |
| 8.1 Stratégies de résolution du SDRA et défis rencontrés | 245 |
| 8.1.1 Résolution du SDRA par l'atténuation de la réponse inflammatoire grâce au dexaméthasone (DEX)..... | 245 |
| 8.1.2 Résolution du SDRA par l'amélioration de la clairance liquidienne grâce à la fonction d'ENaC | 249 |
| 8.1.3 Nouvelle approche de la résolution du SDRA par la modulation des canaux K ⁺ | 251 |

| | |
|---|-----|
| 8.1.3.1 Impact de la modulation des canaux K ⁺ sur le bilan métabolique sanguin, le phénotype pulmonaire et la mécanique respiratoire en condition physiologique | 251 |
| 8.1.3.2 Modulation des canaux K ⁺ sur le bilan métabolique sanguin, le phénotype pulmonaire et la mécanique respiratoire en condition pathologique..... | 254 |
| 8.1.3.3 Modulation des canaux K ⁺ sur l'œdème pulmonaire | 256 |
| 8.1.3.4 Modulation des canaux K ⁺ sur la réponse inflammatoire..... | 259 |
| 8.1.3.5 Implication des canaux K ⁺ sur les mécanismes de la phase de réparation épithéliale | 262 |
| 8.2 Limitations générales rencontrées lors de mon projet de doctorat..... | 268 |
| 8.3 Perspectives émergentes dans la résolution du SDRA..... | 270 |
| Références bibliographiques..... | 273 |
| Annexes | 299 |
| Annexe A : Article #1 | 299 |
| Annexe B : Article #2 | 312 |
| Annexe C : Article #3 | 323 |
| Annexe D : Article #4..... | 339 |

Liste des tableaux

| | | |
|--------------|---|-----|
| Tableau 1. – | Caractéristiques des composantes du surfactant pulmonaire..... | 37 |
| Tableau 2. – | Répartition tissulaire et cellulaire des différentes sous-unités formant la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase exprimées chez divers organismes..... | 51 |
| Tableau 3. – | Critères d'évaluation clinique du SDRA par la définition de Berlin 2012..... | 80 |
| Tableau 4. – | Évaluation des symptômes cliniques suggérant la cause primaire du SDRA. | 81 |
| Tableau 5. – | Caractéristiques de la pathophysiologie du SDRA présentes chez les modèles expérimentaux d'insultes pulmonaires directes..... | 90 |
| Tableau 6. – | Caractéristiques de la pathophysiologie du SDRA présentes dans les modèles expérimentaux d'insultes pulmonaires indirectes..... | 92 |
| Tableau 7. – | Caractéristiques de la pathophysiologie du SDRA présentes dans les modèles expérimentaux d'insultes directes et indirectes..... | 93 |
| Tableau 8. – | Tableau synthèse des canaux K ⁺ impliqués au niveau pulmonaire..... | 268 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1. – Anatomie de l'appareil respiratoire..... | 26 |
| Figure 2. – Histologie des voies conductrices et respiratoires | 28 |
| Figure 3. – Barrière alvéolo-capillaire..... | 30 |
| Figure 4. – Représentation schématique des différents types de jonctions cellulaires au niveau alvéolaire..... | 32 |
| Figure 5. – Transport ionique et liquidien dans le poumon fœtal et adulte | 40 |
| Figure 6. – Structure moléculaire du canal ENaC | 47 |
| Figure 7. – Voies régulatrices du canal ENaC..... | 50 |
| Figure 8. – Description des canaux voltage-dépendants (Kv) | 57 |
| Figure 9. – Distribution tissulaire des différentes sous-unités KCNE | 60 |
| Figure 10. – Description des canaux dépendants du calcium (KCa) | 62 |
| Figure 11. – Description des canaux K ₂ P..... | 63 |
| Figure 12. – Description des canaux Kir | 64 |
| Figure 13. – Mécanismes de recrutement et de migration des neutrophiles..... | 73 |
| Figure 14. – Mécanismes successifs de la réparation épithéliale..... | 75 |
| Figure 15. – Relation entre les intégrines, facteurs de croissance et l'ECM d'une cellule en migration..... | 78 |
| Figure 16. – Représentation des mécanismes lésionnels produits par le SDRA dans une alvéole..... | 85 |
| Figure 17. – Mesure de la dysfonction systémique par analyse sanguine <i>in vivo</i> | 202 |
| Figure 18. – Évaluation de la fonction pulmonaire <i>in vivo</i> | 204 |
| Figure 19. – Évaluation de la fonction pulmonaire <i>in vivo (suite)</i> | 206 |
| Figure 20. – Évaluation de la fonction pulmonaire <i>in vivo (suite)</i> | 209 |
| Figure 21. – Altérations de la barrière alvéolo-capillaire chez les souris exposées à la bléomycine..... | 210 |
| Figure 22. – Impact de la modulation du canal KvLQT1 sur la réponse inflammatoire cellulaire induite par la bléomycine..... | 212 |

| | |
|--|-----|
| Figure 23. – Évidence de lésions tissulaires histologiques et analyse des paramètres des dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine..... | 215 |
| Figure 24. – Évaluation de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire par marquage des ATI et ATII sur coupes de tissus de poumons de souris..... | 217 |
| Figure 25. – Vitesse de réparation de monocouches de cellules alvéolaires de souris WT et KvLQT1-KO..... | 218 |
| Figure 26. – Mesure de la dysfonction systémique par analyse sanguine <i>in vivo</i> | 229 |
| Figure 27. – Évaluation de la fonction pulmonaire <i>in vivo</i> | 230 |
| Figure 28. – Évaluation de la fonction pulmonaire <i>in vivo</i> (suite) | 232 |
| Figure 29. – Évaluation de la fonction pulmonaire <i>in vivo</i> (suite) | 234 |
| Figure 30. – Impact de l'activation de KvLQT1 sur l'altération de la barrière alvéolo-capillaire chez les souris exposées à la bléomycine..... | 235 |
| Figure 31. – Impact de l'activation du canal KvLQT1 sur la réponse inflammatoire cellulaire induite par la bléomycine..... | 237 |
| Figure 32. – Impact de l'activation du canal KvLQT1 sur les paramètres de dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine..... | 240 |
| Figure 33. – Impact de l'activation de KvLQT1 sur l'intégrité de l'épithélium alvéolaire observée par marquage des ATI et ATII sur coupes de tissus de poumons de souris..... | 241 |
| Figure 34. – Vitesse de réparation de monocouches de cellules alvéolaires de rats traités avec l'activateur de KvLQT1 en présence de bléomycine. | 243 |
| Figure 35. – Évaluation des dommages épithéliaux, de la sévérité de l'inflammation et de l'épaississement septal sur coupes histologiques de poumons de souris challengées à la bléomycine (J7) et ayant été traitées avec les composés anti-récepteurs IL-6 et IL-1 β | 248 |
| Figure 36. – Impact sur l'expression d' α -ENaC dans des cellules isolées de poumons de souris traités par des modulateurs pharmacologiques du canal KvLQT1, 24 h avant le prélèvement, en condition basale. | 257 |
| Figure 37. – Réparation épithéliale sur culture cellulaire d'ATII humaine exposée à un BAL-sain ou BAL-ARDS en combinaison avec des activateurs des canaux KvLQT1 (R-L3) et K _{ATP} (pinacidil)..... | 267 |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|------------------------|--|
| A549 | lignée de cellules alvéolaires d'adénocarcinome humain |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ADCP | adénocarcinome pulmonaire |
| AE2 | anion exchanger type 2 (échangeur d'anion HCO ₃ ⁻ /Cl ⁻) |
| ALF | alveolar lining fluid (fluide de recouvrement alvéolaire) |
| ALI | acute lung injury (dommages pulmonaire aigus) |
| AMPc | adénosine monophosphate cyclique |
| AQP | aquaporines |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| ATI | cellule épithéliale alvéolaire de type I |
| ATII | cellule épithéliale alvéolaire de type II |
| ATP | adénosine triphosphate |
| BAL | bronchoalveolar lavage (lavage broncho-alvéolaire) |
| Ca²⁺ | ion calcium |
| CaCC | calcium-activated chloride channels (canal Cl ⁻ dépendant du calcium) |
| CCL | ligand chimiokine |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (régulateur transmembranaire de la fibrose kystique) |
| Cl⁻ | ion chlorure |
| CL | corps lamellaire |
| CLP | ligature et ponction du cæcum |
| CO₂ | dioxyde de carbone |
| Crb3 | protéines transmembranaires de la famille Crumbs |
| CRD | carbohydrate recognition domain (domaine de reconnaissance des carbohydrate) |
| Cx | connexines |
| CXCL | chimiokine (motif C-X-C) |
| DAMP | damage-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux dégâts) |
| DEX | dexaméthasone |
| DR | dopamine receptor (récepteur dopaminergique) |

| | |
|------------------------------------|---|
| ECG | électrocardiogramme |
| ECM | extracellular matrix (matrice extracellulaire) |
| EGF | epithelial growth factor (facteur de croissance épithéliale) |
| EM | electron microscopy (microscopie électronique) |
| ENaC | épithélial sodium channel (canal sodique épithélial) |
| ERK | extracellular signal-regulated kinases (kinase de régulation du signal extracellulaire) |
| FAK | focal adhesion kinase |
| GM-CSF | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages) |
| GPCR | G protein-coupled receptors (récepteurs couplés aux protéines G) |
| GRE | glucocorticoid response element (séquence d'élément de réponse aux glucocorticoïdes) |
| HCO₃⁻ | anion bicarbonate |
| H₂O₂ | peroxyde d'hydrogène |
| hBD2-3 | human defensin (defensine humaines 2-3) |
| HCl | acide d'hydrochlorure |
| HSC | highly cation selective channel (canaux hautement selective pour le Na ⁺) |
| I/VCAM | molécule d'adhésion cellulaire |
| IL | interleukine |
| INF | interféron |
| I/R | ischémie-reperfusion |
| JLNS | Jervell and Lange-Nielsen syndrome |
| JS | jonction serrée |
| K⁺ | ion potassium |
| K_i | constante d'inhibition |
| K_m | constante de Michaelis |
| KO | knock-out (ablation génétique) |
| Kv | canal potassique voltage-dépendant |
| LDH | lactate dehydrogénase |
| LPS | lipopolysaccharide |
| LQTS | syndrome du QT long (long QT syndrome) |

| | |
|--|--|
| MA | macrophages alvéolaires |
| MAPK | mitogen-activated protein kinases (protéine kinase mitogène-activée) |
| MCP-1 | monocyte chemoattractant protein-1 (protéine-1 chimioattractante de monocyte) |
| minK- mirp | MinK-related protein : sous-unité régulatrice du canal potassique K _v LQT1 |
| MIP2 | Macrophage inflammatory protein 2 (cytokine inflammatoire dérivé de macrophages) |
| MMP | métalloprotéinases |
| Na⁺ | ion sodium |
| Na⁺/K⁺-ATPase | pompe sodium potassium hydrolysant l'ATP |
| NADPH | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NETs | <i>neutrophil extracellular traps</i> |
| NK-kB | nuclear factor-kappa B (facteur nucléaire kB) |
| NHE | Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1 (échangeur Na ⁺ /H ⁺) |
| NKCC | Na-K-Cl cotransporter (cotransporteur Na-K-Cl) |
| NLRs | <i>NOD-like receptors</i> |
| NSC | non-selective cation channel (canal non sélectif pour le Na ⁺) |
| O₂ | dioxygène |
| PAMP | pathogen-associated molecular patterns (particules associées aux pathogènes) |
| Panx | pannexine |
| pH | potentiel hydrogène |
| PIP₂₋₃ | phosphatidylinositol-biphosphates 2-3 |
| PKA | protéine kinase A |
| PKC | protéine kinase C |
| P_o | probabilité d'ouverture |
| PRRs | récepteurs de reconnaissance de motifs (pattern recognition receptor) |
| pS | pico Siemens |
| RE | réticulum endoplasmique |
| R-L3 | activateur du canal K _v LQT1 |
| ROS | reactive oxygen species (espèce reactive de l'oxygène) |
| SDRA | syndrome de détresse respiratoire aiguë |
| siRNA | small interference rebonucleotide (petits ARN interférents) |

| | |
|--------------------------------|---|
| SP- | surfactant protein (protéines du surfactant) |
| SRs | scavengers receptors (récepteurs éboueurs) |
| SUR | sulfonylurea receptor 2 (récepteur aux sulfonyles : sous-unité régulatrice du canal K_{ATP}) |
| TGF-β | transforming growth factor (facteur de croissance transformant bêta) |
| TLRs | Toll-like receptors (récepteurs de type Toll) |
| TM | transmembranaire (domaine structurale) |
| TNF-α | tumor necrosis factor (facteurs de nécrose tumorale) |
| VILI | ventilatory-induced lung injury (lésion pulmonaire induite par le ventilateur) |
| WT | wild type (sauvage) |
| ZO | <i>zonula occludens</i> |

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury, Dre Sze Man Tse, Dr Jean-François Lauzon-Joset et Dr Ahmed Chraïbi d'avoir accepté de lire ma thèse. Je suis très reconnaissante que vous ayez pris le temps d'évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement ma directrice de recherche, Dre Emmanuelle Brochiero, pour m'avoir fait confiance durant toutes ces années. Merci pour le temps que tu as consacré à m'orienter et à l'opportunité que tu m'as donnée pour développer mes compétences en recherche.

À tout ceux dont nos chemins se sont croisés au 8^e étage ou plus précisément au R08-200, ces lieux m'auront permis de faire de belles rencontres et d'y forger de belles amitiées. À ma team du moment; Émilie (partner in crime in ARDS), Benjamin, Sarah, Damien et Juju, merci pour votre bonne humeur et votre inépuisable gentillesse. Cette expérience n'aurait jamais été aussi enrichissante sans vous tous et je vous remercie pour tout. Ce travail vous appartient.

Merci à toute ma famille pour vos encouragements! Plus particulièrement à mes parents, Laura et Jean qui m'auront transmis deux qualités inestimables pour accomplir ce travail, la curiosité et la persévérance. À ma sœur, ma plus grande amie, pour ton soutien inconditionnel.

À Jean-Francois, mon chéri qui m'a tant appuyé moralement. Merci de ta patience et de m'avoir accompagnée dans les moments les plus heureux et les plus difficiles ces dernières années. Je vous aime tellement !

Merci également à tous les organismes subventionnaires qui m'ont appuyée durant mes études, ce support financier et cette reconnaissance ont été grandement appréciés.

Et finalement, comme dirait le grand rapper des temps modernes; Snoop Dogg et ce, en toute humilité. I wanna thank me for doing all this work.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est constitué de plusieurs organes soutenant la fonction principale du poumon soit celle de respirer. Le phénomène de respiration permet l'oxygénation du sang et assure une perfusion adéquate de tous les autres tissus du corps humain (1). L'exposition continue des poumons aux agressions exogènes (tabac, exposition chimique, particules polluantes, pathogènes bactériens et viraux) nécessite la mise en place de systèmes de défense de l'hôte (2).

1.1.1 Description anatomique

Le système respiratoire est anatomiquement divisé entre les voies supérieures (situées à l'extérieur des poumons) et inférieures. Les voies supérieures font référence aux cavités nasales, nasopharynx, larynx et à la trachée tandis que les voies inférieures sont composées des bronches, bronchioles et des alvéoles (3) (voir **Figure 1**).

L'appareil respiratoire est également sous-divisé selon leurs propriétés fonctionnelles de voies conductrices ou de système d'échanges gazeux. Les voies conductrices sont constituées des voies supérieures, des bronches et bronchioles terminales (4). L'air inhalé est réchauffé, humidifié et purifié (défense contre les antigènes) lors de son passage dans les cavités nasales et le nasopharynx (5) avant d'atteindre la trachée. Cet unique conduit se divise en deux bronches principales qui par la suite se ramifient de façon dichotome pour former les bronches lobaires, segmentaires et tertiaires, suivi des bronchioles terminales en 16^e-21^e générations (1,4). Les bronchioles respiratoires font alors suite aux bronchioles terminales et marquent le commencement des voies respiratoires. Les observations microscopiques démontrent en moyenne, 2-3 ordres de bronchioles respiratoires segmentées en 4-6 conduits alvéolaires dont chacun mènent à un sac alvéolaire composé de plusieurs alvéoles (5). Les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires et les alvéoles font aussi référence d'unités respiratoires ou

acinus (5). Ces trois éléments constituent le site d'échanges gazeux entre l'air contenu dans la lumière alvéolaire et les capillaires sanguins (1).

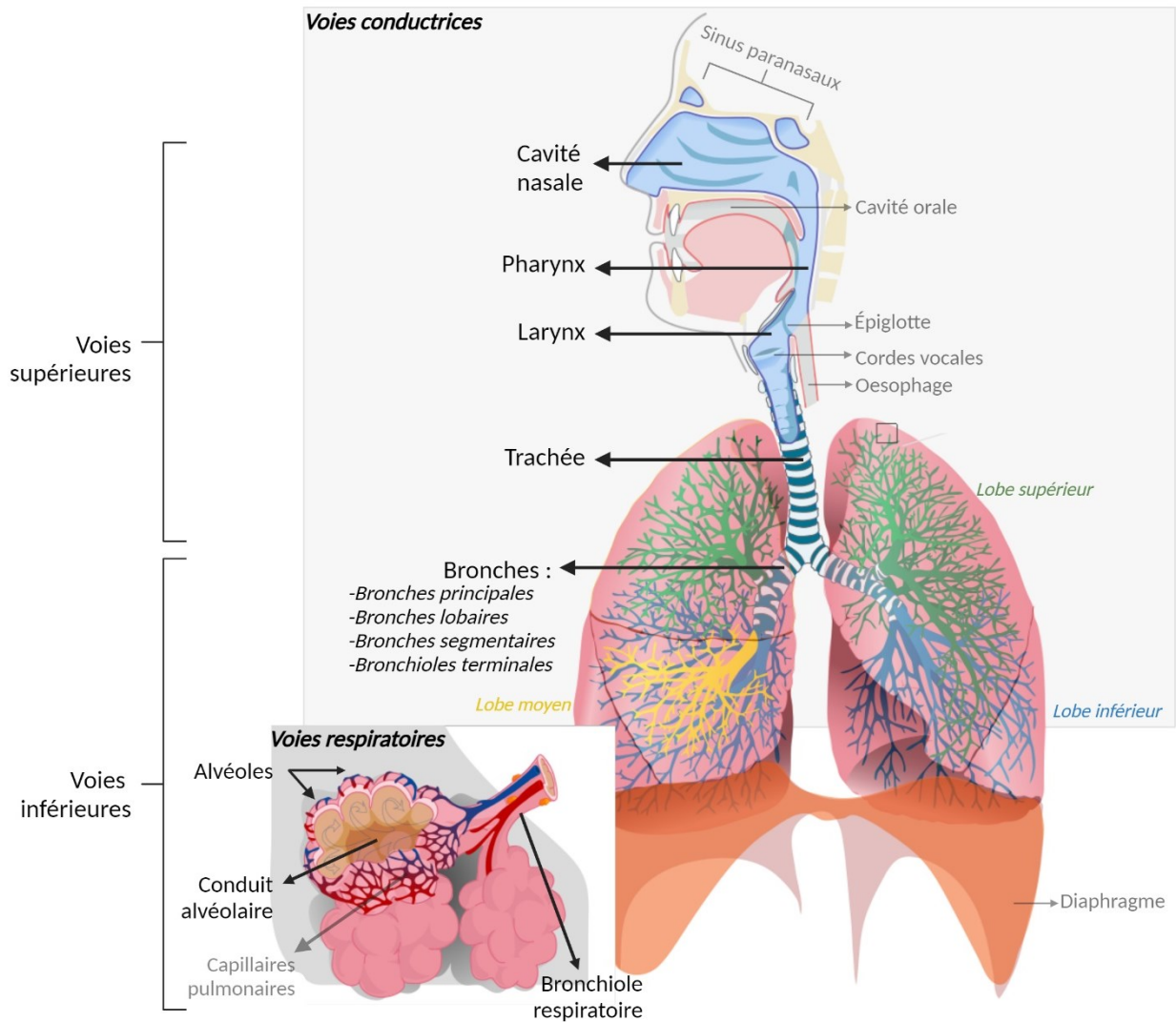


Figure 1. – Anatomie de l'appareil respiratoire.

Représentation anatomique du système respiratoire. Séparation des voies conductrices et des voies respiratoires. Créé avec BioRender.com

1.1.1.1 Vascularisation pulmonaire

Il existe deux types de circulation sanguine. La circulation pulmonaire sert à acheminer le sang désoxygéné aux alvéoles afin de participer à l'échange gazeux. L'artère pulmonaire reçoit le sang

désoxygéné du cœur droit (4). Cette artère se ramifie finement pour former des plexus capillaires en contact étroit avec les alvéoles. On dénombre environ 300 millions d'alvéoles qui sont chacune en contact avec un millier de segments capillaires (3). En effet, avec un diamètre de 100-300 microns pour une alvéole et d'environ 10-14 microns pour un capillaire, la surface d'échange gazeux alors estimée à 70 m² constitue une interface d'échange considérable (3). Lorsque la diffusion rapide de l'O₂ et CO₂ est complétée, le sang oxygéné se concentre au niveau de la veine pulmonaire en direction du cœur gauche. Finalement, la circulation bronchique permet d'approvisionner le poumon en sang oxygéné par les artères bronchiques qui prennent origine à l'aorte.

1.1.2 Description histologique

Bien que l'on dénombre une cinquantaine de types cellulaires différents au niveau du système respiratoire, seulement une douzaine correspond à des cellules de type épithélial (1). Les voies conductrices sont recouvertes d'un épithélium cylindrique pseudostratifié cilié avec présence de cellules caliciformes (6). Plus précisément, l'épithélium respiratoire (voir **Figure 2**) est composé

- de cellules ciliées (50% des cellules épithéliales totales (1)) dont la surface apicale est munie de cils qui battent de façon coordonnée dans le liquide périciliaire, permettant de déplacer le mucus emprisonnant les particules néfastes inhalées vers le pharynx avant d'être expectorées ou ingérées (5)
- de cellules caliciformes (20-30% des cellules totales) renfermant une multitude de vésicules contenant diverses glycoprotéines (ex. mucines). Leurs sécrétions permettent d'emprisonner les corps étrangers avant de les évacuer grâce au mouvement ciliaire (4)
- de cellules neuroendocrines, jouant un rôle dans la régulation du tonus musculaire bronchique
- de cellules souches basales qui ont la capacité de régénérer l'épithélium respiratoire (6)
- et finalement d'un type cellulaire, identifié plus récemment, les ionocytes (7). Bien qu'elles ne représentent qu'1-2% des cellules épithéliales totales des voies aériennes, elles expriment fortement le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator) lui suggérant une implication mineure dans la pathologie de la fibrose kystique (7).

Il s'agit cependant d'un épithélium transitoire, qui se modifie tout au long des voies aériennes notamment avec une réduction de cartilage, de glandes sous-muqueuses et de cellules caliciformes plus l'on s'approche des voies distales (5,6). Au niveau des voies respiratoires, les bronchioles respiratoires présentent un épithélium composé de cellules cubiques ciliées et de cellules Clubs non ciliées. Ces dernières possèdent des granules du côté apical pouvant sécréter des composants du surfactant et/ou des modulateurs inflammatoires. Elles ont aussi un pouvoir de régénération épithéliale, comme les cellules basales (1,5,6).

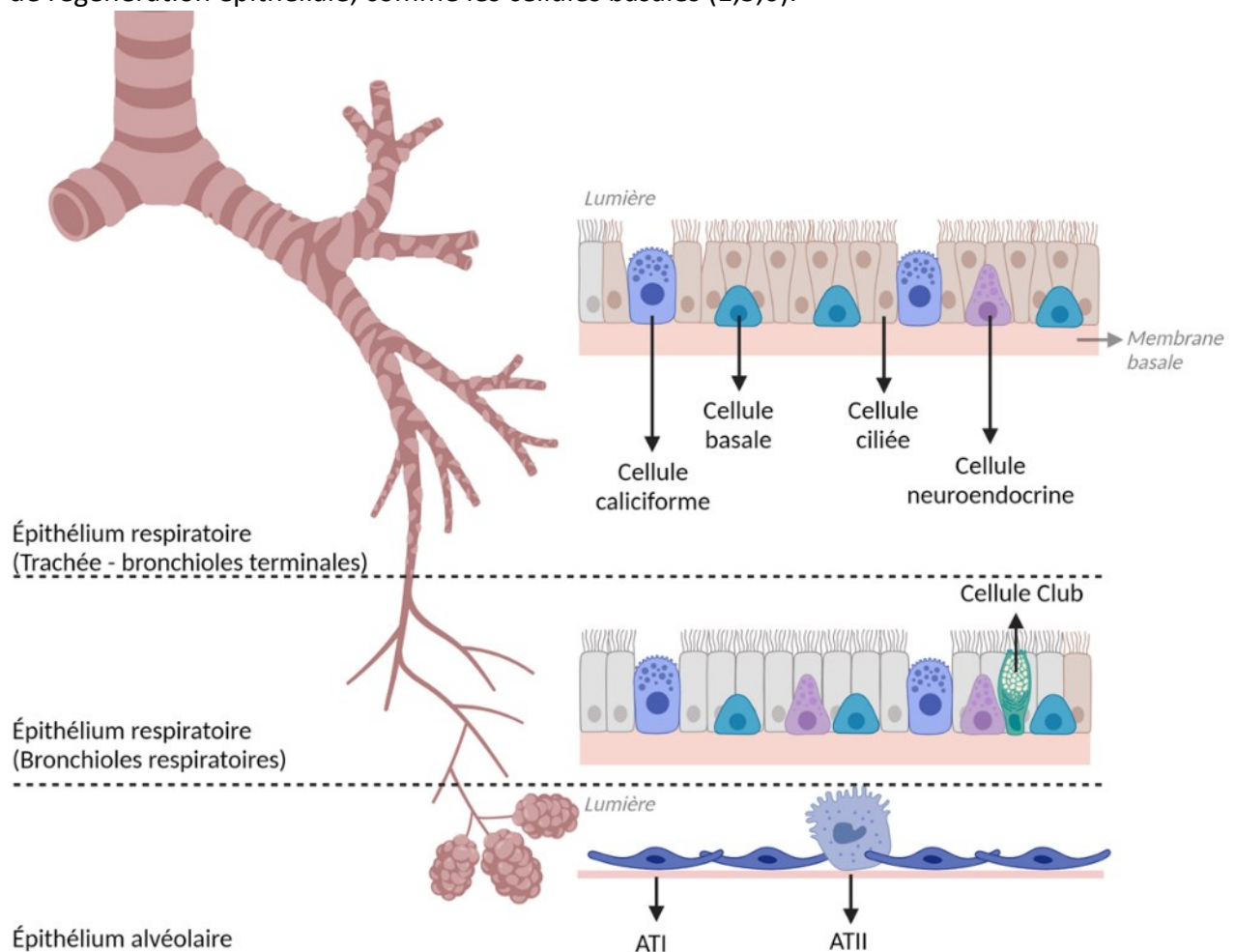


Figure 2. – Histologie des voies conductrices et respiratoires

Composition cellulaire des différents types d'épithélia présents le long du système respiratoire. Créé avec BioRender.com

1.1.2.1 Cellules alvéolaires

Les alvéoles sont revêtues, du côté de la lumière alvéolaire par deux types de cellules épithéliales : les pneumocytes de type I (ATI) ou de type II (ATII) (voir **Figure 2**). Les ATI sont de forme étendue et recouvrent 95% de la surface alvéolaire (1). Leur cytoplasme mince facilite la diffusion des gaz sanguins, mais les rend vulnérables aux dommages. Les ATII sont de forme cuboïde, plus nombreuses (60% de l'épithélium de surface (6)), mais ne couvrent que 5% de la surface alvéolaire et sont situées à l'intersection de deux alvéoles. Elles possèdent une structure nommée corps lamellaire où est produit le surfactant qui est ensuite sécrété *via* le pôle apical formé de microvillosités (1). Cet agent permet de réduire la tension de surface des alvéoles afin d'éviter qu'elles ne collabent lors de l'expiration. Les cellules ATII ont également la capacité de synthétiser de la fibronectine ou de l' α -antitrypsine et ainsi exercer un rôle dans la réponse inflammatoire (5). Les ATII sont des cellules progénitrices avec une activité mitotique leur permettant de se diviser, puis de se différencier en ATII ou en ATI afin d'assurer le renouvellement physiologique de l'épithélium alvéolaire et de restaurer l'intégrité épithéliale suite aux lésions (5). Grâce à diverses techniques d'analyse génomique pratiquée au cours de la vie d'une souris, il a été démontré qu'en condition physiologique, l'auto-renouvellement des ATII ou la programmation d'une cellule ATII vers ATI est très lent (période correspondant à plusieurs mois). Toutefois, ce phénomène s'accélère lorsque l'épithélium subi des dommages et pourrait être médié par la réponse des ATI suite au stress (8).

Les alvéoles sont séparées entre elles par le septum alvéolaire soit une cloison en contact direct avec les cellules épithéliales. Certaines perforations que l'on nomme les pores de Kohn sont visibles au niveau de cette paroi afin d'aider la circulation et la communication entre deux alvéoles adjacentes (6). Dans la portion des parois alvéolaires où il n'y a pas d'échange gazeux, un espace interstitiel entre ATI/ATII et membrane basale contient du tissu de soutien (fibres de collagène et élastine notamment), des capillaires alvéolaires et d'autres types cellulaires tels que les myofibroblastes/fibroblastes et les macrophages alvéolaires (4). Ces derniers constituent les cellules non épithéliales les plus abondantes dans le poumon. En effet, chez un individu sain, les macrophages représentent 95% d'un lavage broncho-alvéolaire (5).

1.1.2.2 La barrière alvéolo-capillaire

La barrière alvéolo-capillaire, soit la région responsable des échanges gazeux, mesure 0,4-0,5 μm d'épaisseur (5). Cette structure (voir **Figure 3**) consiste en trois éléments, soit le cytoplasme d'une ATI, le cytoplasme d'une cellule endothéliale et les deux membranes basales respectives ayant fusionné. Ceci ne laisse qu'une très mince structure à traverser pour l'oxygène de l'air contenu dans la lumière alvéolaire et le dioxyde de carbone porté par les érythrocytes.

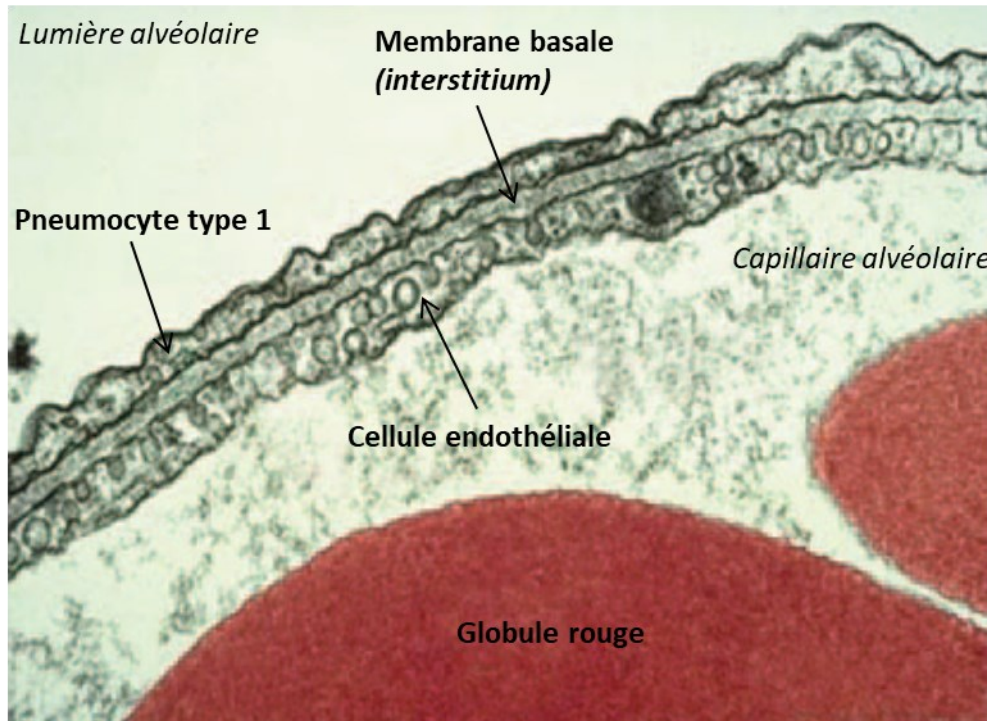


Figure 3. – Barrière alvéolo-capillaire.

Micrographie électronique en transmission d'une coupe transversale de la barrière alvéolo-capillaire composée d'une ATI et d'une cellule endothéliale liée à la membrane basale. Adapté de Patton and Byron, 2007(9).

1.2 Physiologie de l'épithélium alvéolaire

Outre sa structure et sa composition, l'épithélium alvéolaire possède plusieurs propriétés biologiques, -mécaniques, -physiques et -chimiques qui lui permettent de maintenir l'homéostasie et la fonction du poumon. Avant tout, l'épithélium alvéolaire est une barrière physique et dynamique constituant une première ligne de défense. Afin de préserver son équilibre,

l'épithélium alvéolaire joue un rôle important pour assurer le maintien de la stabilité alvéolaire, le transport des ions et des fluides, sa réponse immunologique/inflammatoire et sa capacité de réparation épithéliale à la suite de lésions.

1.2.1 L'épithélium alvéolaire : une barrière physique et dynamique

La principale fonction d'un épithélium est d'agir en tant que barrière physique qui sépare nos organes internes de l'environnement extérieur. L'étanchéité de l'épithélium alvéolaire est primordiale afin de protéger nos poumons des divers pathogènes et polluants contenus dans l'air. Afin de préserver l'intégrité et la perméabilité de l'épithélium alvéolaire, les jonctions intercellulaires, qui permettent la cohésion et la communication cellulaire à travers l'épithélium sont nécessaires. De plus, l'épithélium alvéolaire est une barrière dynamique capable d'émettre une réponse cellulaire afin de maintenir une défense adéquate de l'hôte.

1.2.1.1 Rôle des jonctions cellulaires dans l'intégrité de l'épithélium alvéolaire

Tout d'abord, au pôle apical se trouve un complexe multiprotéique nommé le complexe de polarité qui, comme son nom l'indique, procure le sens de polarité aux cellules. L'une des protéines impliquées dans ce complexe, le CRB3 (Crumbs Cell Polarity Complex Component 3) joue un rôle primordial dans le développement pulmonaire puisque, les souris déficientes pour CRB3 décèdent à la naissance. Les poumons de ces souris présentent une morphologie anormale (bulles membranaires, alvéoles collabés) ainsi que plusieurs débris cellulaires au niveau de l'espace alvéolaire (10). La polarité cellulaire est un élément crucial dans le maintien de la physiologie alvéolaire et peut également servir à rendre physiquement accessibles des récepteurs membranaires pour leurs ligands respectifs. Ensuite, ce sont les jonctions cellulaires, divisées en 1) les jonctions serrées vers le côté apical, 2) les jonctions adhérentes au centre et 3) les jonctions communicantes vers la membrane basolatérale qui contribuent à l'intégrité de l'épithélium.

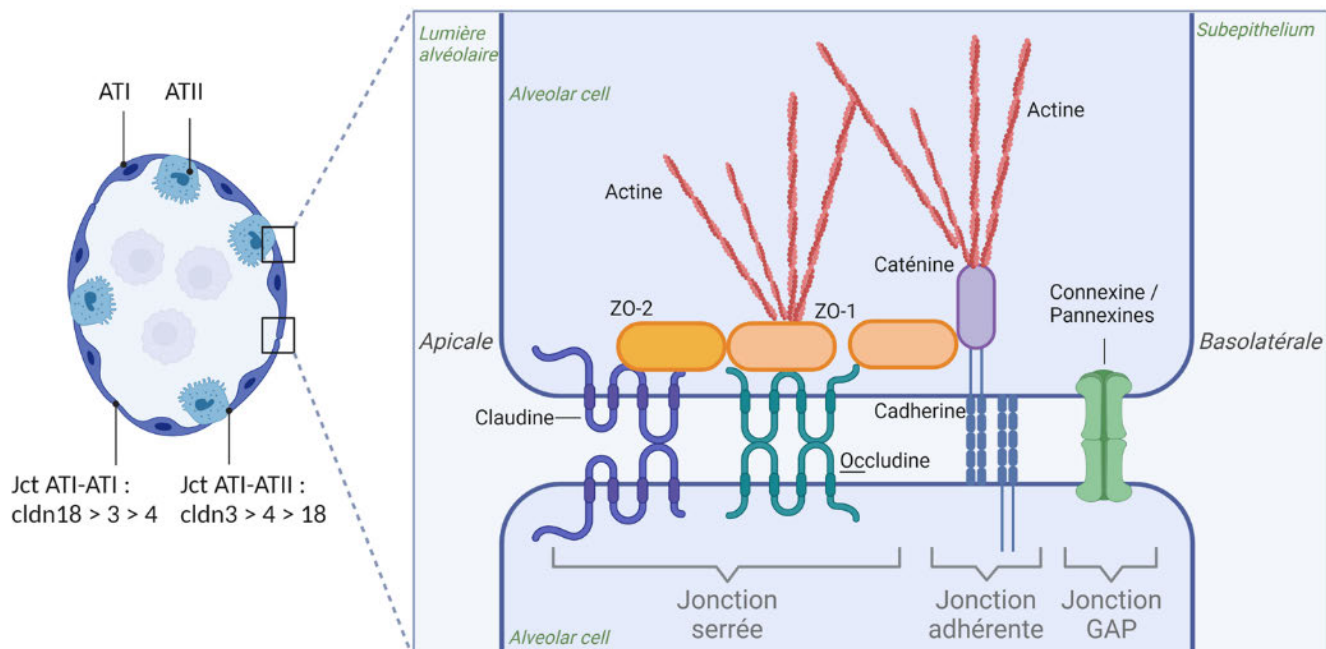


Figure 4. – Représentation schématique des différents types de jonctions cellulaires au niveau alvéolaire.

Les jonctions serrées, adhérentes et communicantes et leurs composantes protéiques impliquées sont représentées. Créée avec BioRender.com.

Les jonctions serrées (JS) sont composées par l'interaction de protéines transmembranaires (claudine et occludine), de protéines d'ancrage (ZO : *zonula occludens*) et des éléments du cytosquelette (filaments d'actine) (voir **Figure 4**). Les interactions entre protéines transmembranaires forment un espace paracellulaire qui permet le mouvement des fluides et des ions entre les cellules et sont donc grandement responsables de la perméabilité membranaire (11). L'expansion des poumons fœtaux favorise la différenciation des AII vers les ATI et la présence des JS est vitale pour la maturation et la différenciation cellulaire (12). Les cellules alvéolaires fœtales humaines non différenciées sont incapables de produire des JS et présentent une faible résistance transépithéliale (13). Toutefois, lorsque ces cultures cellulaires sont soumises à la dexaméthasone (corticothérapie utilisée en néonatalogie pour améliorer la maturation pulmonaire fœtale), les cultures différenciées ont une régulation à la hausse du gène *CLDN7* (claudine-7) (14) et *CLDN18* (claudine-18) (15). Une autre série d'expérimentation *in vitro*

a permis de démontrer que les cultures primaires de cellules alvéolaires enrichies en ATII expriment les claudines-3 et -5. Après une semaine de transdifférenciation, la culture devient de plus en plus hétérogène avec un mélange d'ATII et d'ATI, où l'on observe alors une augmentation de l'expression des claudines-4 et -7 (16). Le type d'interaction entre les cellules ATI-ATI ou ATI-ATII est unique puisque la claudine-3 est exclusive à la jonction ATI-ATII et ne forme pas de JS entre ATI-ATI (17).

La claudine-5 est principalement exprimée au niveau microvasculaire, mais également dans les cellules alvéolaires du rat (11). La hausse de son expression est associée à une diminution de la résistance transépithéliale et à la fuite du liquide pulmonaire (11).

La claudine-18 est la plus prédominante au niveau de l'épithélium alvéolaire (11). Son rôle fondamental dans le phénomène d'alvéolarisation et le maintien de barrière épithéliale fut confirmé chez les souriceaux déficients pour la claudine-18 (claudine-18-KO) et dans les poumons fœtaux humains collectés post-mortem (18). Une autre étude (19) a permis d'observer que les souris claudine-18-KO expriment un niveau plus élevé de claudines-3 et -4. Ce phénomène compensatoire est accompagné par un changement de profil des protéines de JS, une diminution de la résistance transépithéliale et curieusement, d'une amélioration dans la clairance alvéolaire. Cette dernière observation pourrait être secondaire à une augmentation de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ et de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Toutefois, ce système compensatoire n'est pas reproduit chez les souris claudine-4-KO (20). La claudine -4 et -18 ont pourtant la même sensibilité envers les insultes pulmonaires (19,20). La clairance alvéolaire mesurée dans des poumons humains *ex vivo* corrèle avec les niveaux d'expression de claudine-4. Les poumons donateurs présentant une altération physiologique minimale (score clinique) expriment plus fortement la claudine-4 que les poumons ayant un score de dommages pulmonaires élevés (21).

Les souris claudine-7-KO ont surtout une atteinte au niveau intestinal, notamment par leur dissociation avec l'intégrine $\alpha 2$, un récepteur d'adhésion cellulaire. Il a été démontré que les cellules épithéliales pulmonaires soumises à l'inhibition génique par ARN interférent (siRNA) de claudine-7 expriment davantage la métalloprotéinase-3 (MMP-3), une enzyme capable de dégrader les interactions protéiques de la matrice extracellulaire avec la cellule (22). Ces

observations nous confirment alors le rôle des claudines dans la cohésion de l'épithélium et leur éventuelle implication dans des mécanismes telle que la réparation épithéliale.

Les claudines sont liées au cytosquelette grâce aux protéines d'ancrage ZO (voir **Figure 4**). Les protéines ZO-1 et ZO-2 sont essentielles à l'embryogenèse et l'organisation tissulaire, car leur absence engendre un phénotype léthal chez les souris ZO-1/2-KO (23,24). La protéine ZO-1 relie les JS aux jonctions adhérentes par leur interaction physique avec les caténines et l'occludine. De plus, l'occludine est responsable de l'initiation du processus d'apoptose lorsque les cellules sont lésées et que les connexions intercellulaires sont rompues. L'occludine est aussi identifiée comme une potentielle régulatrice de la transmigration des neutrophiles (25).

Les jonctions adhérentes sont des interactions directes cellules-cellules par des protéines transmembranaires (voir **Figure 4**). Les plus répandues sont les cadhérines épithéliales (E-cadhérine) et les cadhérines endothéliales (VE-cadhérine). Celles-ci sont liées à des protéines cytoplasmiques d'échafaudage nommées les caténines qui sont associées au cytosquelette (11). D'autres évidences ont aussi porté sur leur rôle dans diverses voies de signalisation telles que les β -caténines et la voie Wnt, impliquées lors de la différenciation tissulaire (11).

Les jonctions communicantes (GAP) sont la troisième classe de jonctions qui forment des pores entre les cellules adjacentes dans le but de diffuser des ions ou des fluides d'un cytoplasme à l'autre (11). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} transmise des ATI vers les ATII par les jonctions GAP stimule la sécrétion de surfactant vers la lumière alvéolaire (26). Les protéines responsables sont les connexines (Cx), il en existe 6 différentes au niveau de l'épithélium respiratoire, qui ont des propriétés spécifiques. La Cx43 est la plus abondante des connexines dans l'épithélium alvéolaire, mais la communication ATI-ATI se fait exclusivement par la Cx32 (27). Une autre classe de protéines responsables de jonctions GAP est les pannexines (Panx), qui sont exclusivement réservées au mouvement de l'ATP cytosolique vers le milieu extracellulaire afin de déclencher différentes cascades de signalisation calcique (28). Panx1 et le récepteur purinergique P2X7 sont retrouvés à la membrane des cellules alvéolaires et jouent différents rôles dans les processus d'initiation de la fibrose et de l'inflammation (11).

Finalement, plusieurs mécanismes sont dépendants de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire. En plus de sa fonction de barrière, plusieurs protéines issues des jonctions cellulaires sont capables de réguler diverses réponses cellulaires en lien avec la balance des fluides pulmonaires par le transport ionique/liquidien, la réponse inflammatoire ainsi que la sécrétion du surfactant. Il est donc indispensable de restaurer un épithélium cohésif et intègre suite à des lésions pulmonaires.

1.2.1.2 La stabilité alvéolaire par le surfactant pulmonaire

L'épithélium alvéolaire est recouvert et protégé par un fluide de recouvrement alvéolaire (ALF : alveolar lining fluid) dont les propriétés biophysiques et biochimiques contribuent au maintien d'un échange gazeux optimal. L'ALF est mince (0,2 μm), continu et divisé en une phase aqueuse nommée hypophase et un film phospholipidique stable à l'interface air-liquide (29). Cette structure permet aux alvéoles de résister aux changements de pressions/étirement lors du cycle inspiration-expiration. En 1929, Neergaard *et al.* (30) ont découvert qu'une plus grande pression est nécessaire pour insuffler un poumon avec de l'air qu'avec du salin, ce qui laisse sous-entendre que la tension de surface alvéolaire doit être faible. Clements (31), en 1957, identifie la présence d'un matériel hautement tensioactif présent à l'interface air-liquide qu'il définit comme le surfactant pulmonaire. Sa fonction est vitale afin d'éviter le collapse des alvéoles à l'expiration et empêcher l'infiltration liquidienne dans l'espace alvéolaire. Son rôle dans la défense immunologique fut décrit ultérieurement. Son absence entraîne une augmentation du travail respiratoire (énergie dépensée pour inspirer-expirer un gaz respiratoire) de 2% à 10% de la consommation totale d'oxygène menant à une détresse respiratoire (32) ainsi qu'une baisse de la compliance pulmonaire.

1.2.1.2.1 Composition du surfactant

Le surfactant pulmonaire est un complexe lipoprotéique constitué de 90% de lipides et 8-10% de protéines (33,34). Les phosphatidylcholines représentent 60-70% de la masse totale du surfactant avec, comme principal acteur, la dipalmitoyl phosphadidylcholine (DPPC, 50%). Sa structure en chaîne d'acides gras saturés lui permet d'être fortement compressée et d'éliminer les molécules d'eau vers l'hypophase et ainsi réduire sa tension de surface (35). D'autres phospholipides et lipides neutres sont également présentés dans le **Tableau #1**.

Les protéines du surfactant (SP : surfactant protein) sont distinctes par leur structure, leurs propriétés biophysiques et leur fonction. Ces protéines participent à l'organisation structurale des phospholipides soit dans les corps lamellaires (CL), lorsque sécrétées en agencement de myéline tubulaire, ou suivant leur intégration au niveau du film à l'interface air-liquide (34). Leur présence permet donc de diminuer la tension de surface et ainsi d'établir une stabilité alvéolaire.

SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles munies d'un domaine de reconnaissance carbohydrate (CRD), une structure importante dans l'équilibre de la réponse inflammatoire (36). En condition basale, ces protéines sont fixées aux récepteurs des macrophages alvéolaires (par le CRD) pour inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires. En présence d'infection, SP-A/D se lie aux ligands à la surface des microorganismes pour signaler leur présence aux macrophages et ainsi moduler leur phagocytose, la clairance des cellules apoptotiques et l'activité microcicide (37–40). Les protéines hydrophobes SP-B et SP-C représentent moins de 1% chacune du poids total du surfactant, mais leur présence est nécessaire au métabolisme du surfactant (41). En effet, les souris SP-B-KO décèdent à la suite d'une insuffisance respiratoire (42,43). La protéine SP-C n'est pas essentielle au bon fonctionnement du surfactant, mais constitue la seule protéine du surfactant propre aux ATII, ce qui en fait un marqueur cellulaire de choix (44).

Chez l'humain, les anomalies du surfactant peuvent être dues à une immaturité pulmonaire (syndrome de détresse respiratoire néonatal (SDRN)), une déficience de nature héréditaire (majoritairement d'une mutation au gène codant à SP-B ou -C), ou à l'inactivation des propriétés du surfactant (SDRA) (32,34).

L'administration de surfactant exogène chez des nouveau-nés atteints de SDRN a démontré une amélioration de la qualité des échanges gazeux et une diminution du taux de mortalité infantile (32). Toutefois, cette thérapie n'est pas efficace si le nouveau-né présente des mutations dans le gène correspondant à SP-B ou SP-C. En fait, la déficience en SP-B entraîne un phénotype léthal tandis que la déficience en SP-C génère différents phénotypes de maladies pulmonaires chroniques, sans toutefois être mortelle (32,34). La dysfonction du surfactant chez les patients SDRA est relative à une inhibition non-stœchiométrique des SP avec d'autres protéines infiltrées (protéine du plasma, composant thrombogénique) au niveau de la lumière intra alvéolaire suite

à une diminution de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (32). De plus, les niveaux de SP-A et SP-B sont largement diminués dans les BALs de patients SDRA (32). L'administration de surfactant exogène chez les patients SDRA permet de rétablir temporairement une stabilité pulmonaire en améliorant le niveau d'oxygénation mais n'a pas d'impact bénéfique sur le taux de survie (32).

La localisation, le rôle et la proportion des différents types de lipides et de protéines composant le surfactant sont détaillés dans le tableau suivant.

| Phospholipides | | | ≈ 80-85% |
|---|--|---|-----------------------|
| | Localisation | Rôle | % <i>masse totale</i> |
| Phosphatidylcholine - DPPC, ≈ 50% - P.c. Insaturés | Constituant de la membrane plasmique | - Réduction de la tension de surface | ≈ 60-70% |
| Phosphatidylglycérol | Constituant de la membrane plasmique. Présent au stade fœtal | - Stabilité alvéolaire (étalement du matériel tensioactif à l'interface du film air-liquide) - Immunité innée | ≈ 7-15 % |
| Autres - P. inositol - P. ethanolamine - P. serine | Constituant de la membrane plasmique | - Aucune évidence notable. Toujours à l'étude | ≈ 5 % |
| Protéines | | | ≈ 10% |
| SP-A | ATII Glande muqueuse trachéal | - Immunité innée - Formation structure myéline tubulaire - Régulation inhibitrice de la sécrétion du surfactant par les ATII | ≈ 5-6% |
| SP-B | ATII Cellules de Club | - Essentiel pour la fonction du surfactant et l'activité respiratoire - Formation structure myéline tubulaire - Organisation/biogénèse des phospholipides dans les CL - Absorption du surfactant à l'interface air-liquide | ≈ 1% |
| SP-C | Unique aux ATII | - Régulation du recyclage du surfactant - Organisation phospholipides dans les CL - Absorption du surfactant à l'interface du film air-liquide | ≈ 1% |
| SP-D | ATII Cellules Clubs C. bronchique non-ciliées | - Immunité innée - Clairance des cellules apoptotiques/surfactant par le macrophage | ≈ 0,5% |
| Lipides neutres (ex. cholestérol) | | | ≈ 5-10% |

Tableau 1. – Caractéristiques des composantes du surfactant pulmonaire

1.2.1.2.2 Biogenèse, régulation et recyclage du surfactant

La respiration engendre un cycle continu de compression-expansion des alvéoles qui expose perpétuellement les alvéoles aux agresseurs externes inhalés et stimule le renouvellement du surfactant. En effet, Wright and Dobbs (45) ont estimé que 10 à 20 % de la totalité du surfactant

est sécrété chaque heure. Au départ, les phospholipides et les SP sont synthétisés *de novo* par le réticulum endoplasmique (RE) des ATII (46). Les protéines subissent des modifications post-traductionnelles à partir du RE jusqu'à leur réorganisation en corps lamellaires (CL). Des phénomènes tels que l'étirement cellulaire lié à l'inspiration provoquent alors une entrée intracellulaire de calcium qui sera responsable de l'exocytose des CLs (26). Une fois sécrété à la lumière alvéolaire, le surfactant subit des changements structuraux (formation en myéline tubulaire) et compose de larges agrégats actifs (LAs), qui ont une meilleure propriété de diffusion du complexe protéine-lipide à travers l'hypophase ainsi qu'une meilleure absorption des phospholipides au film présent à l'interface air-liquide (32,34). Ces LAs servent aussi de réservoir au niveau de l'hypophase. Lorsque le film phospholipidique subit une forte compression, conséquence physique de l'expiration, les molécules non tensio-actives sont expulsées du film et se regroupent pour former de petits agrégats (SAs) (47). De ceux-ci, environ 85% sont récupérés par les ATII tandis qu'environ 15% sont directement digérés par les macrophages alvéolaires ou excrétés vers les voies supérieures (48). L'endocytose du surfactant est médiée par des vésicules de clathrine puis elles sont acheminées vers des endosomes. Près de 50% de ces vésicules fusionneront avec des corps multivésiculaires (précurseurs des CLs) dans le but de recycler le surfactant et de le combiner avec des composantes *de novo*. L'autre moitié, correspondant au surfactant endommagé, sera catabolisée par des lysosomes (41).

En résumé, la fonction de barrière physique de l'épithélium alvéolaire est majoritairement permise grâce à la cohésion des cellules par les différents types de jonctions et à la protection des alvéoles par le surfactant, pour assurer le bon fonctionnement de l'épithélium alvéolaire.

1.2.2 Transport des fluides et des ions

L'homéostasie liquidienne est régulée grâce à la multitude de canaux, transporteurs et pompes ioniques qui engendrent des forces électrostatiques et hydrostatiques déplaçant les ions et les liquides à travers l'épithélium alvéolaire afin d'en préserver l'équilibre.

1.2.2.1 Mouvement liquidien

1.2.2.1.1 Homéostasie liquidienne du fœtus à l'adulte

Les mécanismes de transport des ions et des fluides s'adaptent selon le stade de développement des poumons et/ou en réponse à un déséquilibre. Le passage d'un environnement aqueux à aérobique à la naissance est une adaptation cruciale à laquelle les poumons se préparent. Un fœtus de 24 semaines présente un système respiratoire bien développé et potentiellement viable, mais son alvéolarisation ne débutera pas avant la 36^e semaine et sa maturation se poursuivra plusieurs années après la naissance (49). Les premières observations de Preyer (51), datant de 1885, notent que le poumon fœtal est rempli de liquide. Il a longtemps été assumé qu'il s'agissait de liquide amniotique inhalé, mais plusieurs études vers les années 1940 ont démenti cette première hypothèse. En effet, il a été démontré qu'à la suite d'une sténose des voies respiratoires (51,52), les poumons tendaient plutôt à se distancer et présenter un plus grand volume liquidien. De plus, l'analyse de la composition ionique de ce liquide pulmonaire confirme qu'il est uniforme à travers le système respiratoire, mais diffère de celle du plasma ou du liquide amniotique (53). Ces observations appuient alors l'hypothèse que le liquide pulmonaire est produit *in situ* et que sa sécrétion vers la lumière s'effectue par le transport actif via les cellules épithéliales ciliées, les cellules Clubs et les pneumocytes de type I et II (54,55). Par la suite, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier quels canaux/transporteurs/pompes étaient impliqués dans le mécanisme de sécrétion du liquide pulmonaire fœtal. L'utilisation de divers modulateurs pharmacologiques a permis de comprendre les forces électrochimiques et hydrostatiques présentes à ce stade du développement fœtal (voir **Figure 5**). En résumé, l'entrée de 3 Na⁺ en échange de 2 K⁺ par la pompe Na⁺/K⁺-ATPase à la membrane basolatérale produit une différence de gradient chimique entre le milieu intra- et extracellulaire. En sécrétant les ions K⁺, les canaux potassiques (K⁺) basolatéraux vont permettre de conserver un gradient électrochimique intracellulaire en maintenant un potentiel de -40 mV. Ceci va favoriser l'entrée d'autres ions Na⁺ par le canal épithélial sodique (ENaC), le cotransporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC) ou les échangeurs Na⁺/H⁺ (NHE) et Cl⁻/HCO₃⁻ (AE2). Les ions chlorures (Cl⁻) qui pénètrent dans la cellule seront ensuite sécrétés vers le milieu extracellulaire au pôle apical, principalement par le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). La lumière alvéolaire alors

chargée négativement attire les ions sodium (Na^+) par la voie paracellulaire puisque son milieu extracellulaire est plus concentré qu'en intracellulaire. Ceci contribue au gradient osmotique adéquat pour entraîner la sécrétion des fluides *via* la voie transcellulaire, par les canaux aquaporines (AQP) (56–58).

Le co-transporteur NKCC est modulé par des médiateurs internes (facteurs de croissance, prostaglandines) qui régulent à la hausse le phénomène de sécrétion par le Cl^- . Son inactivation est possible par l'agent pharmacologique bumétamide. (59–61).

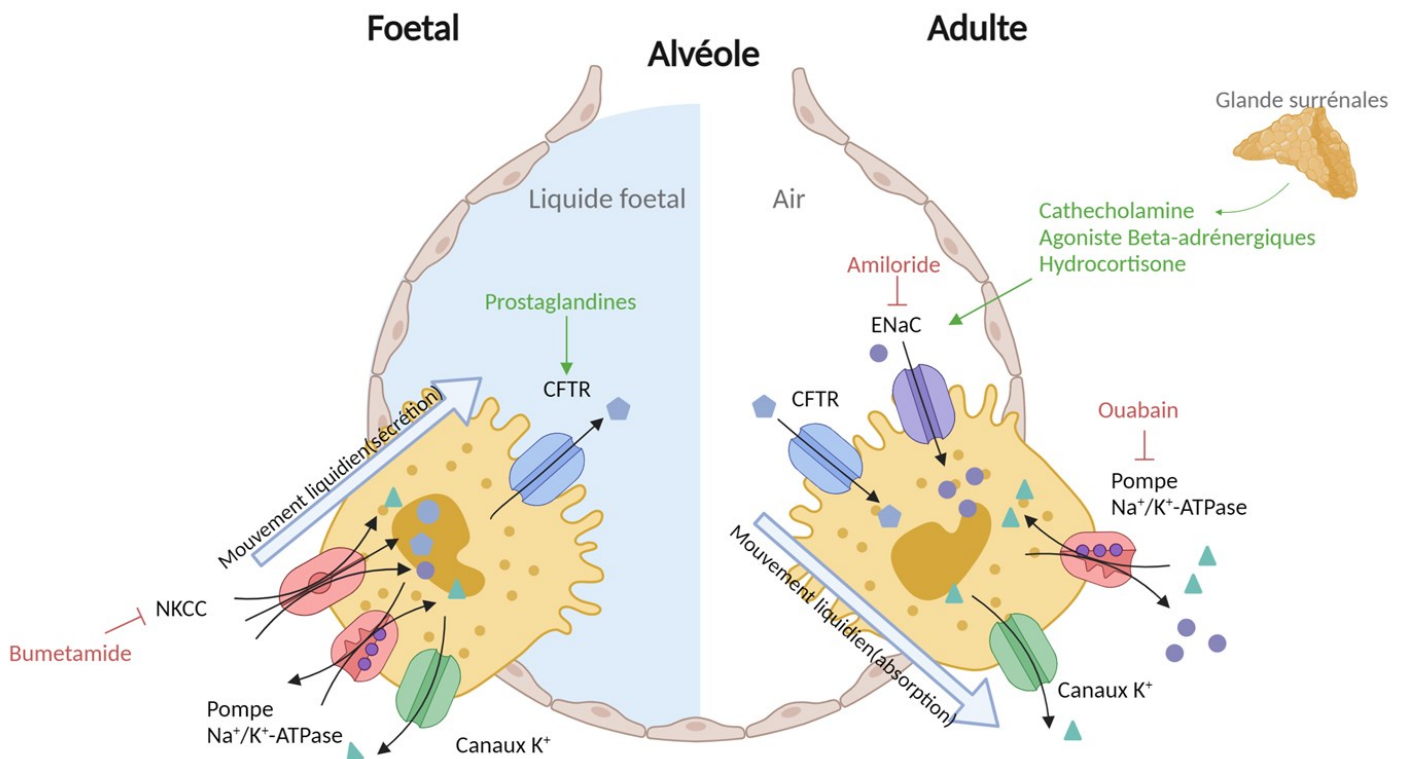


Figure 5. – Transport ionique et liquidien dans le poumon fœtal et adulte

Direction des ions et des fluides et la régulation (activation et inhibition) des différents canaux/transporteurs ioniques au niveau de l'alvéole fœtale ou adulte. Créé avec BioRender.com

Cet épithélium de sécrétion permet d'exercer, par le volume croissant de liquide dans la lumière et le blocage provoqué par les cordes vocales, une pression positive permettant aux poumons de se distendre et ainsi favoriser sa croissance et son développement normal (57,62). Au troisième trimestre, on estime le volume pulmonaire à environ 30 mL/kg de poids corporel, ce qui

correspond à la capacité résiduelle fonctionnelle d'un poumon humain à la naissance (63). Il est primordial pour le développement du poumon d'atteindre cette pression intrapulmonaire, car sinon le fœtus pourrait présenter des troubles reliés au diaphragme, des malformations squelettiques ou musculaires. L'hypoplasie du poumon avec une réduction des embranchements de l'arbre bronchique et du développement du lit capillaire pourrait également compromettre sa capacité d'échange gazeux (58).

Au stade prénatal jusqu'à l'accouchement, le poumon se prépare à faire une transition d'un épithélium de sécrétion chlorique à un épithélium d'absorption sodique. Déjà, quelques jours avant le début du travail, on note un ralentissement de la sécrétion liquidienne résultant d'une diminution du volume pulmonaire (64–66) afin de réduire la charge liquidienne à réabsorber à la naissance. Ce phénomène est principalement expliqué par des changements hormonaux survenant en parallèle à l'augmentation de l'expression des récepteurs beta-adrénergiques présents dans les tissus pulmonaires fœtaux à un stade avancé de la gestation (67). Des études *in vivo* ont démontré que l'administration d'épinéphrine (catécholamines) ou d'isoprotérénol (agoniste des récepteurs β -adrénergiques) déclenchait le mécanisme de réabsorption liquidienne. Cet effet est renversé par le propranolol (β -bloquants non sélectifs) ou l'amiloride (inhibiteur sélectif du canal sodique ENaC) indiquant l'implication du transport de Na^+ dans la régulation de la réabsorption liquidienne (68,69). Par la suite, l'impact de plusieurs autres hormones (voir **Figure 5**) sur le phénomène d'absorption liquidienne a également été recensé soit la triiodothyronine (T3, hormone thyroïdienne), l'hydrocortisone, la combinaison de terbutaline (agoniste des récepteurs β_2 -adrénergique) et d'aminophylline (inhibiteur de phosphodiesterase) ou l'arginine vasopressine par exemple (57). Durant la période prénatale, on note que l'augmentation de l'expression d'ARNm de la sous-unité α ENaC dans les voies aériennes suit la hausse du niveau de cortisol (70). L'entrée massive de Na^+ intracellulaire entraîne alors une hausse de l'expression de Na^+/K^+ -ATPase à la membrane, en plus d'augmenter son niveau d'activité (71,72). Des études *in vitro*, menées en chambre de Ussing sur des cultures de cellules alvéolaires, ont permis de comprendre que le courant Na^+ est régulé à la hausse par les β -adrénergiques mais bloqué par l'amiloride (canal ENaC) et l'ouabaine (pompe Na^+/K^+ -ATPase, voir **Figure 5**) (54,73,74). Ces observations ont permis de comprendre que les ATI et ATII, munies de

ces canaux/pompes à leurs membranes, sont alors responsables de la réabsorption liquidienne alvéolaire. Ce phénomène est essentiel, car si le liquide fœtal n'est pas adéquatement réabsorbé au moment de la naissance, le nouveau-né pourrait présenter un syndrome de détresse respiratoire néonatal (56). L'importance du canal ENaC dans ce phénomène a été confirmée par la létalité des souris α ENaC-KO à la naissance à cause de l'incapacité des souriceaux à résorber le liquide pulmonaire (75). Les souris β ENaC-KO présentent un phénotype similaire au pseudohypoaldostérisme type 1 (PHA1), une condition héréditaire rare chez l'humain, qui est caractérisée par une hyperkaliémie, une hyponatrémie, et des niveaux d'aldostérone sanguins élevés, soit principalement dû à une atteinte rénale (76). La déficience de la sous-unité β ENaC n'a induit aucune défaillance respiratoire majeure chez les souriceaux en période postnatale, ce qui suggère qu'il ne soit pas essentiel à la transition du poumon fœtal de type sécrétoire vers le type d'absorption (76).

Le transport des ions et des fluides par un épithélium alvéolaire d'absorption est essentiel afin de maintenir les alvéoles dans un environnement presque totalement exempt de liquide, afin de permettre les échanges gazeux dans le poumon intact, chez l'enfant et l'adulte (voir **Figure 5**) ou dans des conditions pathologiques entraînant un œdème pulmonaire à la suite d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) par exemple (voir section 1.3.2). Le gradient électrochimique généré par l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, soit la sortie des ions Na^+ et l'entrée des ions K^+ à la membrane basolatérale, fait en sorte de garder la concentration intracellulaire de Na^+ constamment basse. Le canal ENaC cherche alors à compenser cette fuite par l'entrée de Na^+ du côté apical. Le liquide intra-alvéolaire suivra alors ce gradient osmotique et sera réabsorbé par la voie cellulaire (i.e aquaporines) et paracellulaire. Les canaux chlorure tels que CFTR, le cotransporteur NKCC et les échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sont également présents dans l'épithélium alvéolaire. Le mouvement des ions chlorures (Cl^-) est inversé à celui retrouvé au niveau du poumon fœtal, c'est-à-dire que l'entrée des ions Cl^- est principalement médié par CFTR au niveau apical. L'implication de CFTR dans l'homéostasie liquidienne alvéolaire a été constatée par différentes études (77,78), toutefois le rôle du cotransporteur NKCC ou de l'échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ semble être de maintenir l'électroneutralité ou le pH (79). Les canaux K^+ , principalement ceux situés en basolatéral, jouent toujours un rôle important de maintien du potentiel membranaire

afin de garder la force motrice du mouvement sodique, et secondairement du déplacement liquidien (79).

Ce système permet de conserver une épaisseur fonctionnelle du fluide alvéolaire, lieu de résidence des macrophages alvéolaires et des agents tensio-actifs qui assurent une compliance pulmonaire propice aux échanges gazeux efficaces.

1.2.2.1.2 Canaux aquaporines

Outre l'adaptation du poumon à un environnement aérobie, le transport des fluides est un mécanisme primordial au maintien de divers processus biologiques de nombreux organes. Depuis leur découverte à la fin des années 1980-début 1990, environ 300 canaux aquaporines (AQPs) ont été recensés au niveau des organismes procaryotes et eucaryotes (80). Chez l'humain, treize isoformes ont été découvertes, certaines d'entre elles sont exclusivement perméables à l'eau (types « classiques ») alors que d'autres sont également perméables à l'ammoniaque, l'urée ou le glycérol (types « aquaglyceroporines »). La distribution tissulaire éparsée des canaux AQPs fait en sorte qu'ils participent à plusieurs processus tels que la concentration de l'urine (rein : AQP1-2-3-4), la production de salive (épithélium glandulaire : AQP5), le maintien du liquide de surface des voies respiratoires (AQP3-4-5, (81)), l'accumulation de gras (adipocyte : AQP7) ou la migration cellulaire par exemple (77). L'implication des AQPs dans les structures nommées protrusions, créées au front des cellules en migration, s'effectue par des changements de volume cellulaire, le transport des fluides ainsi que la génération d'un gradient osmotique adéquat qui engendre ensuite des modifications du cytosquelette permettant à la cellule d'avancer (82). Le rôle des AQPs dans le processus de migration cellulaire pourrait être d'intérêt dans le mécanisme de réparation épithéliale, une étape importante dans la résolution du SDRA.

Au niveau du système respiratoire, quatre isoformes sont présentes. L'AQP1 est exprimée au niveau de l'endothélium microvasculaire, l'AQP3 au niveau basolatéral des cellules épithéliales basales (nasale, bronchique, et bronchiolaire) et des ATII (alvéolaire)), l'AQP4 à la membrane basolatérale des cellules cylindriques ciliées (bronches, trachée et nasopharynx) puis l'AQP5 au niveau apical des ATI et des cellules épithéliales acineuses des glandes sous-muqueuses (81,83). Les techniques combinées de séquençage à cellule unique et d'immunofluorescence utilisées

dans l'étude de Horie *et al.* (84) a permis de valider l'AQP5 comme un marqueur cellulaire afin de distinguer les ATI des ATII.

L'implication des AQPs a le plus souvent été étudiée grâce à des études phénotypiques de souris knockout (KO) pour l'aquaporine d'intérêt. Il a d'abord été montré que la délétion simultanée des AQP3 et AQP4 n'a eu que peu d'impact sur l'épaisseur et la composition du liquide de surface des voies respiratoires ainsi que l'absorption liquidienne iso-osmolaire (85).

D'autre part, il a été démontré que l'expression de l'AQP1 est détectable au niveau du poumon foetal tout juste avant la naissance et que son expression s'amplifie en période périnatale jusqu'à l'âge adulte (86). À cette même période, on note une augmentation de la perméabilité liquidienne *in situ* (87). L'AQP5 est faiblement exprimée à la naissance, mais celle-ci augmente graduellement jusqu'à l'âge adulte contrairement à l'AQP4 qui, quant à elle, est fortement exprimée dès la naissance (80). Bien que la délétion de l'AQP1 ou AQP5 entraîne une diminution de 10 fois (ou 30 fois suite à leur délétion combinée) de l'indice de perméabilité osmotique au niveau de la barrière alvéolo-capillaire (87), la délétion de ces AQPs n'a pas eu d'impact sur le phénomène de clairance liquidienne en période périnatale ou à l'âge adulte (88,89). De plus, l'absorption liquidienne stimulée par les agonistes β -adrénergiques ou les facteurs de croissance n'est pas affectée par la délétion de ces AQPs (89). Il n'y a qu'au niveau des glandes sous-muqueuses que la sécrétion induite par la pilocarpine fut diminuée par 2 fois chez les souris AQP5-KO (90).

L'expression des AQP4 et -5 a également été évaluée dans des modèles murins d'atteintes pulmonaires aiguës (ALI : acute lung injury) dans une étude de Vassiliou *et al.* (91). Le modèle principalement inflammatoire (par instillation de lipopolysaccharide (LPS)) présente une diminution de l'expression d'AQP5 tandis que dans les modèles d'instillation au chlorure d'hydrogène (HCl) ou par dommages induits par ventilation mécanique (VILI), on note plutôt une diminution de l'AQP4. Ces observations sont cohérentes avec d'autres études démontrant une diminution d'AQP5 à la suite d'une exposition de TNF- α *in vitro* (92) ou suivant l'administration de bléomycine, un composé pouvant mimer plusieurs aspects de la phase aiguë du SDRA (93). Ainsi, à ce jour, le rôle des aquaporines est toujours controversé et leur régulation semble

dépendante des conditions physiologiques ou pathologiques, en particulier du type d'atteinte pulmonaire induite dans les modèles animaux utilisés.

1.2.2.2 Transport sodique

Le transport sodique est étroitement relié à celui des fluides. Tel que mentionné précédemment (**Figure 5**), le transport transépithélial des ions Na^+ dépend du gradient électrochimique engendré par l'action coordonnée de la pompe Na^+/K^+ -ATPase et des canaux K^+ basolatéraux ainsi que de l'entrée de Na^+ par le canal ENaC en apical. Cette absorption sodique entraîne secondairement celle des fluides au travers de l'épithélium alvéolaire.

1.2.2.2.1 Canal épithélial sodique (ENaC)

Localisation, structure et fonction

Le canal ENaC est présent dans une multitude de tissus, entre autres dans les reins, le colon, le placenta, les trompes de Fallope, la prostate, les glandes salivaires, la peau et les poumons (94). En 1982, Mason *et al.* (73) utilisent une culture primaire d'ATII de rats polarisée sur filtres afin de mesurer les différences de potentiels transépithéliaux en chambre de Ussing et ont pu ainsi observer que l'ajout d'amiloride du côté basolatéral n'entraîne qu'une faible diminution de potentiel, tandis que la différence de potentiel atteint zéro lorsque l'amiloride est appliquée du côté apical. Au contraire, l'ouabaine a un effet majeur, lorsqu'ajouté en basolatéral, sans toutefois abolir complètement le potentiel. Il a fallu plusieurs années avant de découvrir par technique d'immunohistochimie/microscopie que les ATI expriment également ENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase à leurs membranes (95). De plus, l'absorption de Na^+ est inhibée à 30% par l'amiloride dans les cellules ATI, sensiblement la même proportion que dans les ATII. Ces évidences ont donc permis de comprendre le rôle important de ces deux types de cellules alvéolaires dans le transport sodique actif (96).

Le canal sodique ENaC fait partie de la superfamille des canaux ioniques ENaC/DEG (degenerin) en raison de leur forte homologie de séquence (94). Bien que les domaines structuraux soient similaires, leurs fonctions biologiques sont différentes (ex. nociception au niveau du système nerveux, homéostasie des fluides) et présentes chez une vaste diversité d'espèces. Chez l'humain,

4 gènes (*SCNN1-4*) codent pour les quatre sous-unités (α , β , γ et δ) composant le canal ENaC (97,98). Chacune de ces sous-unités est composée de deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), des domaines amino- (N) et carboxy- (C) terminaux situés au côté cytoplasmique et d'un grand domaine extracellulaire (voir **Figure 6**). Le domaine N-terminal (chez les sous-unités β et γ) présente une séquence correspondant aux sites récepteurs PIP₂ (99) tandis que le C-terminal possède le site récepteur PIP₃ (aussi sur les sous-unités β et γ (100)). Il existe aussi des sites d'interactions pour les constituants du cytosquelette (ex. F-actine chez la sous-unité α (101)). De plus, une séquence hautement conservée (sous-unités α , β , γ), le motif PY, reconnu par la protéine Nedd-2-4 est responsable de l'ubiquitination/dégradation du canal ENaC (102,103). Le segment extracellulaire correspond également à un domaine régulateur comprenant des sites de clivages par les protéases (ex. furine, sous-unités α et γ (94)), des sites riches en cystéine responsable d'acheminer ENaC à la surface membranaire ainsi que des sites riches en histidine et/ou cystéine qui sont déterminants dans la régulation de l'auto-inhibition d'ENaC (104–106). Le phénomène d'auto-inhibition consiste en une diminution de l'activité d'ENaC par le Na⁺ extracellulaire qui est différent du *feedback-inhibition* produit par l'augmentation de Na⁺ intracellulaire (105). Le domaine TM1 est particulièrement important dans l'ancrage du canal à la membrane tandis que TM2 forme la porte du canal et joue donc un rôle dans la sélectivité ionique et la conductance. De plus, TM2 présente le site récepteur à l'amiloride (94) (**Figure 6**).

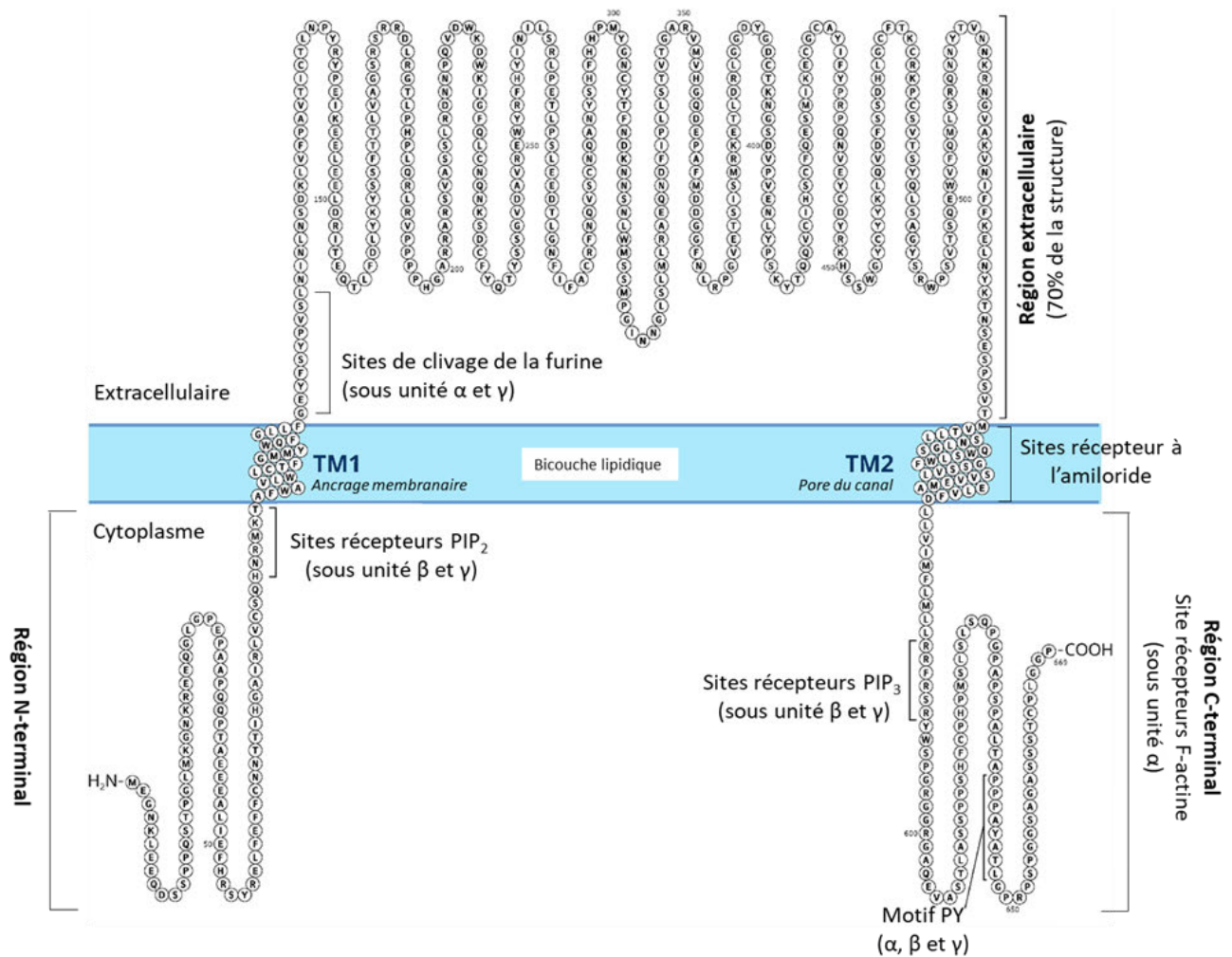


Figure 6. – Structure moléculaire du canal ENaC

Schématisation des différentes régions et de leur rôle ainsi que des sites actifs du canal sodique ENaC nécessaires à sa fonction. Adapté de Hanukoglu et Hanugoglu, 2016 (94).

La pertinence de chacune de ces sous-unités dans la fonction du canal ENaC fut étudiée chez des ovocytes de *Xenopus laevis* injectés avec les ARNs correspondants aux sous-unités α , β , et γ de ENaC de façon individuelle ou en combinaison multiple. Il a été démontré que la sous-unité α est capable de former un canal fonctionnel de façon autonome contrairement aux sous-unités β ou γ . Cependant, le courant amiloride-sensible atteint son plein potentiel dans les ovocytes exprimant les trois sous-unités α , β , γ , avec un courant 100 fois plus fort qu'avec la sous-unité α ENaC seule (98). La sous-unité δ permet un faible courant amiloride-sensible dans les ovocytes et présente une forte homologie de séquence avec la sous-unité α (97). Quelques différences sont

toutefois notées dans la sélectivité du canal, comparativement aux autres sous-unités, mais son rôle biologique est toujours sujet à l'étude.

Le rôle physiologique de ces sous-unités a également été étudié grâce à différents modèles murins présentant une mutation génétique de perte de fonction. L'équipe de Hummler *et al.* a généré des souris α ENaC-KO dont les souriceaux sont tous décédés de détresse respiratoire en moins de 40 h après la naissance. En effet, l'index de contenu en liquide pulmonaire (ratio wet/dry lung weight) est demeuré élevé 4 et 12 h suivant la naissance, soit une période critique dans l'adaptation du poumon à la respiration aérobie. Ainsi les souris α ENaC-KO n'ont pas la capacité de résorber le liquide pulmonaire fœtal (75). La génération de souris déficientes pour la sous-unité β a démontré une légère accumulation de liquide pulmonaire (augmentation de l'index wet/dry ratio) chez les souriceaux en période postnatale sans aucun changement de la fonction respiratoire tel que présenté par l'analyse des gaz sanguins. Toutefois, les souris β ENaC-KO sont également décédées dans une fenêtre de 47 h suivant leur naissance. Leur décès est cependant attribué à une perte de fonction rénale, principalement par un état d'hyperkaliémie (76). Les souris γ ENaC-KO ont présenté un phénotype similaire (107).

La multimérisation de ces sous-unités permet la formation de deux principaux types de canaux ENaC qui ont des propriétés biophysiques distinctes. Le canal cationique non sélectif (NSC), formé uniquement par la sous-unité α , a une faible sélectivité pour le Na^+ par rapport au K^+ ainsi qu'une forte conductance monocanale (21pS). Le canal Na^+ hautement sélectif (HSC) est quant à lui composé des trois sous-unités $\alpha\beta\gamma$ ayant une sélectivité accrue pour le Na^+ , une faible conductance (6pS) ainsi qu'une constante d'inhibition (K_i) par l'amiloride beaucoup plus faible que les NSC. Malgré ces disparités, les cellules ATI et ATII possèdent une quantité équivalente des canaux NSC et HSC à leur membrane (108). Afin de mieux comprendre les caractéristiques propres à chaque type de canaux, plusieurs équipes ont entrepris des études portant sur sa stœchiométrie. Durant quelques années, le sujet était divisé par certaines études qui révélaient une conformation hétérotrimérique ($1\alpha : 1\beta : 1\gamma$ (109) ou même $3\alpha : 3\beta : 3\gamma$ (110)) ou tétramériques ($2\alpha : \beta\gamma$ (111)). La dernière étude en date de 2018, par Noreng *et al.* (112) a permis de confirmer la structure hétérotrimérique ($1\alpha : 1\beta : 1\gamma$) grâce à une nouvelle technique de cryoEM permettant une modélisation 3D.

Régulation du canal ENaC au niveau pulmonaire

Les voies de signalisation impliquées dans la régulation d'ENaC sont multiples et hétérogènes selon l'organe à l'étude. Dans cette prochaine section, nous nous intéresserons aux voies de signalisations, dépendantes de l'action d'hormones circulantes, de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ou bien de chimiokines pro-inflammatoires capables de réguler le canal ENaC au niveau du système respiratoire (**Figure 7**).

Les glucocorticoïdes sont les principales hormones circulantes au niveau des poumons. En effet, des études *in vitro* ont permis de comprendre que la voie des récepteurs glucocorticoïdes était prévalente à celle des minéralocorticoïdes, grâce à l'action de la dexaméthasone (synthétique), sur l'augmentation de l'expression des ARNs du canal ENaC. L'aldostérone (minéralocorticoïde endogène) est capable seul d'induire une augmentation de l'expression ENaC chez une lignée cellulaire, toutefois son niveau basal dans les poumons est plutôt faible (113). De plus, un prétraitement à la dexaméthasone a permis d'accélérer la clairance des fluides alvéolaires chez le rat *in vivo* (114). Ces observations pourraient être expliquées par la présence de l'élément de régulation glucocorticoïde (GRE) situé au niveau du promoteur d' α ENaC, régulant ainsi la transcription du canal (115).

L'impact de la régulation des GPCRs sur le canal ENaC fut également largement étudié. Dans la famille des récepteurs purinergiques, les récepteurs à l'adénosine 1/2 ont un effet modulateur sur l'activité d'ENaC de façon dose-dépendante. Le récepteur apical P2Y2 a une activité inhibitrice (par la voie PKC) sur ENaC tandis que P2X en basolatéral (activé par les purines), permet l'entrée de calcium et une cascade vers une hausse du transport de Na^+ (116,117).

La probabilité d'ouverture (P_o) du canal ENaC est régulée par le récepteur apical dopaminergique de type 1 (D1R) (mais non pas son isoforme D2R) (118), sans toutefois augmenter la quantité d'ENaC membranaire. Son action est bien spécifique à ENaC puisqu'en présence d'ouabaïne, la dopamine augmente toujours la P_o du canal ENaC.

Les récepteurs adrénérgiques sont aussi impliqués dans la régulation d'ENaC. En effet, l'agoniste β_2 augmente l'activité (119) et la quantité de canal à la membrane en activant la voie AMPc/PKA (120). En condition physiologique, la terbutaline (β -agoniste) augmente le courant transépithélial,

inhibé par les co-traitements en continu avec l'amiloride. L'expression génique de α -ENaC présente un pic suite à deux jours de traitement à la terbutaline sans toutefois connaître une augmentation soutenue à J4 et J6 de traitement, ce qui indique une action complémentaire nécessaire à l'amélioration du transport actif de Na^+ à plus long terme (121). Dans un modèle de transplantation unilatérale de poumon canin ayant subi une ischémie-reperfusion (I/R), la capacité de clairance liquidienne alvéolaire *ex vivo* fut réduite, et ce malgré un traitement au β -agoniste. Bien que les niveaux de récepteurs adrénergiques ($\beta 1$ et $\beta 2$) demeurent inchangés malgré l'I/R, des analyses d'expression ont révélé une diminution importante de l'expression d'ENaC (sous-unité α et β notamment). Ce défaut de résorption s'est alors traduit par une augmentation du ratio wet-to-dry chez ces animaux transplantés (122,123).

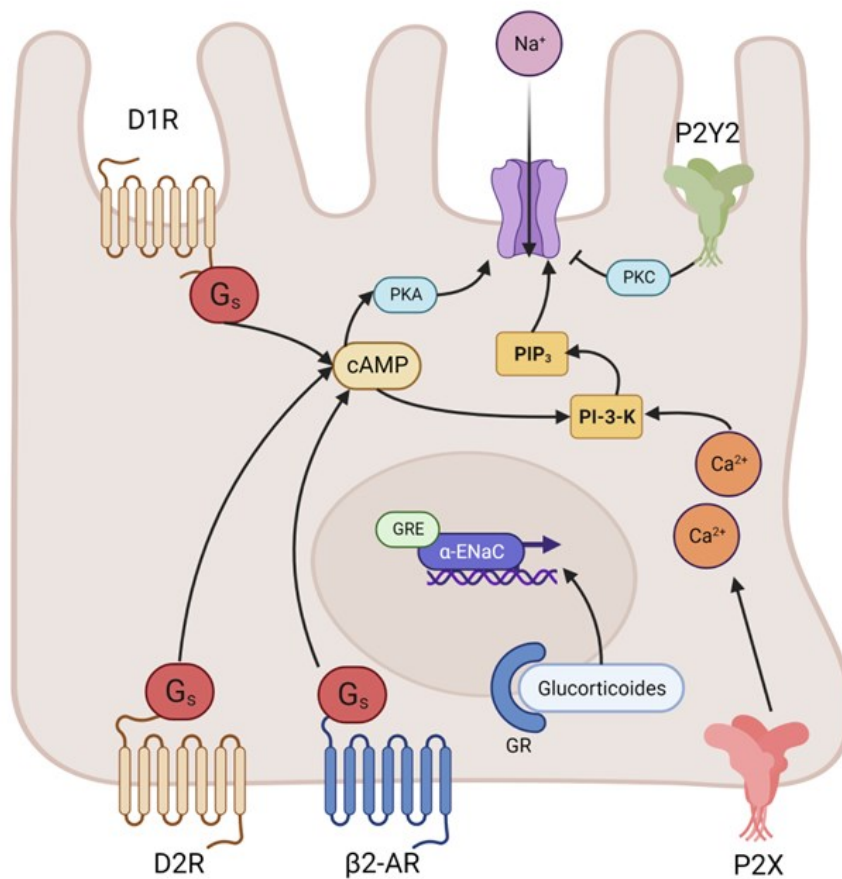


Figure 7. – Voies régulatrices du canal ENaC

Régulation du canal ENaC au niveau pulmonaire par les divers récepteurs dopaminergiques (DR), adrénergiques (AR), des glucocorticoïdes (GR) et purinergiques (P2X-Y). Inspiré de Eaton *et al.* (108). Créé avec BioRender.com

De plus, des chimiokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 β et le TGF- β sont reconnus pour induire une inhibition *via* la voie MAPK/ERK 1/2 ou par l'inactivation du GRE, qui ultimement réduisent l'expression et l'activité d'ENaC (108,124–126).

1.2.2.2 Pompe sodique Na⁺/K⁺-ATPase

Structure et conformation dynamique

Le transport actif sodique est possible grâce à une pompe ionique régulée par l'ATP ou dite -ATPase. Il en existe trois classes; type-F, type-V ou type-P qui se distinguent notamment par leur structure et le mécanisme de transport de leur substrat. Les pompes de type-P, dont la Na⁺/K⁺-ATPase fait partie, se caractérisent par la conformation intermédiaire induite par le transfert du phosphate (provenant de l'ATP) vers le résidu aspartate de la protéine (127).

La structure hétérodimérique de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase est formée par une sous-unité - α et - β . Chez l'humain, on recense 4 isoformes de la sous-unité - α et 3 isoformes de - β . Bien que la stœchiométrie soit toujours de 1 α :1 β , la multimérisation de ces sous-unités est spécifique au tissu et/ou au type cellulaire (voir **Tableau 2**, adapté de la référence (128)). Au niveau pulmonaire, l'expression protéique des sous-unités - α 1 et - α 2 fut détectée dans les tissus de rat (129). La présence de β 1 et β 3 a également été démontrée sur tissu ainsi que sur culture primaire de cellules alvéolaires de rat (130,131), plus précisément située du côté basolatéral des ATI et ATII, tel que mentionné plus haut (73,95).

| <u>Organe</u> | <u>Type cellulaire</u> | <u>Type de protéine exprimée</u> | <u>Organisme</u> |
|----------------|--------------------------------|--|-------------------|
| <u>Cerveau</u> | <u>Neurones/Astrocytes</u> | <u>β1, β2</u> | <u>Rat</u> |
| <u>--</u> | <u>Erythrocyte</u> | <u>α1, α3, β1, β2, β3</u> | <u>Humain</u> |
| <u>Yeux</u> | <u>Photorécepteurs</u> | <u>α3, β2, β3</u> | <u>Souris</u> |
| <u>Cœur</u> | <u>Cardiomyocytes</u> | <u>α1, α2, β1, β2, β3</u> | <u>Rat/souris</u> |
| <u>Poumon</u> | <u>Tissu entier/Alvéolaire</u> | <u>α1, α2, β1, β3</u> | <u>Rat</u> |

Tableau 2. – Répartition tissulaire et cellulaire des différentes sous-unités formant la pompe Na⁺/K⁺-ATPase exprimées chez divers organismes.

La structure de la sous-unité α comporte 10 segments transmembranaires, 5 boucles extracellulaires de faible dimension dont celle entre TM7 et TM8 constituant le point d'ancrage de la sous-unité β (132). Les segments N- et C-terminaux ainsi que 4 boucles de grandes tailles sont observés du côté intracellulaire. La disposition intracellulaire permet la formation du domaine de liaison du nucléotide et de phosphorylation (boucle TM4-TM5(133)) ainsi que du domaine dit actionnaire (entre les boucles TM2-TM3 et le N-terminal (134)). Ces derniers sont importants dans le mouvement de l'hélice α permettant le changement de configuration de la pompe Na^+/K^+ -ATPase lorsqu'un échange $3 \text{Na}^+/2 \text{K}^+$ a lieu. Cette sous-unité est donc responsable du transport ionique, du mécanisme catalytique par l'ATP et présente également le site d'inhibition par l'ouabaïne (134).

La sous-unité β est structurellement moins imposante; avec un seul segment transmembranaire, le N-terminal est de faible longueur du côté intracellulaire tandis qu'un imposant segment se trouve du côté du C-terminal. Ce dernier segment extracellulaire détient 3 ponts disulfures ainsi que 3 sites de glycosylation. Des études ont permis de démontrer que cette structure permettrait de conserver une activité enzymatique adéquate, c'est-à-dire de jouer un rôle dans la sélectivité et l'occlusion ionique, l'acheminement, l'insertion membranaire, la stabilité, en plus d'éviter la dégradation rapide de la sous-unité α (127,135,136). Toutefois, l'expression de la sous-unité $-\alpha$ ou $-\beta$ uniquement, par transfection d'ADNc dans la levure *S. cerevisiae* ne permet pas de développer d'activité enzymatique, indiquant que leur combinaison est essentielle à sa fonctionnalité (137).

La pompe Na^+/K^+ -ATPase présente deux états de conformation dynamique. La conformation de base nommée E1 a une forte affinité pour les ions Na^+ et l'ATP en plus d'exposer l'ouverture de son site de liaison vers le côté intracellulaire. Une fois que les 3 ions Na^+ y sont liés, il y a phosphorylation par l'ATP au niveau du résidu aspartate de la pompe. Ce transfert d'énergie initie un mouvement des trois domaines et de l'hélice alpha qui convertit la protéine vers sa conformation E2. Sous la conformation E2, la pompe Na^+/K^+ -ATPase a une affinité plus élevée pour le K^+ que le Na^+ et donc les ions Na^+ s'échappent du côté extracellulaire pour laisser leur place à deux ions K^+ . Par la suite, sous E2, il y a hydrolyse du phosphate qui provoque alors un retour vers la conformation E1 permettant au cycle de se répéter (124,131,135).

Régulation de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase au niveau pulmonaire

Plusieurs évidences suggèrent une régulation possible de la Na⁺/K⁺-ATPase par des hormones circulantes, des hormones peptidiques ou par les GPCRs selon l'organe et les sous-unités impliquées. Toutefois, la régulation de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase au niveau pulmonaire est similaire à celle du canal ENaC à l'exception de la régulation par la concentration des substrats intracellulaires (Na⁺ et ATP) et des glycosides cardiaques endogènes (ECG).

Une étude menée sur des cultures primaires d'ATII de rats a permis de comprendre les effets des traitements à court et long termes d'un agoniste β -adrénergique, la terbutaline, sur la régulation de la pompe. Les résultats démontrent une augmentation significative dans l'expression génique suite à deux jours de traitement (effet renversé par la compétition avec un β -bloquant) et protéique après une exposition chronique de sept jours. Une hausse de l'activité de Na⁺/K⁺-ATPase survient également à partir de J2 et pourrait être expliquée *via* l'augmentation en 24 h de l'activité de la PKA par la terbutaline (118). Une autre étude a montré qu'une catécholamine agissant *via* l'activation de récepteurs β -adrénergiques, a quant à elle entraîné une augmentation de l'activité de la pompe suite à une hausse de la sous-unité α à la membrane de cellules primaires d'ATII. Cette rapide régulation provient d'un cycle de recyclage et de réacheminement des produits contenus dans les endosomes vers la membrane (139). Toutefois, dans un modèle de rats soumis à un protocole de ventilation mécanique par volume courant élevé, une meilleure clairance de l'œdème pulmonaire fut observée suite au traitement aigu à l'isoproterenol, sans toutefois avoir un impact sur l'expression des ARNm des sous-unités α 1 et β 1, indiquant un mécanisme complémentaire à l'amélioration de la résorption liquidienne dans ce modèle (140).

De façon similaire à l'étude de Saldias *et al.* décrite ci-haut, l'administration de dopamine permet d'améliorer la clairance liquidienne d'environ 60% chez les rats non ventilés puis de 200% chez les rats ventilés par volume courant élevé. La dopamine augmente l'activité de Na⁺/K⁺-ATPase *in vitro* sans toutefois modifier son expression protéique, un effet complètement renversé par l'ouabaïne (141). À l'inverse, un modèle de transplantation pulmonaire canin n'a pas montré de changement d'expression des ARNm correspondant aux sous-unités α 1 et β 1 de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase, malgré un défaut de la clairance liquidienne alvéolaire (122).

La constante K_m , soit la concentration intracellulaire de Na^+ nécessaire afin que la réaction enzymatique de la pompe ionique soit à la moitié de sa vitesse de réaction maximale, est d'environ 10-40mM, qui correspond environ à sa concentration intracellulaire à l'état d'équilibre (142). La pompe Na^+/K^+ -ATPase est sensible au moindre changement de concentration de Na^+ afin de rétablir son équilibre. De plus, les niveaux d'ATP requis (environ 300-800mM) sont suffisants dans la plupart des cellules et ne constituent donc pas un facteur limitant l'activité de Na^+/K^+ -ATPase (142). Toutefois, lorsque des cellules sont exposées à des conditions d'hypoxie (5% d' O_2), on observe une diminution de 25% du contenu cellulaire en ATP. Pourtant, aucun changement dans le courant sensible à l'ouabaïne dans les cellules alvéolaires n'a été observé (143). Un tableau résumé dans la revue de Hardiman et Matalon, des expériences entreprises *in vitro* et *in vivo* met en lumière que dans trois protocoles différents de condition d'hypoxie chez le rat (entre 3-10% d' O_2), on observe une diminution de la clairance liquidienne alvéolaire, de l'expression ou de l'activité de Na^+/K^+ -ATPase (144). En revanche, ces études n'expliquent pas si ce défaut implique ou non des changements de concentration d'ATP.

Les glycosides cardiaques endogènes (ouabaïne et digoxine) agissent en tant qu'inhibiteurs de la Na^+/K^+ -ATPase, cependant leur concentration nécessaire à cette action est beaucoup plus élevée que leur concentration physiologique (127). Il s'agit d'un aspect limitant pour étudier l'impact de l'inhibition de la pompe ionique par l'ouabaïne *in vivo* puisque cette drogue induit une toxicité cardiaque chez l'animal, c'est pourquoi les modèles *in vitro* ou *ex vivo* sont souvent priorités.

En résumé, le poumon foetal ou adulte n'a pas les mêmes nécessités en ce qui concerne le transport des ions et des fluides, toutefois l'épithélium pulmonaire a cette capacité de s'adapter aux changements. Le contrôle du transport sodique par les aquaporines, le canal ENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase est donc essentiel pour préserver une fonction pulmonaire adéquate.

1.2.2.3 Transport potassique

Les canaux potassiques (K^+) sont une classe de canaux ioniques très diversifiée participant à une multitude de réponses biologiques. Ce qui les distingue des autres canaux ioniques est leur filtre de sélectivité, au niveau de la région du pore du canal, hautement perméable aux ions K^+ grâce à la séquence hautement conservée T-I/V-G-Y/F-G (145). La structure générale des canaux K^+

consiste en sous-unités α regroupées en complexe multimérique renfermant le pore, généralement accompagnées d'une ou plusieurs sous-unités β (ou sous-unité auxiliaire) responsables de la stabilité et du mécanisme de régulation du canal. Quatre sous-unités α identiques ou différentes se rassemblent pour former des structures de nature homo- ou hétéro-tétramériques (145).

À ce jour, environ 100 gènes humains codant pour des canaux K^+ ont été découverts (146). En plus du nombre élevé de gènes codants, l'imposante variété des canaux K^+ pourrait s'expliquer par les processus de régulation auxquels ils sont soumis tels que l'épissage alternatif, les multiples possibilités de combinaison des sous-unités ainsi que les modifications post-translationnelles (147). Les spécificités propres à chaque canal K^+ leur permettent de participer à divers mécanismes physiologiques autant au niveau des cellules excitables que non-excitables. En effet, il a été démontré que certains canaux K^+ sont impliqués dans le transport des électrolytes et la balance des fluides (Kir1.1, épithélium rénal), la sécrétion d'insuline (K_{ATP} , cellule pancréatique β), le battement cardiaque (KvLQT1-minK, Kv1.4, Kv1.5, K_{ATP} , cardiomyocyte ventriculaire), la relâche de neurotransmetteurs (Kv1.1, IKCa1, 148) ou la migration et prolifération cellulaire (KvLQT1, cancer pulmonaire (149)). La découverte de mutations génétiques des canaux K^+ ou de leur déséquilibre fonctionnel a permis le développement de nombreux modulateurs pharmacologiques au cours des dernières années. Ils constituent un espoir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la résolution de maladies neuronales (Alzheimer, Parkinson), cardiaques (arythmies) et métaboliques (diabète mellitus, cancer) (150).

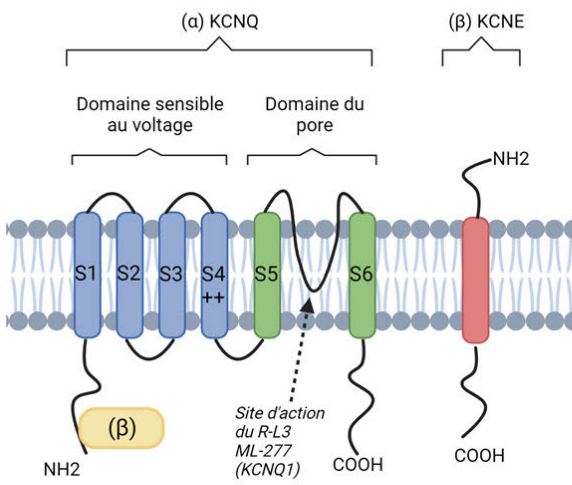
Il existe plus d'une trentaine de canaux K^+ , répartis dans les trois grandes classes décrites ci-dessous, exprimées tout du long de l'épithélium respiratoire (146). Les sous-unités α ou β ont été détectés soit à des niveaux de transcrits ARNm ou protéiques en utilisant diverses lignées (Calu-3; cellules des voies aériennes, 16HBE14o-; cellules épithéliales bronchiques, H4441; cellules épithéliales des voies distales ou A549; cellules épithéliales alvéolaires) ou cultures cellulaires primaires (cellules de la trachée, bronches ou ATII). La localisation des canaux K^+ à la surface apicale ou basolatérale a également été démontrée pour certains. À la vue de la large diversité structurale et fonctionnelle des canaux K^+ , la classification peut être faite de plusieurs façons. J'aborderai la prochaine section en divisant les canaux K^+ en trois familles selon l'architecture des

sous-unités α et en me focalisant sur l'expression de ces canaux au niveau de l'épithélium alvéolaire.

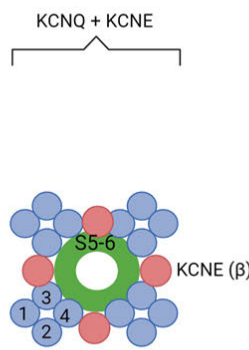
1.2.2.3.1 Canaux dépendants du voltage (Kv)

Les canaux potassiques formés par des sous-unités α de 6 domaines transmembranaires (TM) sont regroupés en deux grandes sous-classes soient les canaux voltage-dépendant (**Kv1-12**, voir **Figure 8**) ou ceux activés par le calcium (**K_{Ca}**, voir **Figure 10**)(145). Les canaux voltage-dépendants représentent la plus large famille des canaux K⁺ avec 40 gènes codant chez l'humain (151). Sa conformation en hélice contient un seul pore formé par les segments S5-S6. Le domaine sensible au voltage correspond aux segments S1-S4 et communique directement le potentiel membranaire (dépolérisation) au pore afin d'enclencher l'ouverture du canal par un changement de conformation (147). La sous-unité β (Kv β ou *KCNE1-5*) est simplement formée d'un seul domaine transmembranaire. Les segments extracellulaires de S5-S6 exposent le site de liaison aux toxines (152) et aux bloqueurs de K⁺ (TEA, (153)) tandis que les segments S5-S6 intracellulaires, près de la région du pore, sont sensibles aux composés tels que le 4-aminopyridine (152), un antagoniste non sélectif des canaux Kv.

**A. Structure de la sous-unité à 6 TM :
Canaux dépendants du voltage**



B. Assemblage tétramérique



C. Clones

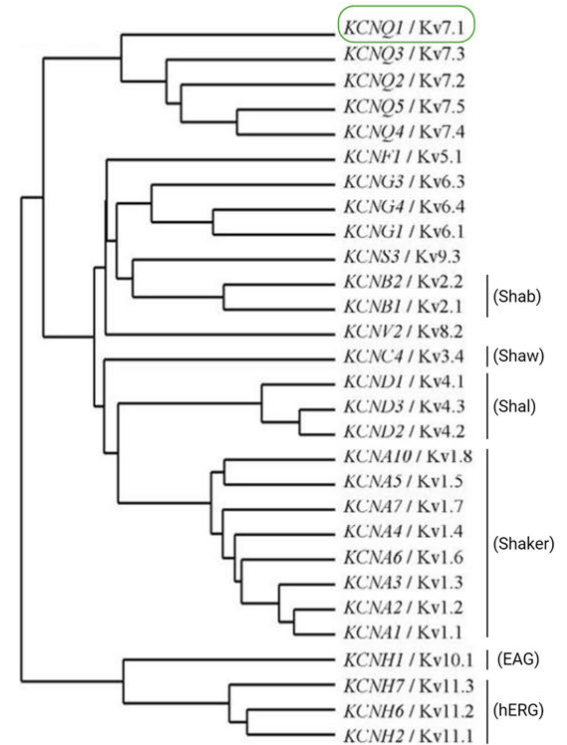


Figure 8. – Description des canaux voltage-dépendants (Kv)

La structure des sous-unités α et β caractéristique des canaux K^+ dépendants du voltage (A), l'assemblage tétramérique de ces sous-unités (B) et l'arbre phylogénique des clones des canaux Kv (C). Inspiré et adapté de Shieh *et al.*, 2000 (148) et Girault et Brochiero, 2013 (151). Créé par BioRender.com

Au niveau alvéolaire, l'expression majoritairement au pôle apical, de différents types de canaux voltage-dépendants soit Kv1.1, -1.3, -1.4, -2.2, -4.2, -4.3, -7.1, -9,3, en plus des sous-unités régulatrices KCHIP2, -3 et Kv β 1, -2 et -3, a été recensé (154,155). Toutefois, pour plusieurs d'entre eux, leur fonctionnalité reste toujours sujette à l'étude. Le KvLQT1 est le canal Kv le plus étudié dans le poumon bien qu'il fût initialement surtout documenté compte tenu de l'impact de sa dysfonction dans les arythmies cardiaques. Au niveau pulmonaire, l'expression et l'activité du Kv7.1 (KvLQT1) en apical fut tout d'abord démontré par immunohistochimie et par électrophysiologie sur monocouche de cellules Calu-3 (156) puis des évidences du laboratoire ont témoigné d'un courant potassique KvLQT1 basolatéral, mesuré en chambre de Ussing, dans des lignées de cellules bronchiques (NuLi, CuFi, (157)). Sa fonction fut également détectée en chambre de Ussing dans des cultures primaires de cellules épithéliales des voies aériennes

révélant qu'il est responsable de la majorité de la conductance potassique, soit environ 50%, du courant potassique total basolatéral (158). Étant donné son importante contribution, le KvLQT1 a été choisi comme une cible dans mon projet de doctorat et sera plus amplement discuté à la section suivante.

Le canal voltage-dépendant KvLQT1

Le canal KvLQT1 est un canal de faible conductance (entre 0,7 à 7pS, (159,160)) avec une architecture homo-tétramérique. Le rapport de sous-unités KCNE versus KCNQ est sujet à débat, cependant la plupart des hypothèses s'orientent vers un complexe 4:4 (161).

Un canal KCNQ1 (KvLQT1) lié à KCNE1 (minK) présente les propriétés d'un canal voltage-dépendant à composante lente reconnu comme le courant cardiaque I_{SK} . L'assemblage de KCNQ1 avec KCNE1 permet d'augmenter sa limite de potentiel membranaire à -20 mV (vs la limite des Kv normalement à -40 mV) et stabiliser le canal sous sa conformation ouverte (162). La mutation autosomale récessive de type perte-de-fonction du gène *KCNQ1* ou *KNCE1* est responsable du syndrome du long QT (LQTS) associé à des anomalies du rythme cardiaque telles que des arythmies, des *torsades de pointe*, la fibrillation ventriculaire ou ultimement un arrêt cardiaque (163). En effet, à la lecture d'un électrocardiogramme, on observe un allongement de la phase QT soit la période entre l'initiation de la dépolarisation ventriculaire jusqu'à la fin de sa repolarisation. Tous ces aspects ont contribué à nommer ce canal; KvLQT1 (163).

Au niveau pulmonaire, ce sont plutôt les sous-unités KCNE2 et KCNE3 qui sont fortement exprimées (164) et KCNE4 que l'on retrouve à des niveaux plus faibles (165). Chaque sous-unité confère des propriétés biophysiques distinctes au canal KCNQ1. KCNE2 (Mirp1) produit un courant K^+ de plus faible amplitude, KCNE3 (Mirp2) forme un canal constitutivement actif tandis que KCNE4 (Mirp3) et KCNE5 (KCNE1-like) ont plutôt un effet inhibiteur sur le courant KCNQ1 (163). Ceux-ci sont distribués selon leur fonction physiologique, par exemple, dans les cellules acineuses du pancréas (KCNQ1/KCNE1), les cellules pariétales de l'estomac (KCNQ1/KCNE2) ou les cellules des voies aériennes du poumon (KCNQ1/KCNE3) qui nécessitent tous la force motrice des canaux KCNQ en continu afin d'exercer leur mécanisme sécrétoire (voir **Figure 9**)(163,166). De plus, le fluide endolymphatique que l'on retrouve au niveau de l'oreille interne requiert une

concentration élevée de K^+ pour garder un bon équilibre et conserver l'ouïe. Le syndrome de Jervell and Lange-Nielsen (JLNS) est un désordre génétique de nature autosomale récessive qui engendre une perte bilatérale de l'ouïe et un mauvais équilibre, en plus des anomalies cardiaques décrites précédemment liés au LQTS (167). Dans le but d'étudier le JLNS, l'équipe du Dr. K. Pfeifer (168) a généré une lignée de souris constitutivement knock-out pour *Kcnq1* par l'insertion d'une cassette *PGK-NeomycineR* au niveau de l'exon 2 du gène. Ces animaux présentent un phénotype de shaker/waltzer qui se manifeste par une hyperactivité, le remuement constant de la tête, et le fait de courir de façon circulaire. Les analyses histologiques ont confirmé des défauts morphologiques de l'oreille interne, notamment des conduits cochléaire, semi-circulaire et de l'otolithe, normalement remplis par l'endolymphe, qui seraient alors responsables du comportement observé chez l'animal. Des tracés ECG *in vivo* ont témoigné du défaut cardiaque (LQT) chez ces souris KCNQ1-KO. À la suite d'une collaboration avec Dr. Pfeifer, qui nous a généreusement fourni les souris issues de sa lignée KCNQ1-KO, nous avons élaboré un élevage hétérozygote et décrit leur phénotype pulmonaire pour la première fois (158).

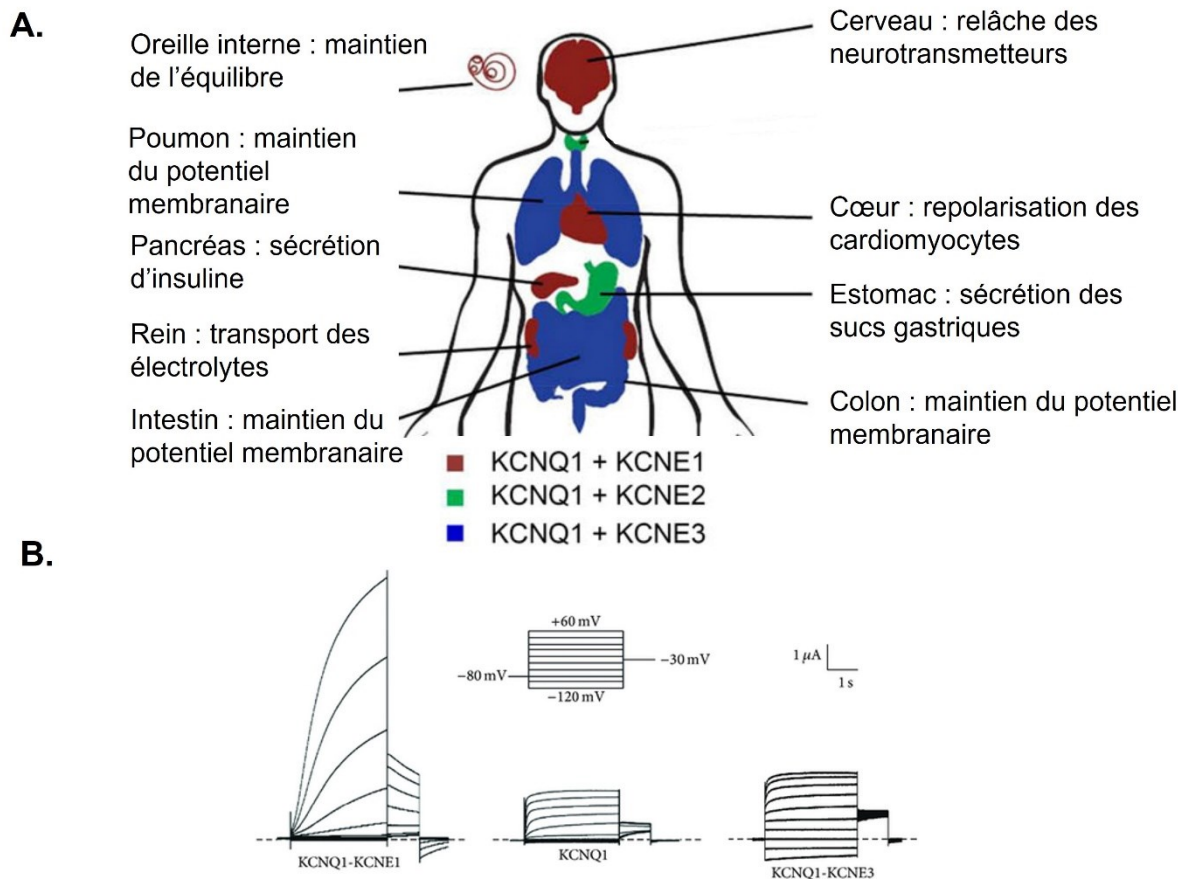


Figure 9. – Distribution tissulaire des différentes sous-unités KCNE

Distribution tissulaire et rôle des différentes sous-unités KCNE (A) et différences d'amplitude du courant potassique selon la combinaison de KCNQ1 avec KCNE1 ou KCNE3 (B). Adapté de Lin et al., 2015 (169) et Abbott, 2014 (163).

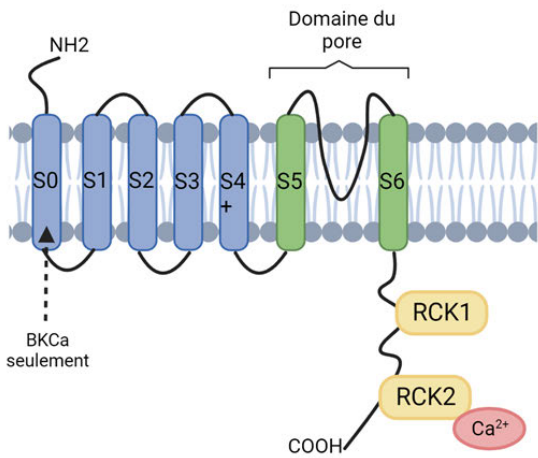
La mise en marché de nouveaux modulateurs pharmacologiques a facilité les études sur l'impact de la modulation de KvLQT1. Tout d'abord, la benzodiazépine R-L3 agit de façon stéréospécifique puisque l'énantiomère de conformation « R » est celui qui augmente le courant I_{Ks} et ralentit sa désactivation. Sa réponse est indépendante de la stimulation par les β -adrénergiques, ce qui suggère que son activation est directement reliée au mécanisme d'ouverture du canal (170). Au sein du laboratoire, son administration pulmonaire par instillation intranasale aux souris fut tolérée lors de nos études pilotes et nous avons alors poursuivi l'étude du rôle de l'activation du KvLQT1 en utilisant le R-L3. Plus récemment, l'équipe du Dr. Hopkins (171) a débuté par le screening, grâce à la source Molecular Libraries Production Center Network (MLPCN), de plus de

300 000 composés avant de procéder aux modifications chimiques structurales permettant de produire le ML277. Bien que le R-L3 et le ML277 aient la même cible au niveau du pore, le mécanisme d'activation de ces deux composés diffère légèrement. En effet, Le ML277 est insensible au voltage tandis que R-L3 a un effet sur le mouvement du domaine sensible au voltage (172). Les inhibiteurs pharmacologiques de KvLQT1 ont été testés en chambre de Ussing démontrant un courant clofilium- et chromanol-sensible sur monocouche de cellules alvéolaires (173) ou de cellules des voies aériennes (trachée de souris (158)). Toutefois, nos études pilotes *in vivo* ont détecté une toxicité du clofilium instillé et nous avons donc poursuivi nos expérimentations avec le chromanol-293B qui était mieux toléré.

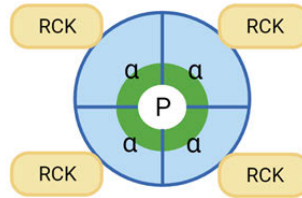
1.2.2.3.2 Canaux dépendants du calcium

La deuxième sous-classe est composée majoritairement de canaux à 6 TM activés par le calcium (Ca^{2+}) intracellulaire (voir **Figure 10**). On les distingue en trois catégories soit les canaux à large conductance (BK, 250-300pS), à conductance intermédiaire (IK, 30-80pS) et à petite conductance (SK, 10pS) (145). Le canal BK ($\text{K}_{\text{Ca}1.1}$) fut le premier canal activé par le calcium à être cloné (150). Sa structure est légèrement différente des canaux Kv, soit par la présence d'un domaine transmembranaire supplémentaire (S0) impliqué dans la réponse au voltage et d'un domaine C-terminal plus large, ayant des domaines régulateurs sensibles au signal calcique (RCK). Contrairement à BK, les canaux IK et SK ont une structure à 6 TM, cependant ils n'ont pas autant de charges positives sur S4, ce qui les rend indépendants au voltage. Ils sont uniquement sensibles au calcium grâce au domaine calmoduline retrouvé sur le domaine C-terminal cytosolique (145). Il existe également des canaux insensibles au calcium qui sont classés dans cette sous-famille par leur homologie structurale. Leur mécanisme déclencheur dépend des ions Cl^- et Na^+ intracellulaires ($\text{K}_{\text{Ca}4.1}$ et 4.2) ou par un pH alcalin intracellulaire ($\text{K}_{\text{Ca}5.1}$) (150). Les ATII possèdent à leur membrane des canaux activés par le calcium soit le BK_{Ca} et le $\text{KCa}3.1$ (154). Le $\text{KCa}3.1$ est exprimé du côté basolatéral et son activité est modulée par TRAM34 (inhibiteur) ou le 1-EBIO (activateur)(174).

**A. Structure de la sous-unité à 7 TM :
Canaux activés par le calcium (KCa)**



B. Assemblage tétramérique



C. Clones

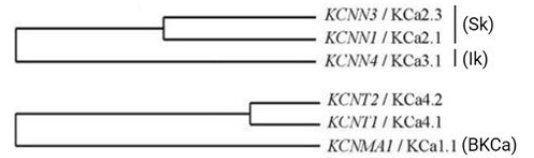


Figure 10. – Description des canaux dépendants du calcium (KCa)

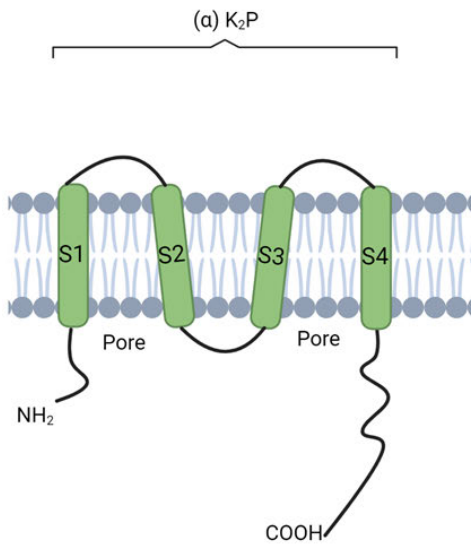
La structure des sous-unités spécifiques aux canaux K^+ dépendants du calcium (A), l'assemblage tétramérique de ces sous-unités (B) et l'arbre phylogénétique des clones des canaux KCa (C). Inspiré et adapté de Shieh *et al.*, 2000 (148) et Girault et Brochiero, 2013 (151). Créé par BioRender.com

1.2.2.3.3 Canaux K^+ à deux pores

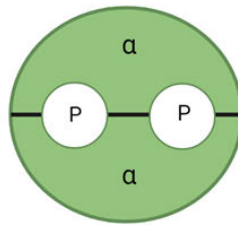
La deuxième famille de canaux K^+ nommée K_2P est constituée de sous-unités α à 4 TM et deux pores (voir **Figure 11**). Cette famille contient 15 sous-unités qui s'assemblent en dimère afin de conserver une structure de type tétramérique (145). Chacun de ces canaux K_2P présente quelques détails structuraux distincts qui leur donnent un mécanisme de sensibilité et de régulation unique. En effet, des résidus histidines ou arginines sensibles à la protonation sont localisés à l'entrée du filtre de sélectivité du pore et permettent de moduler l'activité du canal à la suite de la diminution du pH extracellulaire par exemple. La variation dans les acides aminés composant le domaine C-terminal du côté cytosolique permet aux canaux K_2P de répondre à divers stimuli tels que les phospholipides, les protéines G, la température ou l'étirement (145). Ces caractéristiques structurales et fonctionnelles les divisent en six sous-familles; TREK, TALK, TWIK, TASK, THIK et TRESK (voir **Figure 11**). La famille des K_2P n'est que très peu représentée dans les

ATII (146). En effet, seul Trek-1 et TRAAK ont été étudiés par l'équipe de Schwingshackl (175), mais sinon aucun autre transcrit ne fut préalablement identifié.

A. Structure de la sous-unité à **4 TM** :
Canaux à 2 pores (K₂P)



B. Assemblage tétramérique



C. Clones

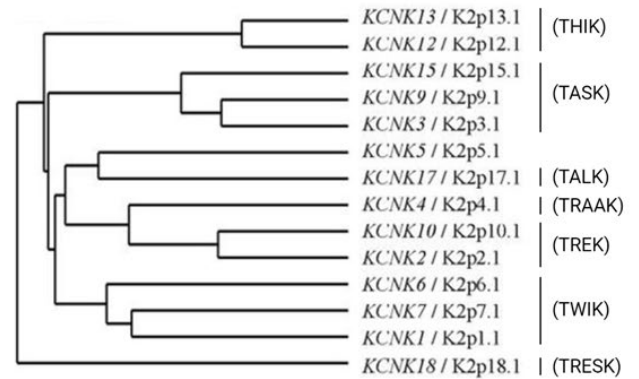


Figure 11. – Description des canaux K₂P

La structure des sous-unités spécifiques aux canaux K₂P (A), l'assemblage des 2 sous-unités formant 2 pores (B) et l'arbre phylogénique des clones et leurs différentes nomenclatures (C). Inspiré et adapté de Shieh *et al.*, 2000 (148) et Girault et Brochiero, 2013 (151). Créé par BioRender.com

1.2.2.3.4 Canaux K⁺ à rectification entrante

Finalement, la troisième classe nommée canaux K⁺ à rectification entrante (Kir) est composée de canaux formés de sous-unités α à 2 TM (voir **Figure 12**). Les canaux Kir sont régulés par les ions (Mg²⁺, H⁺, Na⁺), les concentrations extracellulaires de K⁺, les phospholipides (PIP₂) ou via des interactions avec d'autres protéines (protéines G ou sous-unités récepteurs de sulfonylurée (SUR)) (145). Ces 15 différents canaux (**Figure 12**) sont sous-divisés selon quatre classes fonctionnelles soit les canaux classiques (ouverts de façon constitutive), les Kir de transport de K⁺, modulés par les protéines G ou par l'ATP (K_{ATP}). La distribution tissulaire et les différentes combinaisons de ces sous-unités font en sorte que les canaux K_{ATP} jouent différents rôles au niveau du cerveau, des cellules musculaires lisses, du cœur et du pancréas par exemple (174). Néanmoins, leur rôle principal consiste à traduire l'état métabolique cellulaire en activité électrique qui permet à tous ces tissus de compléter leur fonction.

A. Structure de la sous-unité à 2 TM : Canaux à rectification entrante (Kir)

B. Assemblage tétramérique

C. Clones

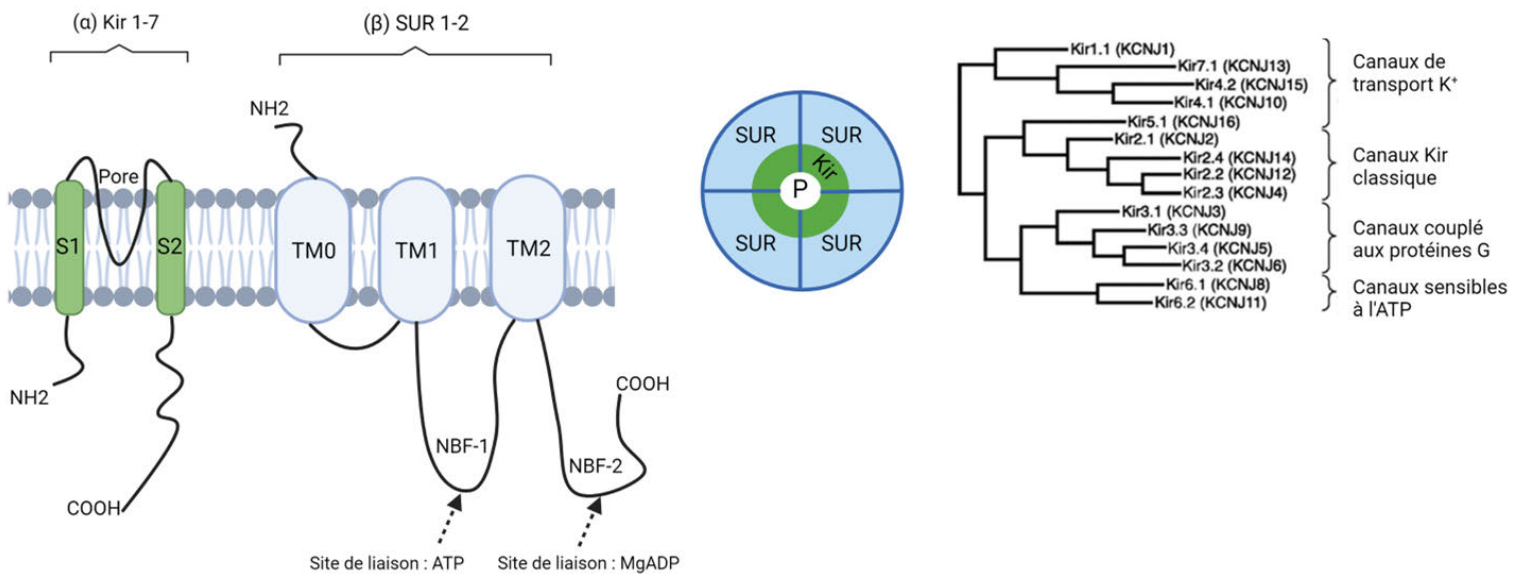


Figure 12. – Description des canaux Kir

La structure des sous-unités spécifiques aux canaux à rectification entrante (A), l'assemblage des sous-unités formant le pore (B) et l'arbre phylogénique des clones et leurs différents rôles (C). Inspiré et adapté de Hibino *et al.*, 2010 (174) et Girault et Brochiero, 2013 (151). Créé par BioRender.com

Seul Kir2.1 est exprimé dans les ATII fœtaux et Kir6.1 (K_{ATP}) chez l'adulte (146). Le canal Kir2.1, a une unité de conductance de 31pS, mais son rôle reste à définir. Cependant, les hypothèses s'orientent vers une implication au niveau du transport ionique et liquidien essentiel à un épithélium sécrétoire fœtal (décrit à la section 1.2.2.1.1) où il servirait à garder un potentiel membranaire adéquat pour générer la force d'absorption du sodium lors du changement vers un épithélium d'absorption (176). Au laboratoire, l'expression d'un canal K_{ATP} formé par Kir6.1 et SUR2B a été montrée au niveau des cellules alvéolaires. L'expression fonctionnelle du canal K_{ATP} à la membrane basolatérale fut démontrée par des mesures de courants de court-circuit en chambre de Ussing sur cultures primaires de cellules ATII (177). Le canal K_{ATP} est également une cible prometteuse tel que montré dans plusieurs études menées au laboratoire (154,173,177,178).

Le canal K_{ATP}

Le canal K_{ATP} est composé de 4 sous-unités α Kir6.1 ou 6.2, liées à l'une des deux sous-unités β , soit les récepteurs de sulfonylurée SUR1 ou SUR2. Chaque Kir (2TM) est associé à une unité SUR qui sont formées de 3 domaines TM (TM0, TM1 et TM2) composés 5-6 régions transmembranaires chacune. Les régions cytosoliques C-terminales et la région entre TM1-TM2 présentent des sites de liaison des nucléotides (NBF-1 et NFB-2) (179). Plusieurs études qui ont révélé des liaisons entre les différentes sous-unités et les nucléotides/ATP ont permis de comprendre le mécanisme d'action du canal. Il est proposé que lorsque l'ATP diminue, la région NFB-1 se lie à l'ATP tandis que la région NFB-2 est liée au MgADP. Dans cette conformation, SUR diminue l'affinité de Kir pour l'ATP et permet d'ouvrir le pore du canal. Chaque monomère Kir possède un site de liaison à l'ATP et lorsque l'une des quatre sous-unités seulement est liée à l'ATP, cela est suffisant pour fermer le canal. Le glibenclamide est un composé sulfonyluré qui se lie à SUR1-2. L'un des activateurs du canal K_{ATP} , le pinacidil permet l'activation du canal Kir6.2/SUR2A-B par l'induction de l'hydrolyse d'ATP qui permet de stabiliser la conformation du canal dans un état ouvert (179).

En résumé, plusieurs types de canaux K^+ sont présents à la membrane des cellules alvéolaires et fonctionnent de concert avec les canaux ioniques du transport sodique pour préserver l'homéostasie des poumons telle que décrite ci-dessous.

1.3 La fonction des canaux K^+ dans la physiologie de l'épithélium alvéolaire

La fonction principale des canaux K^+ consiste à maintenir un potentiel de membrane adéquat pour le maintien du gradient électrochimique au sein de l'épithélium respiratoire. Toutefois, l'étude approfondie des canaux K^+ a permis de reconnaître leur implication dans d'autres processus en lien avec les échanges gazeux, le transport des ions et des fluides, la réponse inflammatoire et la réparation épithéliale.

1.3.1 Canaux K^+ sensibles à l'oxygène

Le poumon présente une capacité d'adaptation rapide aux changements environnementaux en oxygène (O_2). Ce mécanisme est possible grâce aux canaux K^+ exprimés à la surface des cellules du corps carotidien artériel, du corps neuro-épithélial (NEB) et du muscle lisse (180). Bien que le rôle des cellules alvéolaires dans ce processus n'ait pas été étudié, l'expression des canaux K^+ en commun avec les types cellulaires mentionnés ci-haut nous permettrait d'émettre l'hypothèse que les pneumocytes soient impliqués dans la réponse cellulaire suite aux changements des niveaux d' O_2 (146).

Les corps carotidiens sont des amas de cellules chimioréceptrices capables de détecter les pressions partielles en oxygène (PO_2), le pH et la température sanguine. La relâche de neurotransmetteurs envoie un signal vers le centre respiratoire permettant d'ajuster la ventilation/rythme respiratoire (180). L'expression et le courant K^+ correspondant à l'activité électrique de TASK-1 furent confirmés dans les corps carotidiens (181). Par les méthodes d'électrophysiologie, il a été observé que l'hypoxie avait un impact sur la modulation de TASK-1 lorsque la cellule est intacte (cell-attached patch), mais plus aucun effet n'a été observé lorsque la membrane était excisée (inside-out patch), suggérant une modulation intracellulaire de TASK-1. On y retrouve également le complexe $Kv4.2/Kv\beta1.2$ dont la sensibilité à l'oxygène est

déterminée par la sous-unité β , soit une enzyme oxydoréductase (NADPH) qui selon la situation redox applique un changement conformationnel à l'unité conductrice Kv afin d'en moduler le courant (180).

Les cellules NEB retrouvées au niveau de l'épithélium des voies aériennes jouent également un rôle dans la vascularisation et la ventilation pulmonaire. Elles expriment également l'enzyme NADPH en combinaison avec les sous-unités Kv1.4, Kv3.3 et Kv3.4(180). Cette enzyme semble essentielle à la modulation du canal K^+ puisque chez des souris sans complexe NADPH (gp91^{phox} KO), l'hypoxie ne parvient pas à inhiber l'activité électrique du canal K^+ (182). Une autre équipe a confirmé que les produits de l'oxydase-réductase tels que le H_2O_2 avaient pour impact d'augmenter le courant K^+ chez les NEB (183).

Le courant des canaux K^+ multimériques Kv9.3/Kv2.1 ou Kv1.2/Kv1.5 est réduit en condition d'hypoxie et provoque la dépolarisation des cellules du muscle lisse des artères pulmonaires qui se traduit ultimement par leur contraction (184). D'autre part, le canal de large-conductance BKCa a été démontré comme un canal K^+ sensible à l'oxygène dans la lignée alvéolaire A549. La modulation du temps d'ouverture moyen du canal de BKCa par les changements de PO_2 est seulement possible suite à une stimulation aiguë et non pas en condition chronique (24 h) (185).

Ainsi, les canaux K^+ sensibles à l'oxygène jouent un rôle dans l'ajustement face aux changements environnementaux et permettent donc d'adapter notre respiration et le contrôle des échanges gazeux par les poumons.

1.3.2 Contrôle du transport transépithélial ionique et liquidien par les canaux K^+

Le rôle des canaux K^+ dans le transport transépithélial a été brièvement décrit à la section 1.2.2.1.1 (Homéostasie liquidienne du fœtus à l'adulte). En résumé, les canaux K^+ sont responsables du maintien du potentiel de membrane afin de créer un gradient électrochimique permettant un transport ionique et liquidien transépithélial (voir **Figure 5**). Ce processus permet de conserver la composition et le volume des liquides de surface nécessaires à la clairance mucociliaire au niveau des voies aériennes ainsi qu'à la clairance liquidienne alvéolaire après la

naissance et ensuite tout au long de la vie. Pour ce faire, les canaux K^+ jouent un rôle dans la régulation de la sécrétion de Cl^- et l'absorption de Na^+ .

Il a été démontré que la sécrétion de Cl^- par les canaux dépendants de l'AMPc (CFTR) ou activés par le Ca^{2+} (CaCC) est secondaire à l'augmentation du courant K^+ basolatéral dans les cellules de trachées de souris (186). De plus, une autre équipe (187) a aussi constaté que la modulation des canaux KvLQT1 et KCa3.1 dans les cellules nasales humaines a un impact sur l'activité des canaux CaCC. La sécrétion de Cl^- est également régulée par les canaux KvLQT1 et KCa3.1, mais non par KCa1.1, sur des cellules du colon distal, un autre type d'épithélium sécrétoire (188). Les études antérieures du laboratoire (154,177) ont également permis de constater que le courant Cl^- stimulé par la forskoline est abolie par les traitements avec les inhibiteurs pharmacologiques de KvLQT1, KCa et K_{ATP} dans des cellules primaires alvéolaires. En plus de leur rôle dans la sécrétion Cl^- , ces trois canaux K^+ sont également impliqués dans le contrôle du transport Na^+ . Leur inhibition combinée a également diminué secondairement le courant sodique sensible à l'amiloride tandis que l'activation du K_{ATP} est parvenue à augmenter ce courant.

Ces dernières évidences ont permis d'émettre l'hypothèse que les changements d'activité de ces canaux K^+ pourraient avoir des répercussions secondaires sur le transport de Cl^- et Na^+ soit *via* des changements du gradient électrochimique en aigu ou encore *via* une régulation des canaux CFTR et ENaC suite à des traitements chroniques aux modulateurs des canaux K^+ . Conformément à cette hypothèse, les travaux du laboratoire ont démontré que l'inhibition des canaux K_{ATP} et KvLQT1 (pendant une période de 24 h) dans les cultures primaires de cellules alvéolaires entraînaient une baisse d'expression protéique de CFTR sans toutefois avoir un effet marqué sur l'expression génique, sauf lorsque les inhibiteurs étaient combinés. D'autre part, l'inhibition de K_{ATP} et KvLQT1 a diminué l'expression des ARNs messagers des trois sous-unités (α , β et γ) composant le canal ENaC ainsi que leur niveau d'expression protéique (154). L'effet inverse a pu être vérifié grâce à l'activation de K_{ATP} , toutefois aucun activateur sélectif de KvLQT1 n'était accessible au moment où l'étude avait été menée. Puisque le transport sodique influence directement le mouvement liquidien, l'impact des canaux K^+ sur l'absorption des fluides à travers une culture primaire de cellules alvéolaires en interface air-liquide a également été étudié. La clairance alvéolaire *in vitro* fut diminuée suite à l'inhibition des canaux K_{ATP} et KvLQT1 et

augmentée en présence de l'activateur de K_{ATP} (154). Sakuma *et al.* ont aussi démontré que l'activation de K_{ATP} permettait d'augmenter la clairance alvéolaire, médié par le canal ENaC, dans un tissu pulmonaire humain réséqué (189).

L'incapacité de l'épithélium alvéolaire à réabsorber l'excès de liquide pulmonaire est de mauvais pronostic dans la résolution du SDRA par exemple (190). Les canaux K^+ , de par leur implication dans le transport ionique, pourraient alors constituer une cible de choix afin de tenter de rétablir un équilibre des fluides.

1.3.3 Régulation de la réponse inflammatoire

Le poumon inspire quotidiennement plus de 10 000 L d'air et se trouve donc constamment exposé aux agents pathogènes et agressions externes (191). Il est primordial que les cellules alvéolaires et immunitaires sachent discriminer les particules inoffensives de celles potentiellement dangereuses afin de ne pas initier une réponse inflammatoire inutile qui pourrait causer davantage de dommages. La réponse inflammatoire est divisée en deux segments complémentaires. L'immunité innée est connue comme une défense immédiate de l'hôte tandis que l'immunité adaptative consiste au développement d'une mémoire immunologique. Je me concentrerai sur l'immunité innée qui est caractéristique de la phase aiguë du SDRA.

La première étape consiste en la reconnaissance des pathogènes, principalement effectuée par les pneumocytes ou les macrophages alvéolaires. Ces derniers possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) capables de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, nature infectieuse) ou les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs, nature non infectieuse)(192). Les collectines (SP-A et SP-D) sécrétées par les ATI (section 1.2.1.2.1) sont l'un des PRRs spécifiques aux alvéoles et sont considérées comme des molécules de surveillance immunitaire à double action. En l'absence de reconnaissance de PAMPs, ces collectines interagissent avec SIRP α (signal-inhibitory regulatory protein α), à la surface des macrophages afin de maintenir un environnement anti-inflammatoire (191). À l'inverse, lorsque ces collectines, *via* leur domaine CRD, reconnaissent les PAMPs, une interaction avec CD91 (récepteur membranaire de type cluster de différenciation (CD) des macrophages) survient, et initie une cascade de signalisation entraînant le relargage de cytokines pro-

inflammatoires (191). Il a également été démontré que les ATII et les macrophages alvéolaires sont capables d'activer le système du complément, reconnu pour promouvoir l'opsonisation et le recrutement de cellules phagocytaires (191). Au niveau pulmonaire, il existe aussi d'autres types de PRRs qui ont différents rôles tels que la famille des récepteurs de type Toll (TLRs), les récepteurs scavengers (RS) et les récepteurs de type NOD (NLRs) (191).

1.3.3.1 Mécanisme d'action du macrophage alvéolaire résident

Les macrophages se classent en deux catégories selon leur localisation, soit les macrophages alvéolaires (MAs), que l'on collecte et décompte grâce aux lavages broncho-alvéolaires (BALs) et les macrophages interstitiels qui sont détectables sur coupe histologique des poumons. Les MAs tiennent leur origine du sac vitellin embryonnaire, du foie fœtal et une mince proportion provient de la différenciation des monocytes (192,193). Tout d'abord, la migration vers les poumons se fait par chimiotactisme (CX3CR1), leur maturation par le facteur GM-CSF sécrété par les pneumocytes puis leur différenciation par la transcription des facteurs PPAR γ , BACH2 et CEBP3 notamment (193). Bien que les MAs aient une longue espérance de vie, avec un renouvellement cellulaire d'environ 40% par an (194), ces cellules différenciées ont la possibilité de réintroduire le cycle cellulaire à n'importe quel moment (195).

En condition physiologique, l'activité des MAs est auto-inhibée via TGF- β . Ainsi, leur fonction principale est de participer à l'immunosurveillance des alvéoles et prévient une réponse inflammatoire excessive (192). En revanche, en reconnaissance de PAMPs/DAMPs, ils participent à la phagocytose des pathogènes, la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et au catabolisme du surfactant. De nombreuses évidences orientent vers l'existence de deux sous-populations distinctes de macrophages soit les M1 et M2. Bien que leur classification reste sujette à étude, les M1 sont caractérisés par l'expression élevée de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6 et divers MMPs) tandis que les M2 sont impliqués dans la réponse anti-inflammatoire (par la sécrétion d'IL-10 et TGF- β) et dans les mécanismes sous-jacents, de la réparation tissulaire et la fibrose (193). Les MAs sont également des cellules mobiles, car leur traçage a révélé qu'ils traversaient les pores de Kohn et sont donc capables de communiquer directement avec les cellules alvéolaires (196).

1.3.3.2 La contribution des cellules alvéolaires à la réponse inflammatoire

Ce n'est qu'en 1990 que l'épithélium alvéolaire fut reconnu comme un participant actif de la réponse inflammatoire. En effet, cette hypothèse fut premièrement validée en mettant en évidence une sécrétion d'interleukine (IL)-8 par les cellules A549 suite à l'induction par le TNF et l'IL-1 β (197). Maintenant, nous savons que celles-ci peuvent produire autant de médiateurs protéiques incluant les cytokines pro-(IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, MCP-1) et anti-(IL-10) inflammatoires, ou des médiateurs lipidiques (lipoxines, resolvines) (192,198). Les cellules alvéolaires ont également la capacité de relâcher des peptides antimicrobiens nommés défensines (hBD2 et 3 précisément (199,200)). Celles-ci ont la capacité de détruire directement les agents pathogènes, d'inactiver leurs toxines ou de contribuer à leur agrégation afin de faciliter la reconnaissance par d'autres cellules immunitaires.

Les cellules alvéolaires participent conjointement avec les MAs à la régulation de la réponse inflammatoire dans le but de produire une réponse coordonnée et efficace. Les cellules épithéliales expriment des molécules de surface (CD200, PDL-1 (protéine 1 de la mort cellulaire programmée) ou CD47) qui sont complémentaires aux récepteurs membranaires (CD200R, PD1 ou SIRP α respectivement) exprimés chez les MAs. Leur association permet de limiter la production de cytokines inflammatoires et la phagocytose, tandis qu'en présence de PAMPs, la rupture de ces interactions va déclencher l'activation des MAs. (194,201–203). La communication intercellulaire par la connexine 43 (jonction GAP) et les vagues de calcium qui y sont transportées permettent de réguler la réponse inflammatoire. Il fut démontré que les souris déficientes pour la connexine 43 présentent des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires dans leur BALs (204). Finalement, les pneumocytes et les MAs sécrètent des vésicules extracellulaires contenant des protéines, des lipides et des miRNAs servant de moyen de communication afin de rétablir l'équilibre des différents médiateurs inflammatoires et de réguler la fonction de l'autre (205).

1.3.3.3 Le recrutement et la migration des neutrophiles

Le recrutement et la migration des neutrophiles sont des mécanismes clefs de la réponse innée (voir **Figure 13**). Les neutrophiles sont issus des cellules progénitrices de la moelle osseuse qui voyagent par la circulation sanguine et sont attirés jusqu'au site lésé, préalablement ciblés par

l'importante concentration locale de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires. Les neutrophiles vont adhérer à l'endothélium via leur protéine d'adhésion de surface (selectines), ralentir leur roulement avant de complètement s'arrêter (206). Les intégrines $\beta 2$ sont alors activées et la déformation du cytosquelette permet l'extravasation des neutrophiles à travers les jonctions cellulaires afin d'atteindre la lumière alvéolaire. L'ensemble de ces processus est rendu possible grâce à l'interaction de la signalisation calcique et des canaux ioniques tels que les TRPVs, les récepteurs P2X et des canaux K^+ (206). Le canal KCa3.1 régule le volume cellulaire et les propriétés chimiotactiques des neutrophiles qui sont essentiels au phénomène de recrutement. Bien que le canal KCa3.1 soit sensible au calcium, son activité n'exerce aucune influence sur l'entrée calcique des neutrophiles (207). En revanche, l'efflux de K^+ par le canal Kv1.3 est, quant à lui, responsable de la production d'un champ électrique à l'avant de la cellule (lamellipode), qui amplifie les ondes de Ca^{2+} nécessaires au recrutement des neutrophiles (208).

Une fois leur cible atteinte, les neutrophiles fabriquent de nombreux types de vésicules contenant des myéloperoxydases, de la défensine, des métalloprotéinases et de l'élastase. La sécrétion de NETs, un agencement d'ADN et de protéines, permet d'emprisonner directement les agents pathogènes pour faciliter leur élimination (191).

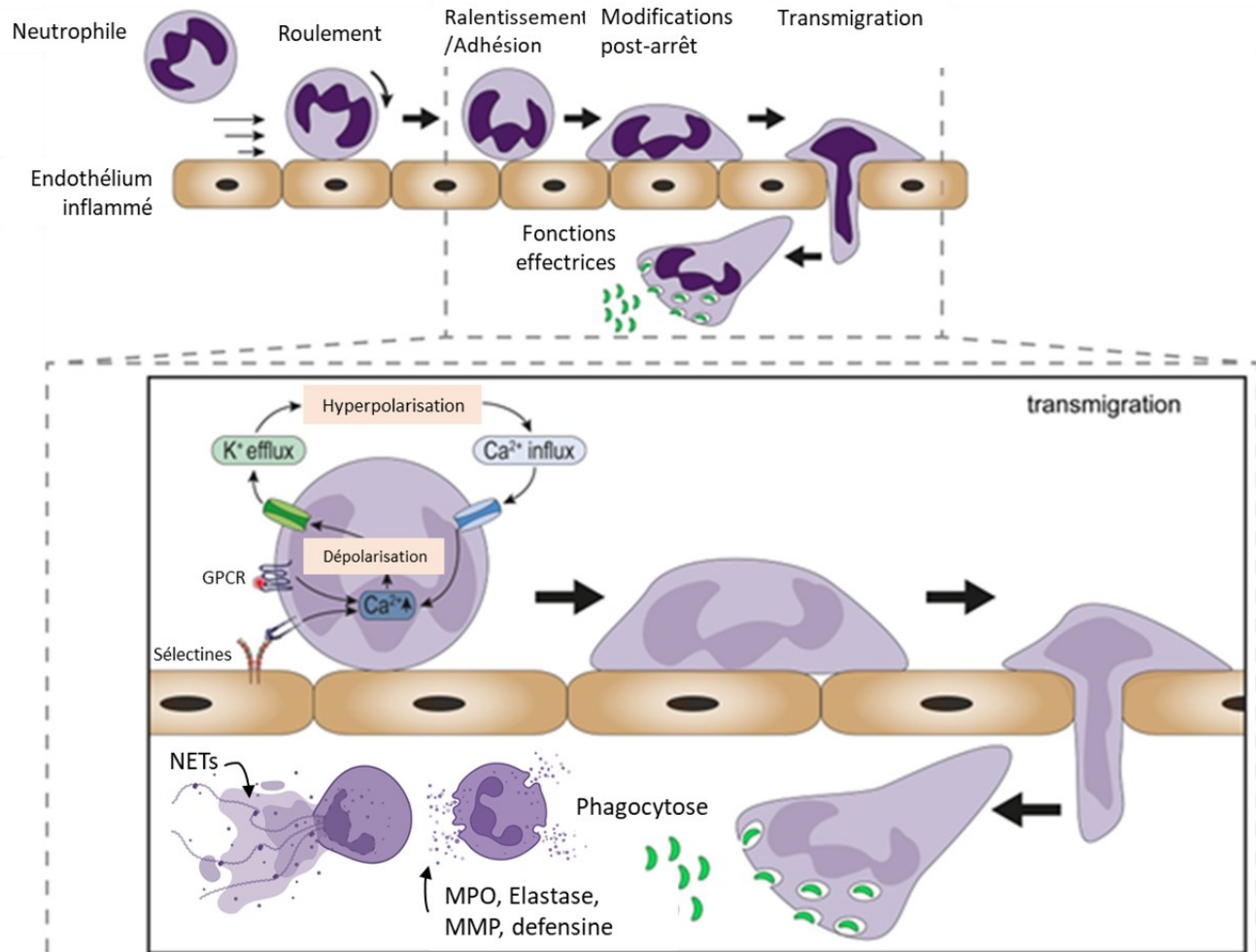


Figure 13. – Mécanismes de recrutement et de migration des neutrophiles

Schéma des étapes permettant la transmigration des neutrophiles vers la lumière alvéolaire et des fonctions effectrices qui consistent en la phagocytose, la relâche de plusieurs granules contenant des myéloperoxidase (MPO), de l'élastase, des métalloprotéinases et la défensine et la formation de NETs (neutrophils extracellular traps). Adapté de Immler *et al.*, 2022 (209).

1.3.3.4 La réponse inflammatoire médiée par les canaux K⁺

L'étude de diverses conditions pathologiques a permis d'identifier les canaux K⁺ comme un acteur important dans les processus inflammatoires. Tout d'abord, en condition d'ischémie cérébrale, il a été démontré que l'activation de canaux K⁺ de type TREK/TASK va limiter l'entrée excessive de calcium intracellulaire et garantir la survie neuronale tandis que leur inhibition engendre plutôt une apoptose (210). Dans un modèle d'I/R pratiqué au niveau du poumon et de l'intestin,

l'inhibition de canaux K_{ATP} a plutôt diminué l'infiltration des neutrophiles et les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6) (211). Toutefois, l'activation du K_{ATP} *in vitro* sur une lignée de monocytes/macrophages a entraîné une augmentation de l'expression de TNF- α par la voie NF- κ B/MAPK induite par le LPS (212). Une autre étude a démontré une hausse de l'expression et du Kv1.3 en présence de TNF/LPS et inversement que l'inhibition de ce canal a réduit l'activité et la prolifération du macrophage, ce qui indique une relation bidirectionnelle entre les signaux inflammatoires et le canal Kv1.3 (213).

Au début des années 1990 (214), une équipe a recensé deux courants potassiques distincts au niveau des neutrophiles humains, que l'on connaît aujourd'hui comme les canaux Kv1.3 et KCa3.1. Plus récemment, Immler *et al.* (209) ont rapporté que les souris Kv1.3-KO n'ont pas la capacité de recruter des neutrophiles puisque sans l'entrée de calcium, ceux-ci sont incapables d'adhérer à l'endothélium et donc de transmigrer. En effet, une diminution des neutrophiles dans les BALs des souris Kv1.3-KO, vs les souris sauvages, était observée en réponse au LPS. Les coupes histologiques démontrent que la population de neutrophiles se trouvait au niveau interstitiel sans possibilité d'accéder à la lumière. De plus, l'inhibition du KCa3.1 a induit une augmentation du volume cellulaire et l'analyse de la migration guidée a permis de comprendre que la distance parcourue par les neutrophiles ainsi que leur vitesse était diminuée en présence d'IL-8 et fMLP, deux chemoattractants (207).

En résumé, la réponse inflammatoire est l'un des mécanismes indispensables à la clairance des pathogènes et au rétablissement de l'homéostasie pulmonaire. Malgré cela, diverses conditions infectieuses ou inflammatoires peuvent entraîner des dommages épithéliaux significatifs.

1.3.4 Les mécanismes de la réparation épithéliale

L'insulte tissulaire provoquée par l'exposition à divers pathogènes ou à un environnement inflammatoire excessif requiert la mise en œuvre de divers mécanismes de réparation et de régénération afin de restaurer un épithélium intègre et fonctionnel. L'atteinte alvéolaire est caractérisée par la rupture physique des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire (ECM). Cette perte totale de contact enclenche l'apoptose/nécrose des cellules

épithéliales qui résultera alors à une membrane basale dénudée et un environnement riche en débris cellulaires.

À la suite de l'insulte, la réparation de l'épithélium alvéolaire dépendra de la mise en place de plusieurs processus cellulaires (voir **Figure 14**) : 1) les cellules progénitrices saines alvéolaires de type II, avoisinantes aux lésions vont s'étaler et se dédifférencier, 2) puis elles vont migrer vers le site lésé, 3) ces cellules progénitrices vont proliférer et finalement 4) se redifférencier en cellules alvéolaires de type I et II afin de retrouver la fonctionnalité de l'épithélium (151). Toutes ces étapes du processus peuvent être régulées par divers médiateurs inflammatoires, des facteurs de croissance ainsi que par les composantes de l'ECM (215).

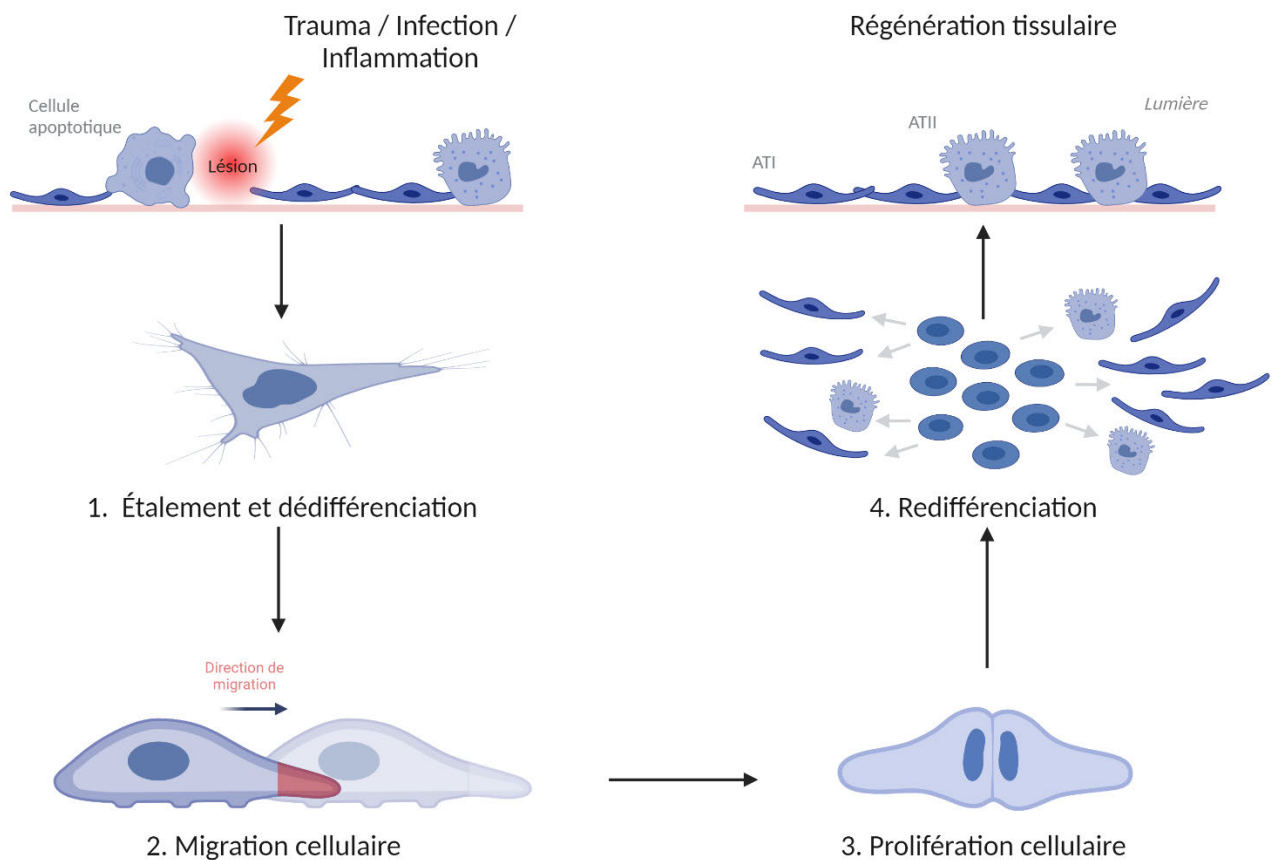


Figure 14. – Mécanismes successifs de la réparation épithéliale

Suite à une lésion, les cellules alvéolaires vont engendrer cette suite de phénomènes qui vont ultimement permettre de réparer et régénérer un épithélium intègre et fonctionnel. Adapté de Girault et Brochiero, 2014. (151). Créé par BioRender.com

La première étape clef dans la réparation épithéliale est l'étalement et la migration cellulaire. La séquence des évènements qui permet la migration vers une direction déterminée par la polarité cellulaire débute par 1) la polymérisation de l'actine dans l'organisation des protrusions au front de la cellule, 2) la formation de sites d'adhésions stables avec l'ECM, 3) la propulsion du corps cellulaire par contraction et puis 4) le détachement des sites d'adhésions à l'arrière qui provoque la rétraction de la cellule (216,217).

La polarité s'établit par la polymérisation des filaments d'actine et la formation de structures d'adhésion focales qui forment des protrusions (lamellipodes ou filopodes) en amont de la cellule. Ces projections sont généralement régulées par la famille Rho des GTPases (RhoA, Rac1 et Cdc42) (215). La polarité cellulaire peut aussi être modulée grâce au potentiel d'adhésion à l'ECM, soit par un pH environnant adéquat par l'échangeur Na^+/H^+ (NHE1) à l'avant de la cellule ou par le gradient de concentration calcique qui est plus élevé à l'arrière de la cellule (218).

Les sites d'adhésions sont composés par des complexes multiprotéiques qui serviront de point d'interaction entre l'ECM et le cytosquelette. Environ une cinquantaine de protéines a été recensée au niveau de ces sites d'adhésions dont la plus grande famille sont les intégrines (sous unités α et β) (216). Lorsque les intégrines sont activées par leur interaction avec l'ECM (par la fibronectine ou la laminine par exemple), la FAK (focal adhesion kinase) est alors recrutée. D'autres protéines seront alors mobilisées de façon successive afin de stabiliser l'adhésion, telles que la taline, la vinculine, la paxilline (protéines du cytosquelette), le Src (tyrosine-kinase) ou la PKC (sérine-théorine kinase) (216). Par la suite, la force contractile issue de la modulation de la myosine par RhoA et la force motrice appliquée par l'ancrage à l'ECM vont permettre la propulsion avant de la cellule (215,219). Finalement, les sites d'adhésions vers l'arrière de la cellule devront être dégradés par les métalloprotéinases ou via la modulation de ces mêmes protéines d'adhésion (215,217).

La deuxième étape est la prolifération cellulaire dans le but de recouvrir la zone lésée. En condition physiologique, les cellules alvéolaires sont presque quiescentes et ont un renouvellement cellulaire très lent (220). Toutefois, en contexte pathologique, la capacité de réparation épithéliale des ATII, grâce à leur propriété progénitrice, semble stimulée. En effet, les

ATII ont la capacité de se dédifférencier et soit de s'autorenouveler ou se redifférencier en ATI (221). Plusieurs signaux qui médient la transformation des ATII vers les ATI provient des cellules environnantes telles que les cellules endothéliales (S1P), les fibroblastes (PDGF α) et les cellules immunitaires (TNF/IL-1 β) (222). De plus, certaines équipes ont démontré que plusieurs sous-populations cellulaires dérivées des ATII apparaissaient en réponse aux lésions induites par la bléomycine ou le LPS par exemple (223,224). Ces sous-populations sont enrichies par l'expression majoritairement de *Krt8* (kératine 8) ainsi que par d'autres gènes impliqués dans la signalisation de la sénescence cellulaire, des jonctions cellulaires et de la régulation du cytosquelette, soit des processus clefs de la réparation épithéliale (224). D'autres évidences indiquent également qu'une population de cellules souches dérivées des voies aériennes serait capable de migrer vers les alvéoles et se différencier en ATII (224,225). De plus, une faible proportion des ATII est issue des cellules dérivées de la moelle osseuse (226). Enfin, c'est la combinaison de la migration et de la prolifération cellulaire qui va permettre une réparation optimale de l'épithélium alvéolaire.

1.3.4.1 Interaction des facteurs de croissance, des intégrines et des canaux K⁺ dans les processus de la réparation épithéliale

Les facteurs de croissance ont un pouvoir mitogène et motogène d'une grande utilité en phase de réparation épithéliale, mais dont l'expression excessive peut favoriser le développement de cancer. Les canaux K⁺ sont aussi impliqués dans la réparation épithéliale et curieusement, certains types de cellules cancéreuses présentent aussi des niveaux d'expression anormalement élevés de canaux K⁺. De fait, une forte expression du canal KCa2.3 a été mesurée dans des biopsies de tissus mammaires tumoraux (227) et similairement une étude issue du laboratoire (149) a identifié une forte expression du canal KvLQT1 sur des tissus de patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire. L'inhibition de Kv10.1 a permis de réduire la formation de colonies de cellules cancéreuses ovariennes et du sein *in vitro* (228) tandis que l'inhibition de KvLQT1 *in vitro* dans des lignées pulmonaires a permis de diminuer la migration cellulaire et de bloquer la progression du cycle cellulaire. Ces évidences ont généré un intérêt dans l'étude d'un possible lien fonctionnel bidirectionnel entre la signalisation des facteurs de croissance et l'activité des canaux K⁺ tel que décrit ci-dessous.

L'inhibition non spécifique des canaux K^+ renverse la migration cellulaire et la synthèse d'ADN de différents épithélia stimulée par des facteurs de croissance (229,230). Les facteurs de croissance stimulent quant à eux le courant K^+ (231). Au niveau pulmonaire, une étude antérieure du laboratoire (voir **Figure 15**) a permis de démontrer que les lésions épithéliales initient une action autocrine de la voie EGF/EGFR entraînant une augmentation de l'expression et du courant K^+ généré par les canaux $KvLQT1$ et K_{ATP} , favorisant ultimement les processus de migration, prolifération et réparation (173).

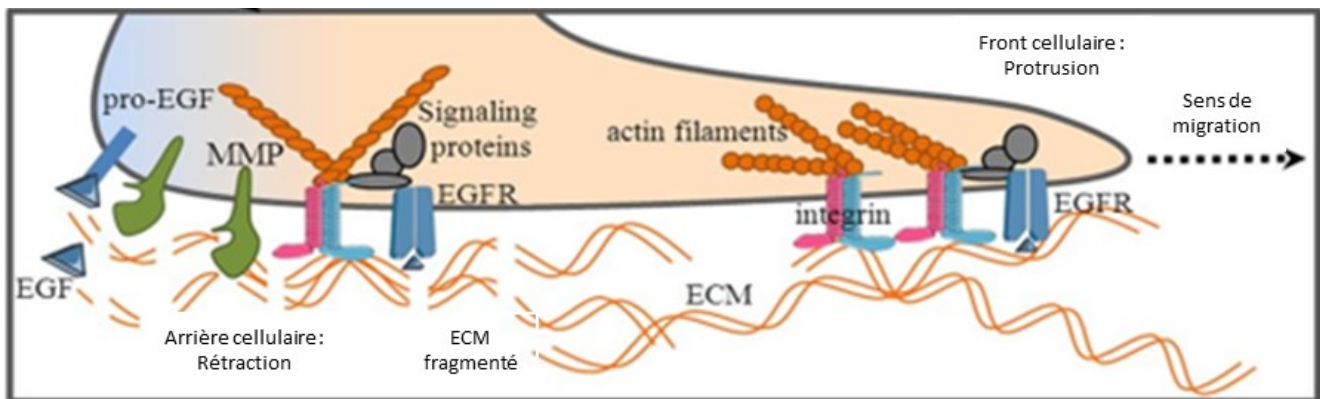


Figure 15. – Relation entre les intégrines, facteurs de croissance et l'ECM d'une cellule en migration

Une cellule en migration qui crée des protrusions à l'avant de la cellule, grâce à la réorganisation du cytosquelette et la rétraction à l'arrière de la cellule est rendue possible grâce à la dégradation du lien cellule-ECM par les MMP. L'autorégulation de la migration par la voie EGF/EGFR est également illustrée. Adapté de Girault et Brochiero, 2014 (151).

Les canaux K^+ peuvent également moduler la migration cellulaire par le contrôle du potentiel membranaire, du volume cellulaire ou par l'interaction directe avec des protéines d'adhésions tel que détaillé par la revue de Girault et Brochiero (151). Par exemple, l'état du potentiel membranaire influence le ratio des signaux intracellulaires PIP_2/PIP_3 , qui sont des modulateurs du changement de conformation de l'actine (218). L'activité des canaux K^+ , tels que $Kv1.1$ et $Kv1.5$, peut également induire un changement de concentration du calcium intracellulaire, favorisant ensuite la migration des cellules épithéliales intestinales (218). Les changements de volume cellulaire sont nécessaires pour traverser le réseau dense d'ECM. Pour ce faire, les canaux

K⁺ vont alterner entre le gonflement à l'avant et le rétrécissement à l'arrière de la cellule ce qui va entraîner des changements du cytosquelette (232). L'interaction fonctionnelle des canaux K⁺ et des protéines d'adhésion est un autre moyen de modifier le pouvoir migratoire des cellules. Le multicomplexe protéique réunissant Kv11.1, FAK-Rac1 et β1-intégrine en est un exemple. La modulation des canaux K⁺ entraîne une cascade de signalisation qui va ultimement influencer l'adhésion cellulaire (233). Des travaux du laboratoire ont aussi mis en évidence une relation physique et fonctionnelle entre la fibronectine, le canal KCa3.1 et la β1-intégrine durant la réparation alvéolaire (234). Finalement, une étude *in vitro* a décortiqué le pouvoir chimiotactique de plusieurs signaux (facteurs de croissance et inflammatoires) sur la migration des cellules ATI1 et constaté que la régulation de la réparation épithéliale est sensible à son environnement (235). Les preuves cumulées de la fonction des canaux K⁺ dans la réparation de divers épithélia supportent l'hypothèse que ceux-ci pourraient être des cibles potentielles intéressantes pour la restauration de l'intégrité d'un épithélium alvéolaire, une étape primordiale dans la résolution du SDRA.

En résumé, les canaux K⁺ jouent une multitude de rôles différents, soit dans le transport transépithélial ionique et secondairement liquidien, la réponse inflammatoire et la réparation épithéliale. Toutefois, leur rôle dans le maintien de l'homéostasie alvéolaire, dans des conditions pathologiques caractérisées par une atteinte pulmonaire sévère, tel que le SDRA, n'avait jamais été étudié.

1.4 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

1.4.1 Origine et définition

La complexité du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) a nécessité plusieurs années d'observations avant d'arriver à sa description actuelle. Une première description a été faite dans *The Lancet* en 1967, où *Ashbaugh et al.* (236) décrivent les manifestations cliniques et pathologiques de 12 patients admis aux soins intensifs. Ils rapportaient une infiltration alvéolaire diffuse à la radiographie, une perte de la compliance pulmonaire et une dyspnée sévère se développant quelques heures (1-96h) suite à divers traumatismes. Ils ont défini ceci comme le

syndrome de détresse respiratoire. Il a fallu près de vingt-sept ans avant la tenue d'une conférence-consensus Europe-Amérique (237) où plusieurs sous-comités ont discuté des enjeux quant à 1) l'uniformité de la définition du SDRA, 2) les mécanismes biologiques impliqués, 3) les facteurs de risques et prévalence ainsi 4) qu'à la coordination des futures études cliniques. La principale recommandation fut de distinguer les lésions pulmonaires aiguës (ALI, forme légèrement-moderée) du SDRA (forme sévère) par un ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mm Hg pour la forme sévère.

Quelques années plus tard, un panel d'experts internationaux s'est réuni pour discuter des données cliniques et physiologiques obtenues suite au consensus de 1994 dans le but d'adapter la définition aux nouvelles connaissances. Cette version provisoire a été mise en pratique et a démontré, en comparaison à la définition de 1994, une meilleure précision du diagnostic et de la prédiction de mortalité. La définition de Berlin 2012 fut alors adoptée (238). Elle présente désormais trois niveaux de sévérité définis selon le niveau d'hypoxémie et exclut le terme ALI (critères complets présentés au **Tableau 3**).

| Critères | Explication |
|---------------------|--|
| <i>Timing</i> | L'insulte primaire ou la dégradation des symptômes respiratoires doit être ressentie dans l'intervalle de 7 jours . |
| Imagerie thoracique | Opacités bilatérales (étendues à 3-4 quadrants : forme sévère) |
| Origine de l'œdème | L'œdème ne peut pas être expliqué par défaillance cardiaque (l'œdème hydrostatique est un critère d'exclusion) ou surcharge de fluide. |
| Oxygénation | Léger : $200 \text{ mg Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mg Hg}$ |
| | Modéré : $100 \text{ mg Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mg Hg}$ |
| | Sévère : $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mg Hg}$ |

Tableau 3. – Critères d'évaluation clinique du SDRA par la définition de Berlin 2012.

1.4.2 Le diagnostic

Bien que le diagnostic du SDRA se base sur les critères de cette définition de Berlin, l'hétérogénéité des manifestations cliniques et biologiques rend la certitude du diagnostic très compliquée et le plus souvent bien sous-estimée. Ceci fut prouvé lors d'une étude internationale,

où l'on a recensé que seulement 60,2% des cas de SDRA furent diagnostiqués par les cliniciens (239). Les symptômes cliniques sont plutôt représentatifs de la cause primaire de dommages et non spécifique au SDRA (voir **Tableau 4**, adapté de la référence (240)) ce qui ne simplifie pas le diagnostic.

| Signes et symptômes cliniques | Cause possible |
|---|-----------------------|
| Toux avec expectorations; fièvre; douleur thoracique pleurétique | Pneumonie |
| Infection; Température corporelle : > 38.3°C ou < 36°C; Pouls : >90 battements/min; hypotension artérielle; stabilité mentale altérée; niveau de protéines C-réactive élevé; hyperlactatémie | Septicémie |
| Antécédents d'institutionnalisation; développement d'invalidité (coma) | Aspiration |

Tableau 4. – Évaluation des symptômes cliniques suggérant la cause primaire du SDRA.

Ce dernier est le plus souvent basé sur des manifestations cliniques, mais il serait également pertinent d'évaluer le phénotype biologique du patient. Calfee *et al.* ont démontré que dépendamment de l'origine de l'insulte primaire, le phénotype moléculaire mesuré dans le plasma peut être différent (241). En effet, les patients présentant une atteinte directe aux poumons ont un niveau élevé de la SP-D, un biomarqueur de dommage épithélial et à l'inverse un niveau bas du marqueur de dommage endothélial (angiopoïtin-2) et vice-versa pour les patients avec une atteinte primaire extra pulmonaire (241).

De manière plus approfondie, l'analyse de biomarqueurs sanguins dans l'étude de Bos *et al.* a permis de poser l'hypothèse quant à l'existence de deux phénotypes biologiques différents chez les patients SDRA. L'un d'eux, le sous-type "réactif", serait caractérisé par une concentration élevée de molécules impliquées dans les voies inflammatoires, de coagulation et d'activation endothéliale, et inversement pour le sous-type dit "non enflammé". Le sous-groupe "réactif" est également associé à un niveau de mortalité aux unités de soins intensifs (USI) presque doublé et une durée de ventilation mécanique statistiquement plus longue (242). Ces données coïncident avec l'identification d'un sous-phénotype hyperinflammatoire (niveau élevé d'IL-6, -8, TNF α , le plus souvent causé par une septicémie) dans deux importantes cohortes (ARMA et ALVEOLI) dont

les données cliniques révèlent un taux de mortalité plus élevé et une plus longue durée sous ventilation mécanique et avec défaillance d'autres organes (243). Toutefois, cette hypothèse n'est basée que sur des biomarqueurs systémiques et ne reflète pas exactement la réponse inflammatoire alvéolaire tel que démontré par la comparaison de plusieurs facteurs (MPO, IL-1 β , IL-6, TNF- α) retrouvés dans les BALs entre cohortes hypo- vs -hyperinflammé ou par comparaison entre les groupes de causes directes vs indirectes (244). Ces indicateurs systémiques sont donc de bons marqueurs prédictifs de l'état du patient sans toutefois permettre de faciliter le développement de nouveaux traitements.

1.4.3 Épidémiologie et prise en charge du patient

Le raffinement et l'uniformité de la définition du SDRA en 2012 ont permis d'élaborer une importante étude observationnelle internationale afin de brosser un portrait général de l'incidence et des caractéristiques du SDRA dans les USI. L'étude prospective LUNG SAFE (The Large Observational Study to Understand the Global Impact of Severe Acute Respiratory Failure, (239)) recrutait tous les patients admis aux soins intensifs avec ventilation (non invasive ou invasive) sur une durée de quatre semaines consécutives en saison hivernale. La participation de 459 USI de 50 pays a permis d'inclure 12 906 patients dans l'étude dont 3022 furent diagnostiqués avec un SDRA, soit 10,4% des admissions en USI. Parmi cette cohorte de patients SDRA, la majorité des cas étaient des hommes (62%) et l'âge moyen était de 61,5 ans. La MPOC et le diabète étaient les comorbidités les plus recensées avec 21,7% chacun. Les causes de SRDA les plus fréquentes, recensées au sein de cette cohorte, étaient la pneumonie (59,4%), la septicémie extrapulmonaire (16,0%) et l'aspiration de liquide gastrique (14,2%). Le SDRA peut aussi résulter de d'autres atteintes pulmonaires de type directe (inhalation de fumée, les lésions d'ischémie-reperfusion lors d'une transplantation ou suivant le sauvetage d'une quasi-noyade par exemple) ou indirecte (pancréatite ou un trauma sévère accompagné de multiples transfusions) (245).

Concernant la prise en charge des patients, l'étude LUNG SAFE rapporte que la durée de séjour moyenne était de 10 jours, dont 8 avec une ventilation mécanique invasive (valeur médiane) pour un taux de survie de 66% en ISU (239). Sur les 2377 patients SDRA nécessitant une ventilation invasive, 30% étaient de degré léger, 46,6% modéré et 23,4% sévère. Le suivi des paramètres

ventilatoires de ces patients démontrait que le volume courant moyen était resté constant (entre 7,8-7,6-7,5 mL/kg PBW) entre les trois classes de sévérité du SDRA, tandis que le PEEP moyen (positive end-expiratory pressure) augmentait avec le degré de sévérité (7.4-8.3-10.1 cmH₂O). Aussi, le ratio PaO₂/FiO₂ était de 246 mmHg (forme légère), 149 (modérée) et 75 (sévère) (239).

L'usage continu d'agents bloqueurs neuromusculaires, de dose élevée de stéroïdes et les manœuvres de recrutements sont les soins adjuvants les plus pratiqués. Plus la sévérité du SDRA est grave, plus ces pratiques seront administrées. Une meilleure compréhension des mécanismes lésionnels décrits dans la pathophysiologie du SDRA est primordiale dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.4.4 La pathophysiologie du SDRA

Le développement du SDRA se divise en trois segments qui se succèdent, tout en se chevauchant, et présentent des caractéristiques uniques. La phase exsudative fait immédiatement suite à l'insulte primaire et dure environ sept jours (246,247). Cette phase présente des lésions au niveau de l'endothélium et/ou de l'épithélium alvéolaire (**Figure 16**). Plusieurs facteurs solubles (TNF- α , thrombine), sécrétés à la suite de l'insulte, entraînent une déstabilisation des jonctions endothéliales VE-cadhérine (246). Cet état induit une augmentation de la perméabilité de l'endothélium et favorise la formation d'un œdème interstitiel puis alvéolaire. De plus, les signaux inflammatoires vont réguler à la hausse l'expression des sélectines, ces molécules d'adhésions qui "activent" l'endothélium, afin de faciliter le recrutement des neutrophiles (246). Du côté épithélial, l'apoptose et la nécrose des pneumocytes par l'insulte primaire résultent en la dénudation de la membrane basale et à la dissociation des jonctions cellulaires. Ces dommages vont également favoriser l'infiltration liquidienne vers la lumière alvéolaire (245). Il est à noter que l'atteinte alvéolaire peut se développer de façon hétérogène à travers le poumon. La perte de fonctionnalité de l'épithélium va entraîner l'inactivation du surfactant, une diminution de la capacité de clairance des liquides alvéolaire (par la diminution de l'activité l'expression des canaux sodiques et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase par exemple) et ultimement l'inefficacité des échanges gazeux qui peut compromettre la survie du patient (248). À ce stade, les manifestations cliniques sont caractérisées par une perte de compliance, une diminution de la capacité résiduelle

fonctionnelle se traduisant par des aires d'atélectasie et d'hypoxie (247,248). De plus, ces signaux de dommages vont activer les macrophages alvéolaires et l'infiltration des neutrophiles qui vont alors provoquer la relâche de multiples cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) et initier une réponse inflammatoire exacerbée (248). Les débris cellulaires et la dégradation de la matrice extracellulaire vont favoriser la formation de membranes hyalines (247).

Par la suite, la phase proliférative est marquée par la compétition entre la réparation épithéliale par les ATII et la prolifération des fibroblastes dans le but de régénérer l'épithélium lésé (245,247). Certains patients connaîtront un rétablissement de la fonction de l'épithélium alvéolaire grâce une réparation épithéliale efficace, la clairance de l'œdème pulmonaire et des débris par les cellules immunitaires, ainsi qu'un contrôle de la réponse inflammatoire, conduisant ainsi à une résolution du SDRA. Toutefois, en absence de réparation alvéolaire efficace (avec un déséquilibre en faveur des fibroblastes) et de résolution rapide de la phase aiguë du SDRA, l'établissement d'une fibrose irréversible peut se mettre en place entraînant une défaillance respiratoire fatale.

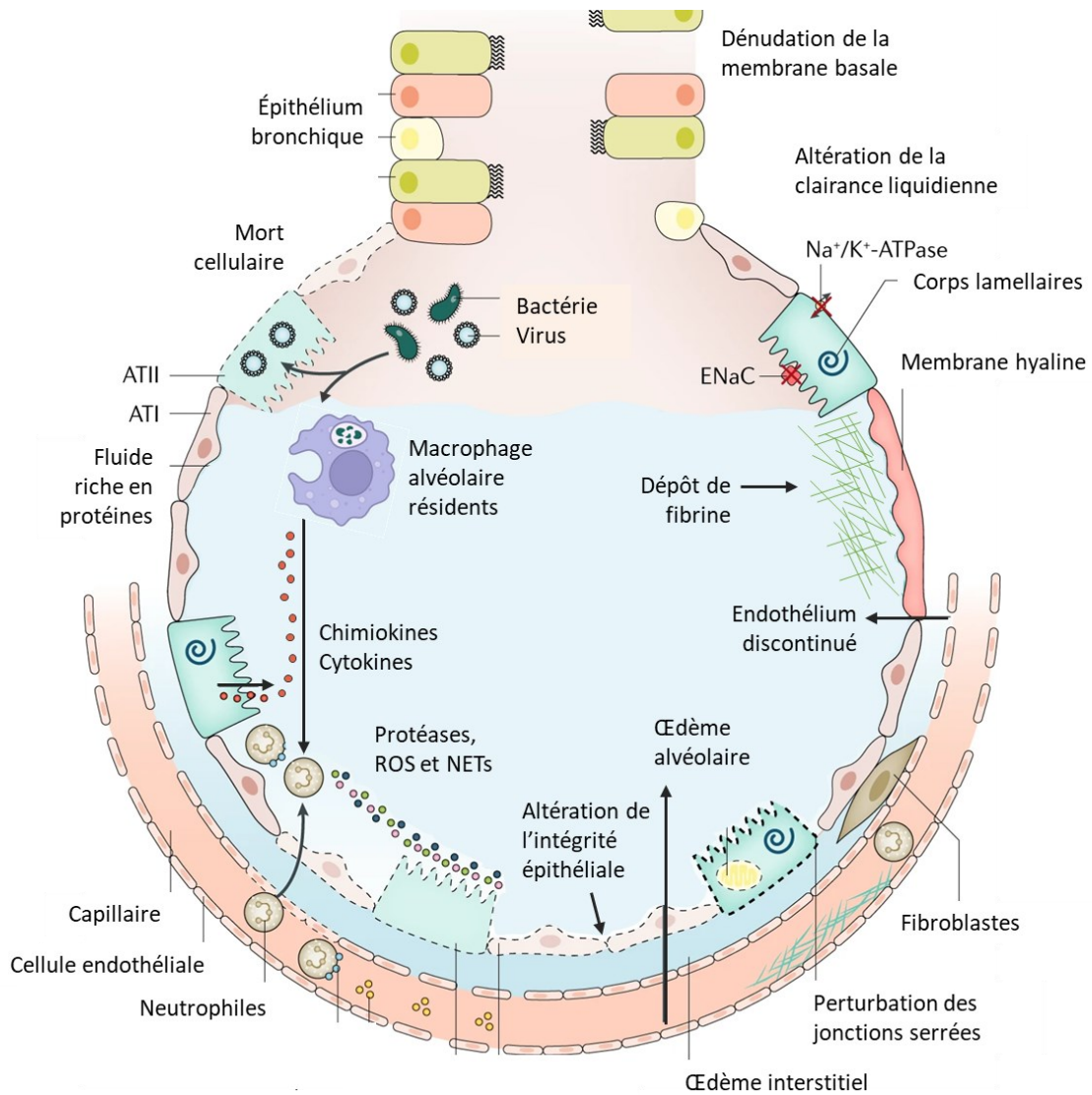


Figure 16. – Représentation des mécanismes lésionnels produits par le SDRA dans une alvéole

Les diverses lésions au niveau de l'endothélium et l'épithélium (perturbations des jonctions cellulaires et apoptose), développement d'un œdème interstitiel et alvéolaire, altération de la fonction de clairance alvéolaire et signalisation des cellules immunitaires sont représentées. Adapté de Matthay *et al.* (246).

1.4.5 Amélioration de la prise en charge ventilatoire et traitements pharmacologiques à l'étude

La prise en charge des patients SDRA s'est grandement améliorée au cours des dernières années. La plus importante des avancées fut l'implantation d'une stratégie ventilatoire protectrice (volume courant de 6 mL/kg par rapport au poids corporel, pression plateau constamment en dessous de 30 cmH₂O, pression expiratoire positive (PEP) au-dessus de 5 cmH₂O) qui a résulté en la diminution significative du taux de mortalité. La position du décubitus ventral, l'usage de bloqueurs neuromusculaires, la stratégie conservatrice de gestion des fluides et l'administration de corticostéroïdes sont des stratégies visant à conserver ou améliorer sa condition clinique, mais il n'existe à ce jour aucun traitement pouvant résoudre l'atteinte biologique (249).

Les nouvelles stratégies à l'étude devraient maintenant prioriser la résolution du SDRA grâce à un mécanisme cellulaire ou moléculaire particulier plutôt que l'amélioration des soins. Malheureusement, plusieurs stratégies (résumées dans la revue (250)) visant la réponse inflammatoire (corticostéroïdes, statines, agonistes des β 2-adrénergiques, antioxydants, inhibiteur d'élastase), la voie de la coagulation (héparine, aspirine) ou la réparation épithéliale (facteurs de croissance (KGF)) ont fait l'objet d'études cliniques de phase II et III, mais n'ont pas démontré d'impact positif significatif sur les différents paramètres cliniques du SDRA (246,250). Les corticostéroïdes (méthylprednisolone, dexaméthasone, hydrocortisone) ont fait l'objet de nombreuses études cliniques chez les patients SDRA (251–254). Les réponses des études cliniques et des méta-analyses ne permettent pas de conclure de façon claire sur un potentiel bénéfique de ces traitements à cause de la grande variabilité de la méthodologie expérimentale (notamment la dose, la voie d'administration, le moment de l'initiation et la durée du traitement, les paramètres mesurés). C'est dans l'optique de mieux comprendre ces résultats contradictoires que nous avons étudié le mécanisme d'action du dexaméthasone dans un modèle murin de SDRA (étude 1).

La recherche de nouvelles stratégies a connu un essor important durant la pandémie à COVID-19. En effet, le développement d'un SDRA peut faire suite à une infection pulmonaire par SARS-CoV-2. Bien que ce type de SDRA ait certaines particularités, il présente toujours une réponse

inflammatoire exacerbée (qualifiée de tempête inflammatoire). Plusieurs études ont porté sur l'efficacité d'anticorps monoclonaux ciblant la réponse inflammatoire (sarilumab, toxilizumab), des antiviraux (redemsivir) ou des inhibiteurs des voies de signalisation JAK-kinase (baricitinib) (255). En revanche, l'administration de corticostéroïdes (dexaméthasone) a permis d'observer une amélioration de la santé des patients COVID-19 sévères, mais n'avait jamais eu un aussi bon potentiel thérapeutique dans les cas de SDRA classiques, tel que détaillé plus haut (246,255).

De façon à mieux comprendre la pathophysiologie du SDRA et surtout d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, plusieurs modèles expérimentaux animaux ont été développés, en tentant de reproduire les mécanismes lésionnels spécifiques à ce syndrome.

1.4.6 Modèles expérimentaux *in vivo*

Tel que discuté dans la section précédente, le SDRA est un syndrome ayant de multiples origines. Le caractère hétérogène et complexe du SDRA fait en sorte qu'il n'existe aucun modèle expérimental animal capable de reproduire parfaitement sa physiopathologie. À ce jour, les modèles animaux sont souvent développés selon l'étiologie ou les symptômes. Malheureusement, les caractéristiques cliniques du SDRA chez l'humain ne peuvent pas être transposées à l'animal. Il s'agit notamment de l'une des raisons pour lesquelles les thérapies étudiées chez les animaux ne se sont malheureusement pas montrées efficaces en phase clinique chez l'humain.

Il est à noter que selon l'espèce (rongeurs ou grands animaux) ou la génétique (souche) de ces animaux, les dommages induits par le même stimulus peuvent être différents (256). Aussi, certains aspects biologiques entre les humains et les animaux font varier la réponse à l'insulte telle que la diversité des TRLs, la présence de macrophages pulmonaires intravasculaires ou la capacité de production d'oxyde nitrique (NO) (257). Expérimentalement, la cinétique du SDRA est également difficile à reproduire. Par exemple, l'instillation de LPS mime plutôt un modèle d'inflammation et non d'infection, car sa rapidité d'exécution n'est pas comparable à une pneumonie/septicémie qui progresse lentement. D'autres facteurs confondants sont également à considérer dans la modélisation du SDRA soit la durée expérimentale vs l'hospitalisation d'un

patient, l'utilisation de "jeunes" animaux vs l'âge moyen des patients SDRA et la sévérité des dommages induits (257).

Toutefois, la validité d'un modèle expérimental de dommages aigus pulmonaires (ALI) est basée sur un consensus produit en 2014 (258) et révisé tout récemment en 2022 (259). En résumé, les animaux soumis à une insulte doivent présenter trois de ces critères soit 1) des évidences histologiques de dommages tissulaires, 2) des altérations à la barrière alvéolo-capillaire, 3) une réponse inflammatoire et finalement 4) des évidences de dysfonction physiologiques (258,259). Chacun des modèles expérimentaux développés mime, de façon plus ou moins précise, certaines de ces caractéristiques pulmonaires avec des nuances propres à chacun. L'ensemble de ces modèles peut être divisé par le type d'atteintes (directes et indirectes), et plus récemment par la stratégie de combinaison (double insulte). La sévérité des paramètres clefs du SDRA est décrite dans les **Tableau #5** (atteintes directes), **Tableau #6** (atteintes indirectes) et **Tableau #7** (directes+indirectes). Les atteintes directes regroupent :

- L'instillation intratracheale (i.t.) de HCl :

Cette méthode consiste à recréer les impacts d'une aspiration de liquide gastrique, l'une des causes regroupant plus de 14% des cas de SDRA (239). La sévérité des dommages infligés corrèle avec la concentration d'HCl utilisée. Cependant, il faut se rappeler que cette solution pure d'HCl à pH 1.0-2.0 n'est pas identique au contenu gastrique de nature hétérogène (pH 3.0-4.0) (260,261).

- L'hyperoxie induite par l'administration prolongée (40-50h) d'une fraction d'oxygène à 60% (262) :

L'oxygène est alors responsable de la peroxydation des membranes lipidiques et de l'acide nucléique, un phénomène retrouvé dans les poumons de patients SDRA. Toutefois, le défaut de ce modèle consiste en son manque de relevance clinique, puisqu'une exposition à 100% d'oxygène pendant trois jours chez l'humain n'induit pas d'atteinte pulmonaire (261,263).

- Les dommages produits par la ventilation mécanique :

Ils peuvent être de premier ordre (par niveau élevé de courant, VILI) ou de deuxième ordre (en combinaison avec une insulte primaire tel que l'instillation de LPS). Cette technique est de bonne relevance clinique, mais malheureusement les animaux sont ventilés sur de courtes durées (environ 8 h) comparativement aux patients qui nécessitent ce support ventilatoire pendant plusieurs jours (263). De plus, la ventilation protectrice fait maintenant partie des recommandations dans la prise en charge du patient et les dommages induits par la ventilation se font donc maintenant plutôt rares.

- L'administration par voie intranasale (i.n.) ou intratrachéale (i.t.) de bléomycine :

La bléomycine (bléo) est un agent antinéoplasique/antibiotique utilisé dans le traitement de divers types de cancers. Son mode d'action consiste à créer des bris d'ADN et ainsi provoquer l'apoptose des cellulaires cancéreuses. Le poumon ne contient que très peu de son enzyme inactivante (hydrolase), entraînant ainsi des dommages aux cellules saines (261). Bien qu'il ne mime aucune des causes du SDRA, sa reproductibilité expérimentale et le développement de plusieurs caractéristiques majeures du SDRA sont un atout.

L'administration répétée de bléo est plutôt connue dans l'étude de la fibrose pulmonaire idiopathique (264). Toutefois, l'administration unique au poumon (par voie intranasale, i.n. ou intratrachéale, i.t.) permet le développement de tous les paramètres clefs de la phase aiguë du SDRA soit la production de dommages alvéolaires, le développement d'un œdème et d'une réponse inflammatoire dont les effets sont au maximum sept jours suivant l'insulte initiale. L'étude de l'étape fibrosante est également possible 10 à 28 jours suivant l'administration de bléo. Bien que ce modèle ne produise pas de membrane hyaline, il s'agit toutefois d'un bon modèle pour l'étude de la phase de récupération/réparation (264). Tous ces avantages expérimentaux nous ont conduits à choisir ce modèle pour plusieurs de nos études, rapportées dans ma thèse.

| Insulte pulmonaire directe (i.t) | | | | |
|--|--------|-----------|--------------|--------------|
| | HCl | Hyperoxie | Ventilatoire | Bléomycine |
| Lésions épithéliales | + | + | ++ | +++ |
| Lésions endothéliales | - | + | ++ | - |
| Hémorragie alvéolaire | + | + | ++ | - |
| Sévérité de l'inflammation interstitiel / alvéolaire | ++ | ++ | ++ | +++ |
| Types cellules immunitaires | Neutro | Macro | ++ | Neutro+Macro |
| Œdème | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Altération échange gazeux | +++ | ++ | ++ | ++ |

Tableau 5. – Caractéristiques de la pathophysiologie du SDRA présentes chez les modèles expérimentaux d'insultes pulmonaires directes

Les modèles animaux décrits ci-dessous sont ceux permettant de reproduire des insultes indirectes :

- L'injection intraveineuse (i.v) d'acide oléique :

Il s'agit d'un acide gras insaturé, connu pour être l'une des principales composantes d'une embolie lipidique suite à une fracture importante ou un trauma majeur (263). L'acide oléique est détecté dans le sang et les poumons de patients SDRA, mais dans très peu de cas (265). Malgré la bonne représentation des paramètres du SDRA chez l'humain, ce modèle demande une certaine agilité technique (injection i.v.) ce qui limite sa reproductibilité chez les petits animaux.

- La ligature et la ponction du cæcum (CLP) :

Ce modèle consiste à mimer une septicémie systémique. Pour ce faire, le cæcum est ligaturé et des ponctions avec une aiguille sont effectuées afin que le contenu intestinal se déverse dans la cavité péritonéale (261,262). Ainsi, cette péritonite progressera vers une septicémie, soit la deuxième cause majeure de SDRA. Plusieurs paramètres du SDRA sont adéquatement reproduits par cette méthode, toutefois les insultes pulmonaires sont moins sévères. De plus, la flore intestinale unique à chaque animal pourrait induire une hétérogénéité de la réponse et ne

peux être étudiée à plus long terme suite à la mortalité croissante en fonction du temps suivant l'insulte primaire (25% à 18 h et 70-90% à 30h) (263).

- Les dommages induits par brûlure :

Une brûlure au troisième degré sur 30-40% de la surface corporelle suivie d'une exposition à la fumée et l'application d'une ventilation mécanique pour assurer la survie est pratiquée afin de reproduire le SDRA développé chez les grands-brulés, soit 20% des cas (239,266). Ce modèle a l'avantage de reproduire la plupart des paramètres du SDRA, mais reste un modèle de courte durée (maximum 96 h), seulement reproductible chez le mouton (266). De plus, la manipulation de grands animaux et la faible disponibilité d'anticorps ou kits de détection spécifiques au mouton sont des aspects techniques limitants.

- L'injection intrapéritonéale (i.p.) de thiourée :

L' α -Naphthyl-thiourea (thio) est un rodenticide qui lorsqu'il est administré à de plus faibles doses provoque une hausse de la perméabilité endothéliale qui favorise le développement d'un œdème pulmonaire. L'œdème atteint un maximum quatre heures suivant l'injection puis les effets sont résolus entre 12 h à 48 h (262). Ce modèle n'implique pas de réponse inflammatoire et ne présente pas d'atteinte tissulaire importante. La caractérisation de l'histologie pulmonaire suite à l'exposition des rats à la thiourée démontre que l'exsudat œdémateux est présent dans les alvéoles, les conduits alvéolaires et les bronchioles, et ce de façon hétérogène. De plus, le septa alvéolaire et les capillaires ne semblent pas modifiés (267). Quelques années plus tard, il a été montré grâce à la microscopie électronique que les poumons de rats ayant reçu une injection de thiourée (i.p.) présentent un décrochement des cellules endothéliales de la membrane basale, mais que les ATI sont intactes et le fluide semble séreux, donc riche en protéines (268). Puisque ce modèle entraîne le développement d'un œdème pulmonaire, sans altération de l'épithélium alvéolaire, nous l'avons choisi pour l'étude des mécanismes impliqués dans la clairance liquidienne alvéolaire.

| Insulte pulmonaire indirecte (i.v/i.p) | | | | |
|---|---------------|------------------------------|---------|----------|
| | Acide oléique | Ligature Ponction-caecale | Brûlure | Thiourée |
| Lésions épithéliales | ++ | - | + | - |
| Lésions endothéliales | ++ | ++ | + | +++ |
| Hémorragie alvéolaire | ++ | + | + | - |
| Sévérité de l'inflammation interstitiel / alvéolaire | + | ++ | N/A | - |
| Types cellules immunitaires | Neutro | Neutro | N/A | - |
| Œdème | +++ | + | + | +++ |
| Altération échange gazeux | +++ | + | ++ | ++ |

Tableau 6. – Caractéristiques de la pathophysiologie du SDRA présentes dans les modèles expérimentaux d'insultes pulmonaires indirectes

De plus, il existe des modèles de nature bactérienne et chirurgicale qui, dépendamment de leur voie d'application, peuvent reproduire des insultes de type directes ou indirectes.

- L'administration de produits bactériens (LPS) ou de bactéries vivantes par voie i.t (pneumonie) ou par voie i.p. ou i.v. (septicémie) :

Ces modèles peuvent reproduire les deux causes les plus fréquentes de SDRA (269). En revanche, les deux types d'atteintes sont différents dans la sévérité des dommages pulmonaires. L'administration chez les grands animaux par voies i.t./i.v. provoquent également des réponses biologiques différentes. L'endotoxine reste un modèle incomplet puisqu'il ne contient pas les autres facteurs toxiques pouvant être sécrétés par la bactérie. Cependant, moins de 50% des cas de sepsis ont une présence bactérienne pulmonaire et la présence seule de bactéries n'est pas associée au développement sévère du SDRA (261). L'administration du LPS est toutefois facile à pratiquer et utile si l'on désire évaluer la réponse immune.

- Les lésions pulmonaires induites par un procédé chirurgical d'ischémie-reperfusion (I/R) :

Ces lésions peuvent être pratiquées par clampage du hile pulmonaire de façon unilatérale (lésion directe) ou par clampage/déclampage de l'artère mésentérique supérieure (grand animal) /l'artère supracœliaque (petit animal) (lésions indirectes)(261,270). Ces lésions sont

représentatives des complications qui surviennent à la suite d'une transplantation pulmonaire. Malgré sa difficulté d'exécution, sa ressemblance avec le SDRA ajoute à sa valeur clinique et il peut être adapté vers une manipulation *ex vivo* (263).

| Insulte pouvant être d'origines directes ou indirectes | | | | |
|---|-----------|----------------|-------------|---------------|
| | LPS (i.t) | LPS (i.v/i.p.) | I/R directe | I/R indirecte |
| Lésions épithéliales | + | - | +/- | + |
| Lésions endothéliales | - | ++ | N/A | N/A |
| Hémorragie alvéolaire | - | - | + | N/A |
| Sévérité de l'inflammation interstitiel / alvéolaire | ++ | + | ++ | + |
| Types cellules immunitaires | Neutro | Neutro | Neutro | Neutro |
| Œdème | + | + | ++ | + |
| Altération échange gazeux | + | + | N/A | N/A |

Tableau 7. – Caractéristiques de la pathophysiologie du SDRA présentes dans les modèles expérimentaux d'insultes directes et indirectes

Depuis quelques années, les modèles expérimentaux de double insulte sont en développement et semblent plus pertinents afin de reproduire la réalité clinique. Généralement, la combinaison d'insultes de natures différentes induit une aggravation des dommages pulmonaires. La combinaison d'une insulte primaire (HCl /LPS) suivie par la ventilation mécanique est l'un des modèles les plus souvent recensés (271). Cela permet de maintenir l'animal en vie plus longtemps et donc de prolonger la durée d'observation. D'autres combinaisons sont également à l'étude comme la déplétion de surfactant + ventilation mécanique, la ligature-ponction cœcale + hémorragie ou l'instillation de LPS + une transfusion sanguine (272). En résumé, les modèles expérimentaux ont tous leurs avantages et désavantages et chaque modèle permet de mieux comprendre certains aspects de la physiopathologie du SDRA. L'étude des différents mécanismes lésionnels et de la phase de résolution est possible grâce à la diversité de ces modèles animaux.

Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs

Le SDRA est une forme de défaillance respiratoire grave aux unités de soins intensifs. Malgré l'amélioration des soins ventilatoires, le taux de mortalité demeure élevé. Le SDRA présente des phénotypes biologiques hétérogènes compliquant la recherche de nouvelles thérapies et, encore à ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique efficace pour résoudre le SDRA. La phase exsudative du SDRA est caractérisée par de sévères dommages alvéolaires, suivis d'une infiltration de fluides œdémateux inflammatoires dans l'espace alvéolaire. La découverte de nouvelles stratégies permettant de résoudre les principaux paramètres du SDRA devra se focaliser sur 1) la diminution de la réponse inflammatoire, 2) l'amélioration de la clairance liquidienne pulmonaire et ainsi la résolution de l'œdème et 3) la régénération d'un épithélium alvéolaire intègre et fonctionnel afin de retrouver une fonction pulmonaire adéquate avant l'établissement d'une fibrose pulmonaire. Les nombreux échecs des études cliniques ou *in vivo* sont, en partie, expliqués par le fait que cibler une seule composante du SDRA n'est pas suffisant, probablement à cause de la présence de dommages alvéolaires résiduels. Des thérapies combinant des effets bénéfiques sur la clairance liquidienne et proréparatrice constitueraient donc une voie intéressante.

2.1 Hypothèse de recherche

Nous avons donc posé l'hypothèse que cibler un seul des paramètres de la phase aiguë du SDRA est insuffisant et que des thérapies ayant comme cible simultanée la résolution de l'inflammation, de l'œdème pulmonaire et des dommages épithéliaux favoriseraient la résolution de la phase exsudative du SDRA.

2.2 Objectif général

L'objectif général de mon projet de doctorat était donc de mieux comprendre les processus de résolution du SDRA et de tester, avec des modèles complémentaires *in vivo*, différentes stratégies ciblant l'inflammation, évaluant la contribution du canal ENaC pour la clairance alvéolaire et visant à combiner des effets pro-réparateurs pour la résolution des paramètres du SDRA.

2.2.1 Objectifs spécifiques

2.2.1.1 Étude #1

Étant donné leurs propriétés anti-inflammatoires, l'efficacité des corticostéroïdes a été évaluée dans divers essais cliniques, révélant des résultats contradictoires (voir section 1.4.5). L'objectif de ma première étude était donc de disséquer l'effet d'un traitement quotidien avec un anti-inflammatoire à large spectre, le glucocorticoïde dexaméthasone, sur les paramètres de la phase aiguë exsudative caractéristiques du SDRA, dans un modèle murin de lésions aiguës induites par la bléomycine (bléo).

2.2.1.2 Étude #2

Une étude précédente de la littérature avait démontré l'effet létal de l'absence totale de la sous-unité alpha du canal ENaC dans les souris à la naissance, faute de pouvoir réabsorber les liquides alvéolaires (75). Les souris présentant une expression partielle de ENaC (souris α ENaC(-/-)Tg+) survivent à la naissance, mais il n'avait pas encore été défini comment cette variation d'expression pouvait influencer la résolution des paramètres du SDRA. La deuxième étude avait donc pour objectif de comparer les paramètres caractéristiques de la phase aiguë du SDRA reproduit grâce au modèle expérimental de dommages alvéolaires induits par la bléomycine, dans des souris présentant un niveau normal (souris WT) ou réduit (souris α ENaC(-/-)Tg+) du canal ENaC.

2.2.1.3 Étude #3

Les études antérieures du laboratoire (151,154,173,178) ont démontré qu'une classe particulière de canaux ioniques, les canaux K^+ , jouait un rôle dans plusieurs de ces processus, soit dans le contrôle ionique et liquidien par les cellules alvéolaires *in vitro* et dans les mécanismes de réparation épithéliale.

Ma troisième étude avait pour objectif d'investiguer la fonction de KvLQT1 *in vivo*, en utilisant des approches complémentaires, moléculaires (souris KO pour le gène *Kcnq1* du canal KvLQT1) et pharmacologiques (avec un activateur de ce canal), en condition physiologique et dans un modèle

d'œdème pulmonaire induit par la thiourée afin d'évaluer l'impact de sa modulation sur les mécanismes de clairance liquidienne alvéolaire.

2.2.1.4 Étude #4

L'objectif consistait à évaluer si la modulation génique du canal KvLQT1 (dans les souris KO pour le gène *Kcnq1*) avait un impact sur le développement des paramètres caractéristiques de la phase aiguë exsudative du SDRA dans le modèle murin de lésions aiguës induites par la bléomycine.

2.2.1.5 Étude #5

Mon dernier objectif était d'évaluer l'impact de l'activation pharmacologique du KvLQT1 pour la résolution des paramètres caractéristiques de la phase aiguë exsudative du SDRA dans le modèle murin de lésions induites par la bléomycine.

Chapitre 3 : Absence d'effet bénéfique du dexaméthasone dans la résolution des lésions pulmonaires aiguës dans un modèle murin

3.1 Statut de l'article #1

Titre: **Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice**

Auteurs: Aubin Vega Mélissa*, Chupin Cécile*, Pascariu Mihai, Privé Anik, Dagenais André, Berthiaume Yves, Brochiero Emmanuelle

Statut: Publié dans *Physiological Reports* (273) en 2019 (voir annexe A pour la référence 273)

Contribution: Les expérimentations *in vivo* ont initialement été réalisées par une étudiante (C. Chupin) qui avait quitté avant mon arrivée au doctorat. J'ai donc repris l'ensemble du projet en étant responsable de l'extraction et la compilation des données brutes des expérimentations animales et cellulaires, leur analyse et interprétation, la production des figures, la rédaction du manuscrit et des révisions à la suite de la revue par les pairs.

3.2 Mise en contexte

La composante inflammatoire est l'un des éléments majeurs dans le développement du SDRA (246). Bien qu'il soit essentiel de produire une réponse anti-inflammatoire pour défendre l'organisme, un déséquilibre ou un excès dans cette réponse peut générer un cycle de dommages. La réponse inflammatoire constitue donc l'une des cibles pour la résolution du SDRA et les agents anti-inflammatoires ont fait l'objet de plusieurs études. En effet, de nombreuses approches ont été testées soit par les inhibiteurs d'élastase neutrophiliques (étude STRIVE, sivelestat), les statines (SAILS trial, rosuvastatin), les thérapies visant le TNF- α (anticorps monoclonaux, afelimomab) ou l'administration de glucocorticoïdes (methylprednisolone, dexaméthasone, hydrocortisone) (274–276). Malheureusement, plusieurs de ces études cliniques et analyses de métadonnées ont révélé des résultats contradictoires sur le bénéfice de ces traitements qui pourraient être dus à des facteurs de confusion dans la mise en place du protocole

clinique tels que l'inclusion de cas non sévère de SDRA ou l'usage de ventilation non protectrice. De plus récentes études cliniques réalisées chez des patients SDRA induits par la COVID-19 ont révélé un impact bénéfique de la prise de dexaméthasone sur la période de ventilation sur 28 jours (277). Finalement, le dexaméthasone est toujours utilisé aux unités de soins intensifs, mais son fonctionnement cellulaire dans un contexte de dommages induits aux alvéoles n'a pas été étudié auparavant.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle expérimental de dommages pulmonaires induits par la bléomycine afin de reproduire la phase aiguë du SDRA. Ces animaux ont été traités quotidiennement avec de la dexaméthasone par injection intrapéritonéale puis la collecte de données ou de tissus a été faite sept jours suivant l'insulte primaire.

3.3 Manuscrit de l'article #1

DEXAMETHASONE FAILS TO IMPROVE BLEOMYCIN-INDUCED ACUTE LUNG INJURY IN MICE

Aubin Vega M^{1,2*}, Chupin C^{1,2,*}, Pascariu M^{2,3}, Privé A¹, Dagenais A³, Berthiaume Y^{1,2,3#}, Brochiero E^{1,2#}


* Co-first authors; # Co-senior authors

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada

Email addresses:

melissa.aubin.vega@umontreal.ca; 
anik.prive.chum@ssss.gouv.qc.ca; andre.dagenais@criucpq.ulaval.ca;
yves.berthiaume@umontreal.ca; emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) features an exudative phase characterized by alveolar damage, lung edema and exacerbated inflammatory response. Given their anti-inflammatory properties, the potential therapeutic effect of corticosteroids has been evaluated in ARDS clinical trials and experimental models of ALI. These studies produced contradictory results. Therefore, our aim was to investigate the effects of dexamethasone in an animal model of bleomycin-induced acute lung injury and then to determine if the lack of response could be related to an impairment in repair ability of alveolar epithelial cells after injury.

NMRI mice were challenged with bleomycin and then treated daily with dexamethasone or saline. Bronchoalveolar lavages (BAL) and lungs were collected for assessment of the inflammatory response and wet/dry ratio (lung edema) and for histological analyses. The effect of bleomycin and dexamethasone on wound repair was also evaluated *in vitro* on primary alveolar epithelial cell (AII) cultures.

Our data first showed that dexamethasone treatment did not reduce the weight loss or mortality rates induced by bleomycin. Although the TNF- α level in BAL of bleomycin-treated mice was reduced by dexamethasone, the neutrophil infiltration remained unchanged. Dexamethasone also failed to reduce lung edema and damage scores. Finally, bleomycin elicited a time- and dose-dependent reduction in repair rates of AII cell cultures. This inhibitory effect was further enhanced by dexamethasone, which also affected the expression of β 3- and β 6-integrins, key proteins of alveolar repair.

Altogether, our data indicate that the inability of dexamethasone to improve the resolution of ALI might be due to his deleterious effect on the alveolar epithelium repair.

KEYWORDS: acute lung injury; acute respiratory distress syndrome, inflammation, edema, repair, dexamethasone, bleomycin

ABBREVIATIONS LIST

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; ALI: Acute lung injury; Bleo: bleomycin; Dex: dexamethasone; AII: alveolar type II cells; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; W/D: wet-to-dry ratio; BAL: bronchoalveolar lavages.

INTRODUCTION

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) ^[1,2], a severe form of respiratory failure, remains one of the leading causes of mortality both in adults and children in intensive care units. Various disorders, either direct (e.g., pneumonia, gastric content aspiration) or indirect (e.g., sepsis, trauma), are associated with the development of ARDS ^[3,4]. However, regardless of the causes, ARDS features overlapping exudative, proliferative and fibrotic phases. The acute exudative phase is characterized by extensive alveolar epithelial and endothelial damage, eliciting alveolar edema, neutrophil infiltration, high levels of chemokines/cytokines and decreased lung compliance ^[3,4]. Collagen deposition and fibroproliferation, competing with epithelial repair, can rapidly progress toward irreversible pulmonary fibrosis, ultimately leading to respiratory failure ^[1,4,5]. Therefore, the resolution of the acute phase is pivotal for ARDS recovery.

Although improvements in mechanical ventilation procedures have been associated with increased survival over the last decades ^[1,2], mortality rates (30-45%) still remain unacceptably high, and effective, noninvasive pharmacological therapies are needed. Because the inflammatory response is a key determinant of ARDS, several studies have evaluated the efficiency of anti-inflammatory therapies. One of the most studied therapy has been systemic corticosteroids. Clinical trials on ARDS patients and subsequent meta analyses ^[6-14] as well as experimental studies in animal models of acute lung injury (ALI) ^[15-21] have indicated that glucocorticoids (e.g., methylprednisolone, dexamethasone, hydrocortisone) elicit variable effects as a function of the dose, the route of administration, the time to treatment initiation and duration, the age of the patient, the cause of ARDS / type of ALI model and/or the measured outcomes. Therefore, the available evidence for glucocorticoids benefits in ARDS is conflicting and the use of these treatments in ARDS patients are still subject to debate ^[22-28].

The goal of our study was first to dissect the effect of daily treatments with dexamethasone in an experimental model of ALI in mice. We opted for the well-characterized model of bleomycin-induced lung injury and focused our study on the acute exudative phase, featuring an endothelial/alveolar epithelial damage, lung edema, neutrophil infiltration and decreased lung

function (over a 7-day period), before establishment of fibrosis (day-12-21) [29–31]. The effect of the dexamethasone treatment was evaluated by assessing mouse survival, lung edema, inflammatory response and alveolar injury after the bleomycin challenge. Our data indicated that dexamethasone reduced TNF- α levels but failed to improve mouse survival or to reduce lung edema, neutrophil infiltration and injury scores after bleomycin. We then hypothesized that dexamethasone may impair the repair ability of alveolar epithelial cells after injury. We thus analyzed the effect of bleomycin and dexamethasone *in vitro* on the wound healing of primary alveolar epithelial cell cultures and showed that dexamethasone worsened the deleterious effect of bleomycin on the repair rates.

MATERIAL AND METHODS

In vivo experimental design

Wild-type NMRI mice (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA) were kindly gifted by Dr. Hummler (Lauzanne, Switzerland.) All procedures were conducted according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC), and the experimental protocol was approved by the Institutional Animal Protection Committee (CIPA) of the Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Animals were sheltered under standard conditions with food and water provided *ad libitum*. Experiments were conducted on 7- to 10-week-old male mice, randomly divided into 4 groups: Ctl (control, instillation of saline and daily intra-peritoneal (i.p.) treatment with saline), Bleo (instillation with bleomycin and daily i.p. treatment with saline), Dex (instillation with saline and daily i.p. treatment with dexamethasone) and Bleo+Dex (instillation with bleomycin and daily i.p. treatment with dexamethasone). More precisely, mice were anesthetized at day 1 with a solution (0.01 ml/g) of 13% ketamine (100 mg/ml) and 1.3% xylazine (20 mg/ml) in 0.9% saline. Then, animals were instilled intratracheally (i.t.) with saline (0.9%, 50 μ l) or bleomycin (MaynePharma Canada, QC, Canada, 4 U/kg, 50 μ l) following a modified non-surgical and non-damaging method [32]. Immediately after instillation of saline or bleomycin, mice were treated with dexamethasone (Sandoz Canada, QC, Canada, 0.5 mg/kg, 100 μ l) or vehicle (saline 0.9%, 100 μ l) by i.p. Treatments (saline or dexamethasone) were repeated daily and outcomes (see below) were measured 3, 7 and/or 12 days after the bleomycin

challenge, corresponding to the development of acute lung injury, as described in the literature [29–31]. As supplementary experiments (**Supplementary Figure 1**), a group was treated with methylprednisolone (NovoPharm, QC, Canada, 1 mg/kg, 100 µl, daily, i.p. treatment).

Mice survival rates and weight variation

The mice weight variations were calculated from the measured weights at each time point (days 3, 7 and 12), including before sacrifice of mice reaching the endpoints (see below), and reported as % of the initial weight before the bleomycin challenge. In compliance with the CCAC standards and following daily animal assessment by the CRCHUM animal care personnel, mice reaching endpoints (respiratory failure, prostration, uncontrollable pain, dehydration, or loss of more than 30% of the initial weight), were sacrificed according to the procedure approved by the CRCHUM institutional animal care committee. To avoid a potential bias by studying the animals with the better outcomes, animals reaching endpoints were included in the calculation of the weight variation and survival rates (which were reported as % of the live mice in each group at 3, 7 and 12 days after the beginning of the bleomycin challenge). Subsequent experiments, for the measurement of lung edema, tissue injury and inflammatory response (see below), were performed during the acute exudative phase (day 3 and 7). It has to be noted that at these time points no (day 3) or small (day 7, <10%) mortality rates were observed.

Edema index (wet/dry ratio)

After euthanasia (with 0.02 ml/g, ketamine-xylazine) on days 3 and 7, the inferior *vena cava* was severed, the lungs were removed and directly weighed (wet weight). Lungs were heated to 95°C for 24 h to measure the dry weight and then to calculate the wet/dry ratio.

Bronchoalveolar lavages (BAL)

In another series of experiments, BAL were performed after mouse euthanasia (at days 3 and 7, in each condition) by instillation of saline (1 mL) through a catheter and then gentle aspiration. Six repeated BAL (from the same mouse) were collected and pooled on ice before centrifugation

(200 g, 4°C, 8 min). The supernatants were stored at -80°C until subsequent use to determine protein concentration and TNF- α levels.

The protein concentration in BAL supernatants was evaluated by the Bradford method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON, Canada). TNF- α levels in BAL supernatant samples were measured by AlphaLISA technology (AL505 C/F, PerkinElmer, Montreal, QC, Canada). Following the manufacturer's recommendation, experiments were performed in triplicate at room temperature, and TNF- α concentrations (pg/ml) were estimated from a TNF- α standard curve (dynamic range from 2.0 to 30,000 pg/ml) after reading with the EnVision-Alpha Reader (PerkinElmer).

Cell pellets were resuspended in 500 μ l of PBS for quantification of the total cell count. The cell suspensions were then diluted at a density of 1×10^6 cells/ml, cytocentrifuged (300 rpm, 3 min, Shandon Cytospin 3 Centrifuge, Block Scientific, NY, USA) onto glass slides (4×10^4 cells/slide) and stained with Hema-3[®] (Fisher, US). The differential cell count (number of neutrophils, macrophages, lymphocytes and eosinophils (reported as percentage) among a total of 400 leukocytes) was then determined.

Histological analysis and lung damage severity scores

Mice lungs, collected 7 days after the initial bleomycin challenge, were fixed by immersion in a 10% formalin solution, embedded in paraffin and the sections were stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols at the Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC, Université de Montréal). Blind histological analysis was performed by Dr. Louis Gaboury (pathologist, Histology and Molecular Pathology research unit, University of Montréal), who defined a qualitative severity score (from 0 to 4), adapted from a well-recognized scoring system to evaluate experimental ALI in animals [33] and incorporating the following criteria: the presence of mononucleated cells/macrophages, polymorphonuclear, fibrinous exudate/hyaline membranes, widening of the septae, regenerative atypias/karyomegaly, intraalveolar hemorrhage, pneumocyte sloughing/cell debris, bronchial exudate, congestion/edema and consolidation. The results were expressed as the percentage of mice with each severity grade

(from 0 to 4) of lung damage within the treatment group. Specimens were photographed using a digital camera (DP71) mounted on an Olympus BX61 microscope.

Alveolar epithelial cell (ATII) isolation and primary culture

Alveolar epithelial cells (ATII) were isolated from adult male Sprague-Dawley rats (6–7 weeks, Charles-River, St-Constant, Qc) according to a well-established protocol [34–36]. Briefly, lungs were washed with a physiological solution to remove excess blood cells and alveolar macrophages. Then, the lungs were digested with 160U/rat elastase solution (Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. USA) and minced, and the resulting cell suspension was filtered. Alveolar cells were purified using a differential adherence technique [37], which enhances the purity of the ATII cell pool by up to 86% [38]. The freshly isolated ATII cell suspension was then seeded on 6 or 12-well cell culture clusters (Corning) and cultured in minimum essential medium (MEM, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Canada), 0.2% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 0.01 M HEPES (Thermo-Fisher Scientific Inc.), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Canada), 0.08 mg/l gentamicin (Life Technologies) and Septra (Aspri Pharma Canada, Canada, 3 g/ml trimethoprim and 17 g/ml sulfamethoxazole) at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator. This medium was replaced by MEM + 10% FBS without Septra at day 4, as previously described [34,36,39,40]. Well clusters with ATII cells from the same animal were then randomly divided into the different experimental conditions (treatments, see below) and experiments repeated on cell cultures from at least 4 animals (as indicated in the figure legend).

Wound-healing assays

At day 2 of primary culture, ATII cell monolayers were treated, or not, for 24 h with dexamethasone (100 nM in MEM medium supplemented with FBS and Septra (see above)). At day 3, mechanical injuries with a P10 Gilson pipette tip (6 wounds per Petri dish) were performed according to a well-established, highly reproducible technique [41–43]. Immediately after injury (T0), the monolayers were then washed (with MEM + FBS without Septra) to remove detached cells, and the injured monolayers were treated with bleomycin (Bleo, 12.5 - 200 mU/ml), dexamethasone (Dex, 100 nM), a combination of bleomycin and dexamethasone (Bleo+Dex) or

vehicle (Ctl, saline 0,9%). Monolayers were photographed with a NIKON camera under light microscopy at T0, T24 h, T36 h and T48 h after injury. A mark under the Petri dishes allowed us to photograph the wounds at exactly the same place at every time point. After analysis with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), the wound area was measured, and the wound healing rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) were calculated. Wound healing assays on cell monolayers provide insight into the initial repair processes engaged after injury (mainly cell migration and proliferation).

ATII cell apoptosis

ATII cells were collected after a 24h treatment with bleomycin (Bleo, 50 mU/ml), dexamethasone (Dex, 100 nM), a combination of bleomycin and dexamethasone (Bleo+Dex) or vehicle (Ctl, saline 0,9%) and then caspase-3/7 activity was determined by luminescent assay (630/595 nm) using the Caspase Glo kit (Promega), following the manufacturer instructions.

Immunoblotting

Freshly isolated primary ATII cells were seeded (2.5×10^6 cells/well) in 6-well cell culture clusters (Costar; Corning, Corning, NY). At day 4, ATII cell monolayers were treated with bleomycin (Bleo, 50 mU/ml), dexamethasone (Dex, 100 nM), a combination of bleomycin and dexamethasone (Bleo+Dex) or vehicle (DMSO) and total proteins were extracted 24 h later. Briefly, ATII cell monolayers were washed twice with PBS, scraped with 200 μL /well lysis buffer (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, TRIS 50 mM, Triton X-100 1%, pH 7.5, plus a cocktail of proteases/phosphatases inhibitors (Sigma)). The suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and protein content was evaluated by the Bradford method. Sample proteins were denatured at 95°C for 10 min, separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to a PVDF membrane. PVDF membranes were first blocked with 5% powdered milk in Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h at room temperature and then washed three times with TBST before overnight incubation (at 4°C) with anti- β 3-integrin (Abcam, dilution 1:1000, TBST + 5% Bovine serum albumin (BSA, Sigma)), anti- β 6-integrin (Santa Cruz / Millipore, dilution 1:1000, TBST + 5% BSA), anti- β -actin (Sigma, 1:1000, TBST + 5% BSA) or anti-pan-actin (Cell signaling, 1:1000, TBST + 5% BSA) antibodies. Membranes were then washed with TBST and incubated with horseradish

peroxidase-labeled secondary antibody (goat anti-rabbit (Santa Cruz / Cell signaling), mouse anti-goat (Santa Cruz) and goat anti-mouse (Sigma / Abcam), dilution 1:1000, TBST + 5% powdered milk). Membranes were rinsed (TBST, 3x15 min) and incubated with a luminescent reactive Immun-Star WesternC Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) or Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer). The intensity of each band was measured with a ChemiDoc system (BioRad Laboratories Inc.), quantified with the Image Lab program (BioRad Laboratories Inc.) and normalized to the actin signal. Protein expression is presented as a percentage of the control condition (100%).

Statistical analysis

Mice survival rates (**Fig. 1**) are presented as percentages (%) of living mice compared to the initial group for each treatment group, while lung damage scores (**Fig. 4B**) are presented as a repartition of mice with each damage score (expressed as % of the total number of mice in each treatment group). All other data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 software (CA, USA). Agostino/Pearson normality tests were first performed, followed by statistical tests, adapted to each type of experiment, as specified in figure legends. *p* values are also indicated for each series of experiments (*p* values < 0.05 (*)) were considered significant).

RESULTS

While progressive weight gain was observed in the control (Ctl) group as a function of time (at days 3, 7 and 12), lung delivery of bleomycin (Bleo, 4 U/kg) caused a significant weight loss at days 7 and 12 (**Figure 1A**). However, daily (i.p.) treatment with dexamethasone (0.5 mg/kg) in mice with bleomycin-induced lung injury (Bleo+Dex group) did not prevent weight loss.

A 100% survival rate was observed in the control (Ctl) and dexamethasone (Dex) groups at each time points, whereas the bleomycin challenge (Bleo and Bleo+Dex groups) induced an increasing mortality rate (*p*<0.05). Dexamethasone treatment (Bleo+Dex) did not significantly improve the survival. (**Figure 1B**).

In subsequent experiments, the effect of dexamethasone on the bleomycin outcomes was measured during the acute exudative phase, i.e., at 3 and 7 days. We first evaluated the levels of the TNF- α cytokine, which plays a key role in alveolar epithelial damage and dysfunction in acute lung injury^[44]. We found that exposure to bleomycin was associated with a significant increase in TNF- α in the BAL collected at day 3 (Bleo and Bleo+dex group, **Figure 2A**), and that the TNF- α levels in the Bleo+Dex group were significantly lower compared to the Bleo group on day 3. The same trend was observed at day 7, although the variations were not statistically significant. Elevated total leukocyte cell counts in BAL were observed at day 7 in the Bleo and Bleo+Dex conditions (**Figure 2B**). Differential cell count then revealed that compared to that in the control group, a significant increase in the proportion of neutrophils was observed in the BAL of mice challenged with bleomycin (**Figure 2C**). The proportion of neutrophils was similar in the Bleo+Dex group. This increase in neutrophils induced by bleomycin was associated with a parallel decrease in the proportion of macrophages in both the Bleo and Bleo+Dex groups (**Figure 2D**). The proportion of lymphocytes and eosinophils were lower than 5% in all experimental conditions (**Figure 2E and 2F**).

Edema flooding was also associated with the bleomycin-induced damage of the alveolar epithelial/endothelial barriers. Indeed, at day 7 the wet/dry (W/D) ratio is significantly higher in bleomycin-challenged mice (6.1 ± 0.2), compared to the control condition (4.6 ± 0.1) (**Figure 3, right panel**). Moreover, dexamethasone treatment did not prevent bleomycin-induced edema. Similarly to dexamethasone, another corticosteroid (methylprednisolone, **Supplementary Figure 1**) did not elicit any beneficial effect on lung edema in bleomycin mice.

Because the observed inability to clear the lung edema could be due to persistent alveolar damage in the presence of bleomycin and dexamethasone, histological analyses (**Figure 4**) were then performed. Substantial lung injury was observed in the presence of bleomycin, with injury scores of 2 and 3 in 50% and 33.3% of mice, respectively (**Figure 4B**). Mice in the Bleo+Dex group exhibited severe injury scores [2 (16.7%), 3 (66.7%) and 4 (16.7%)]. Alveolar damage was also

associated with a significant increase in the protein concentration in the BAL of mice as early as day 3 in the Bleo+Dex group and at day 7 in the Bleo condition (**Figure 4C**).

We then hypothesized that this persistent alveolar damage could be due to a deleterious effect of bleomycin and dexamethasone on the repair capacity of alveolar cells. To test this hypothesis, we then performed a series of wound healing assays on primary alveolar epithelial (AII) cell cultures. As depicted in **Figure 5A**, a time- (over a 48 h period after injury) and dose- (12.5 to 200 mU/ml) dependent inhibition of the wound healing rates was observed in the presence of bleomycin. Because a dose of 50 mU/ml significantly decreased the repair rates at every time point, this concentration was used in subsequent experiments (**Figure 5B-D**). Our data showed that a 24 h treatment with dexamethasone (100 nM, a dose previously shown to elicit biological effects on AII cells ^[36,45] alone significantly reduced the wound healing rates ($21,304 \pm 1,328$ vs $31,523.1 \pm 1,519$ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ in control condition) and further dampened the repair rates measured in the presence of bleomycin ($23,642.9 \pm 1,484$ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ and $13,671 \pm 2,416$ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ in Bleo and Bleo+Dex, respectively).

A pro-apoptotic effect of bleomycin has been established in several cell models ^[46,47]. In agreement with these previous reports, a significant increase in caspase 3/7 activity was noted in bleomycin-treated AII cells (in Bleo and Bleo+Dex conditions, compared to Ctl and Dex, respectively) (**Figure 5D**). Although, AII cell apoptosis was slightly lower in the presence of Dex (Bleo+Dex, compared to Bleo alone), the decrease was not statistically significant.

The negative effect of dexamethasone on wound healing was associated with a significant decrease in the expression of two key proteins of alveolar repair, i.e., β 3- and β 6-integrins (37 and 55% decrease, compared to the control condition, when the cells were treated with dexamethasone (**Figure 6**)). A significant reduction in β 6-integrin expression was also observed after exposure to bleomycin. The Bleo+Dex combination also induced a decrease in β 3- and β 6-integrins (although non-statistically significant for β 6-integrin).

DISCUSSION

Although dexamethasone treatment efficiently prevented the TNF- α response after bleomycin-induced lung injury, our experiments showed that it failed to reduce the neutrophil infiltration in BAL, weight loss and mortality rates, as well as lung edema and injury scores. Our data support the hypothesis that this inability of dexamethasone to improve the resolution of bleomycin outcomes may be due to its damaging effect on the repair capacity of the alveolar epithelium.

Our data first showed that daily treatments with dexamethasone over a 12-day period failed to prevent weight loss associated with the inflammatory response after the bleomycin challenge. The muscle atrophy induced by glucocorticoids might also be responsible for this inability to gain weight [48,49]. Our study also demonstrated that the number of mice requesting euthanasia because they reached endpoints was similar in the Bleo and Bleo+Dex experimental groups. These findings are in agreement with previous reports indicating that dexamethasone did not reduce weight loss and/or mortality rates in experimental models of acute lung injury [16,50].

Our results also show that although dexamethasone treatment efficiently dampened the early TNF- α increase (at day 3), it did not impair the inflammatory response or the injury process. Indeed, the increase in neutrophils, the elevated protein content measured in the BAL, the injury score and the increase in the wet/dry lung weight ratio in the presence of bleomycin on day 7 were not attenuated by dexamethasone, at the tested dose. This persistent neutrophil infiltration most likely contributes to the epithelial injury [4,51] observed in our histological analyses. This inability of dexamethasone to protect/improve the alveolar barrier has also been observed in other models of severe acute lung injury [16–18,21]. Indeed, our results are in phase with the variable response observed following dexamethasone treatment of lung-injured animals. In agreement with our findings, reduced TNF- α levels were observed in bleomycin + dexamethasone-treated rats compared to those in the bleomycin condition [52]. Yubero et al. also reported that intramuscular injection of dexamethasone (1 mg/kg), 1 h after induction of lung injury due to acute pancreatitis in rats, downregulated inflammatory factors but did not reduce leukocyte infiltration [17]. However, i.v. administration of dexamethasone at the initiation of ventilation-induced lung injury in mice has been shown to attenuate both inflammatory mediator expression

(KC, MCP-1, IL-1 β , IL-6) in lung tissues and neutrophil infiltration in BAL [18]. In contrast, neither cellular infiltration nor cytokine release were inhibited by dexamethasone in a model of acute lung injury induced by the H5N1 virus in mice [16] and in ventilated adult sheep with early phase acute respiratory distress syndrome [21]. Although the variability observed is in part secondary to the outcomes that are measured, the administration of dexamethasone alone does not appear to be efficient in reversing the evolution of lung injury or counteracting its undesirable side effects [16–18,21,53].

The persistent lung edema and/or inflammatory cell infiltration observed in our model and others [16–18,21], despite the presence of dexamethasone, may be due to severe and nonresolving alveolar damage, at the measured time points. In agreement with our hypothesis of a deleterious impact of bleomycin and dexamethasone on the repair capacity of the alveolar epithelium, our experiments first show a time- and dose-dependent inhibition of wound repair rates of primary ATII cell cultures by bleomycin. The observed pro-apoptotic effect of bleomycin, could contribute, at least in part, to this repair impairment. Not only did dexamethasone not reverse the bleomycin-repair impairment, but it further worsened the repair delay *in vitro* as well as the injury scores and protein levels in BAL *in vivo*. In agreement with our results, a deleterious effect of dexamethasone on repair mechanisms has also been shown in other epithelial cells [54,55]. Furthermore, it has been shown that dexamethasone inhibits corneal epithelial wound healing and cell migration (by altering the activity of membrane lamellipodia and filopodia) but promotes tight junction integrity [54]. The role of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial repair impairment has also been studied. A previous study by Dorscheid et al [56], indicated that the observed airway epithelial cell apoptosis induced by dexamethasone or budesonide was not involved in the decrease in wound repair rates after corticosteroid exposure. At lower concentration, dexamethasone elicited in our study a slight, but non-significant, decrease in caspase 3/7 activity in ATII cells in the absence or presence of bleomycin.

The decreased β 3- and β 6-integrin expression that we observed in alveolar epithelial cells may be involved in dexamethasone-induced repair impairment. However, other mechanisms may also be

involved. Indeed, a previous study indicated that the inhibition of airway epithelial repair, cell proliferation and migration by dexamethasone may be mediated, at least in part, by suppression of the MAPK/ERK signaling pathway ^[55]. Similarly, a marked inhibition in cell proliferation and migration, associated with decreased levels of Mek1/2-p-Erk1/2, has been observed in human airway epithelial cell (16HBE) cultures in the presence of dexamethasone ^[57].

CONCLUSIONS

Altogether, our data indicates that the inability of dexamethasone to improve the resolution of bleomycin outcomes, in particular, mortality rates, cell infiltration and lung edema, may be due to the remaining alveolar damage observed at day 7 and repair impairment induced by dexamethasone. Although data from animal models should be taken with caution and never perfectly reflect the physiopathology of ARDS, our study and those previously published suggest that dexamethasone alone is unlikely to be an efficient therapy for acute lung injury. Indeed, there is accumulating evidence that successful treatment of ARDS and lung injury will depend on our capacity to reduce epithelial injury and allow for more rapid restoration of alveolar epithelial integrity and function ^[58].

REFERENCES

1. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama* 2012;307(23):2526–33.
2. Fitzgerald M, McAuley DF, Matthay M. Is there a need for emerging drugs for the acute respiratory distress syndrome? *Expert Opin Emerg Drugs* 2014;19(3):323–8.
3. Monahan LJ. Acute respiratory distress syndrome. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2013;43(10):278–84.
4. Ware L, Matthay M. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342(18):1334–49.
5. Shimabukuro DW, Sawa T, Gropper MA. Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med* 2003;31(8 Suppl):S524-31.
6. Meduri GU, Bridges L, Shih MC, Marik PE, Siemieniuk RAC, Kocak M. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. *Intensive Care Med* 2016;42:829–40.
7. Kimura D, Saravia J, Rovnaghi CR, Meduri GU, Schwingshackl A, Cormier SA, et al. Plasma Biomarker Analysis in Pediatric ARDS: Generating Future Framework from a Pilot Randomized Control Trial of Methylprednisolone: A Framework for Identifying Plasma Biomarkers Related to Clinical Outcomes in Pediatric ARDS. *Front Pediatr* 2016;4:31.
8. Tongyoo S, Permpikul C, Mongkolpun W, Vattanavanit V, Udompanturak S, Kocak M, et al. Hydrocortisone treatment in early sepsis-associated acute respiratory distress syndrome: Results of a randomized controlled trial. *Crit Care* 2016;20(1):329.
9. Foster JR. Steroids for early acute respiratory distress syndrome: Critical appraisal of Meduri GU, Golden E, Freire AX, et al: Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: Results of a randomized controlled trial. *Chest* 2007; 131:954-963. *Pediatr Crit Care Med* 2010;11(3):404–7.
10. Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Lee Hough C, Michigan O, Arbor A, et al. Efficacy and Safety of Corticosteroids for Persistent Acute Respiratory Distress Syndrome The National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

- Clinical Trials Network. *N Engl J Med* 2006;354(16):1671–84.
11. Yehya N, Servaes S, Thomas NJ, Nadkarni VM, Srinivasan V. Corticosteroid exposure in pediatric acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2015;41(9):1658–66.
 12. Yang ZG, Lei XL, Li XL. Early application of low-dose glucocorticoid improves acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp Ther Med* 2017;13(4):1215–24.
 13. Standiford TJ, Ward PA. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. (*Translational Res* 2016;167:183–91.
 14. Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute Respiratory Distress Syndrome Advances in Diagnosis and Treatment. *Jama* 2018;319(7):698–710.
 15. Leite-Junior JHP, Garcia CSNB, Souza-Fernandes AB, Silva PL, Ornellas DS, Lorangeira AP, et al. Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 2008;36(9):2621–8.
 16. Xu T, Qiao J, Zhao L, He G, Li K, Wang J, et al. Effect of dexamethasone on acute respiratory distress syndrome induced by the H5N1 virus in mice. *Eur Respir J* 2009;33(4):852–60.
 17. Yubero S, Manso MA, Ramudo L, Vicente S, De Dios I. Dexamethasone down-regulates the inflammatory mediators but fails to reduce the tissue injury in the lung of acute pancreatitis rat models. *Pulm Pharmacol Ther* 2012;25(4):319–24.
 18. Hegeman MA, Hennis MP, Cobelens PM, Kavelaars A, Jansen NJG, Schultz MJ, et al. Dexamethasone Attenuates VEGF Expression and Inflammation but Not Barrier Dysfunction in a Murine Model of Ventilator-Induced Lung Injury. *PLoS One* 2013;8(2):e57374.
 19. Wang XQ, Zhou X, Zhou Y, Rong L, Gao L, Xu W. Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. *Respirology* 2008;13(6):772–80.
 20. Chen F, Gong L, Zhang L, Wang H, Qi X, Wu X, et al. Short courses of low dose dexamethasone delay bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;536(3):287–95.

21. Engel M, Nowacki RME, Boden P, Reiss LK, Uhlig S, Reynaert NL, et al. The Effects of Dexamethasone and Oxygen in Ventilated Adult Sheep with Early Phase Acute Respiratory Distress Syndrome. *Lung* 2015;193(1):97–103.
22. Meduri, G. Umberto; Siemieniuk R. Prolonged glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 2017;389(10078):1516–7.
23. Sweeney R Mac, McAuley DF. Prolonged glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 2017;389(10078):1516–7.
24. Bos LD, Martin-loeches I, Schultz MJ. ARDS : challenges in patient care and frontiers in research. *Eur Respir Rev* 2018;27:170107:1–9.
25. Bein, Thomas; Briegel, J; Annane D. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia : yes. *Intensive Care Med* 2016;42(5):918–20.
26. Thompson BT, Ranieri VM. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia : no. *Intensive Care Med* 2016;42(5):921–3.
27. Seam N, Suffredini AF. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: we are not sure. *Intensive Care Med* 2016;42(5):924–7.
28. Shauilesh Bihari, Bailey M, Bersten AD. Steroids in ARDS : to be or not to be. *Intensive Care Med* 2016;42(5):931–3.
29. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295(3):L379-99.
30. Saito F, Tasaka S, Inoue KI, Miyamoto K, Nakano Y, Ogawa Y, et al. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(5):566–71.
31. Goto H, Ledford JG, Mukherjee S, Noble PW, Williams KL, Wright JR. The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(12):1336–44.
32. Guilbault C, Martin P, Houle D, Boghdady ML, Guiot MC, Marion D, et al. Cystic fibrosis lung disease following infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Cftr knockout mice using novel non-invasive direct pulmonary infection technique. *Lab Anim* 2005;39(3):336–52.
33. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An

official american thoracic society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals. In: American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2011. page 725–38.

34. Girault A, Chebli J, Privé A, Trinh NTN, Maillé E, Grygorczyk R, et al. Complementary roles of KCa3.1 channels and β 1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir Res* 2015;16(1):100.
35. Bardou O, Privé A, Migneault F, Roy-Camille K, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2012;1818(7):1682–90.
36. Dagenais A, Fréchette R, Clermont M-E, Massé C, Privé A, Brochiero E, et al. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L1220–31.
37. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 1986;134(1):141–5.
38. Brochiero E, Dagenais A, Privé A, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Evidence of a functional CFTR Cl⁽⁻⁾ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(2):L382-92.
39. Dagenais A, Tessier MC, Tatur S, Brochiero E, Grygorczyk R, Berthiaume Y. Hypotonic Shock Modulates Na⁺ Current via a Cl⁻ and Ca²⁺/Calmodulin Dependent Mechanism in Alveolar Epithelial Cells. *PLoS One* 2013;8(9):e74565.
40. Leroy C, Privé A, Bourret J-C, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L1207–19.
41. Adam D, Bilodeau C, Sognigbé L, Maillé É, Ruffin M, Brochiero E. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J Cyst Fibros* 2018;17:705–14.
42. Ruffin M, Bilodeau C, Maillé É, LaFayette SL, McKay GA, Trinh NTN, et al. Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway

- epithelial repair. *FASEB J* 2016;30(9):3011–25.
43. Maillé E, Thu N, Trinh N, Privé A, Bilodeau C, Bissonnette É, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;301:945–55.
 44. Patel B V, Wilson MR, Dea KPO, Takata M. TNF-Induced Death Signaling Triggers Alveolar Epithelial Dysfunction in Acute Lung Injury. *J Immunol* 2013;190:4274–82.
 45. Champigny G, Voilley N, Lingueglia E, Friend V, Barbry P, Lazdunski M. Na⁺ channel by steroid hormones. *EMBO J* 1994;13(9):2177–81.
 46. Lee VY, Schroedl C, Brunelle JK, Buccellato LJ, Akinci OI, Kaneto H, et al. Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2005;289(4 33-4):521–8.
 47. Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(4):790–6.
 48. Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm Res* 2009;72(Suppl 1):36–41.
 49. Bodine SC, Furlow JD. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. In: *Glucocorticoid Signaling*. 2015. page 145–76.
 50. Koshika T, Hirayama Y, Ohkubo Y, Mutoh S, Ishizaka A. Tacrolimus (FK506) has protective actions against murine bleomycin-induced acute lung injuries. *Eur J Pharmacol* 2005;515(1–3):169–78.
 51. Grommes J, Soehnlein O. Contributions of neutrophils to ALI. *Mol Med* 2011;17(3–4):293–307.
 52. Yang D, Yuan W, Lv C, Li N, Liu T, Wang L, et al. Dihydroartemisinin suppresses inflammation and fibrosis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(2):1270–81.
 53. Kohno M, Haramoto M, Nakajima O, Yang L, Hinotsu S, Yokohira M, et al. Antedrug Budesonide by Intrapulmonary Treatment Attenuates bleomycin-induced lung injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2010;33(7):1206–11.

54. Kadmiel M, Janoshazi A, Xu X, Cidlowski JA. Glucocorticoid action in human corneal epithelial cells establishes roles for corticosteroids in wound healing and barrier function of the eye. *Exp Eye Res* 2016;152:10–33.
55. Liu J, Zhang M, Niu C, Luo Z, Dai J, Wang L, et al. Dexamethasone Inhibits Repair of Human Airway Epithelial Cells Mediated by Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ). *PLoS One* 2013;88(4):e60705.
56. Dorscheid DR, Patchell BJ, Estrada O, Marroquin B, Tse R, White SR. Effects of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial wound closure in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet] 2006;291:794–801. Available from: www.ajplung.org
57. Jia S, Guo P, Ge X, Wu H, Lu J, Fan X. Overexpression of indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to the repair of human airway epithelial cells inhibited by dexamethasone via affecting the MAPK/ERK signaling pathway. *Exp Ther Med* 2018;16(1):282–90.
58. Matthay MA. Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189(11):1301–8.

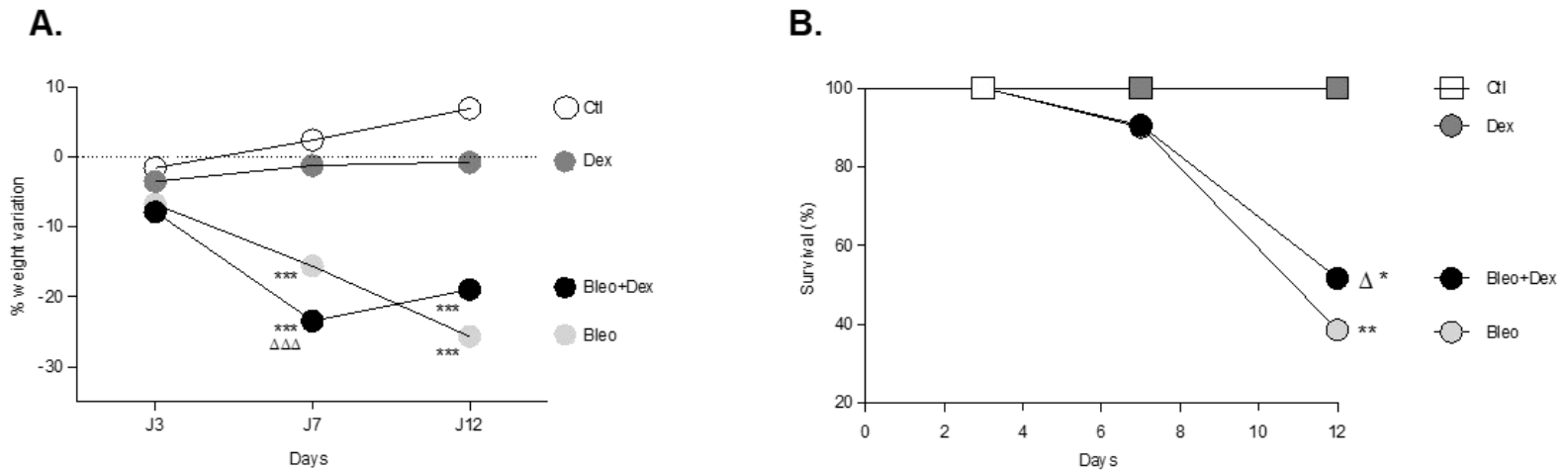


Figure 1: Effect of dexamethasone on body weight and survival after bleomycin-induced acute lung injury in mice. After i.t. instillation (at day 1) of saline (0.9%, 50 μ l) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg, 50 μ l), male NMRI mice were treated (i.p. injection) daily with saline (0.9%, 100 μ l) or dexamethasone (Dex, 0.5 mg/kg, 100 μ l) for 3, 7 or 12 days. Weight variations (**A**, n = 3-21) as a function of time and percentage (%) of mouse survival (**B**, n = 6-20) were compared between the four groups: Ctl (saline (i.t.)/saline (i.p.)); Bleo (bleo (i.t.)/saline (i.p.)); Dex (saline (i.t.)/dex (i.p.)) and Bleo+Dex (bleo (i.t.)/dex (i.p.)). Values are means \pm SEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control condition at the same time point, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$ vs Dex condition at the same time point. 1-way ANOVA (Agostino/Pearson normality positive tested, $p < 0.0001$) and Bonferroni post hoc test (**A**, day 3), 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (**A**, day 7 and 12). Comparison of survival curves was made with a Log-rank (Mantel-Cox) test which generated a Chi square, ** $p < 0.01$ Bleo vs Ctl curve, * $p < 0.05$ Bleo+Dex vs Ctl curve and Δ $p < 0.05$ Dex vs Bleo+Dex curve (**B**).

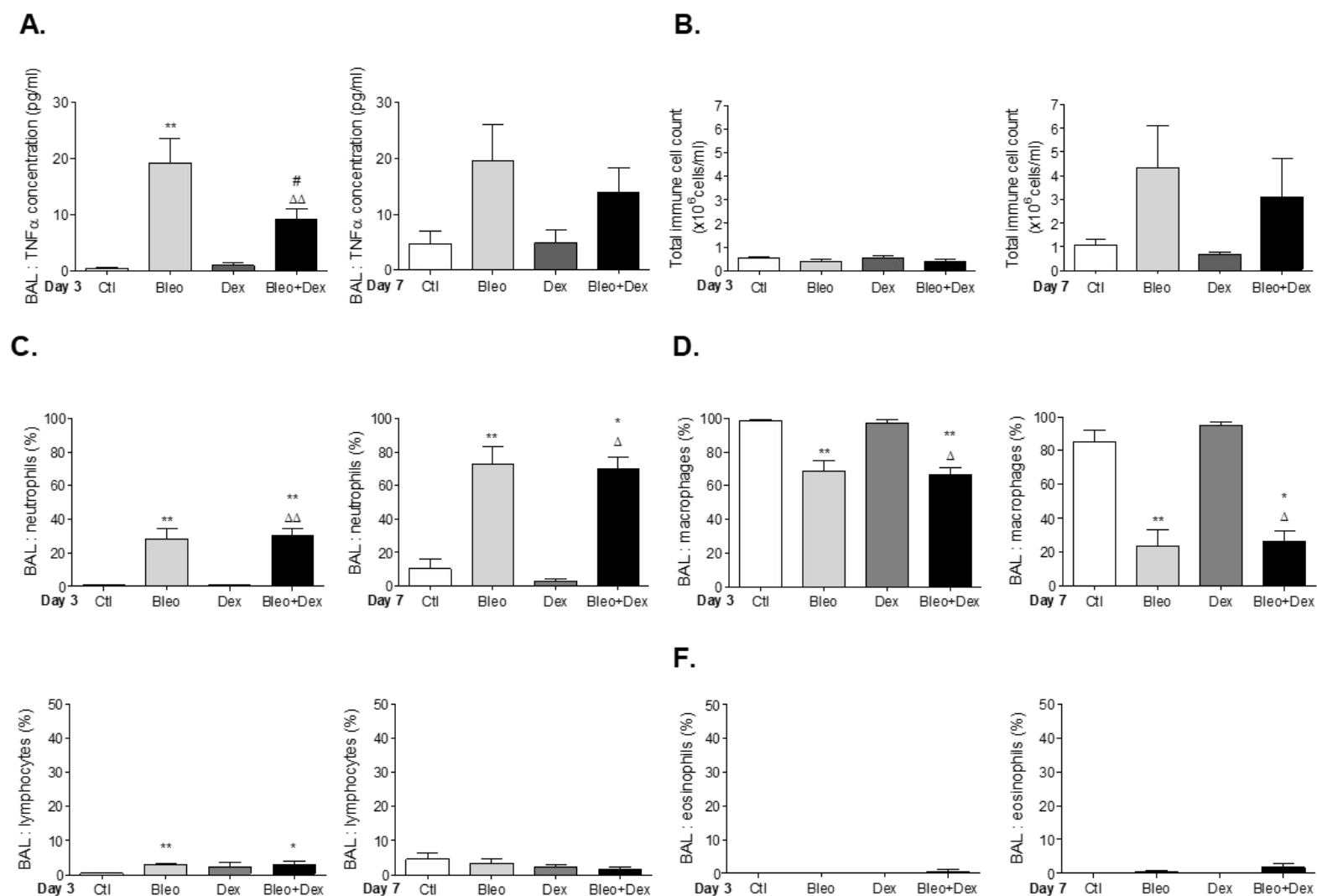


Figure 2: Effect of dexamethasone on the inflammatory response after bleomycin-induced acute lung injury in mice. **A.** Levels of TNF- α (pg/ml) detected by ELISA in BAL collected at day 3 (n=6, left panel) and 7 (n=5-7, right panel). Total immune cell counts (**B**) and differential cell count (% of neutrophils (**C**), macrophages (**D**), lymphocytes (**E**) and eosinophils (**F**)) in BAL collected from mice 3 (left panel) or 7 (right panel) days after the bleomycin challenge (4 U/kg, 50 μ l i.t., n=4-7). Values are means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Ctl condition, # $p < 0.05$ vs Bleo condition, Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$ vs Dex condition. Non-parametric t-test (Mann-Whitney, panel **A**) or 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (panels **B, C, D, E, F**).

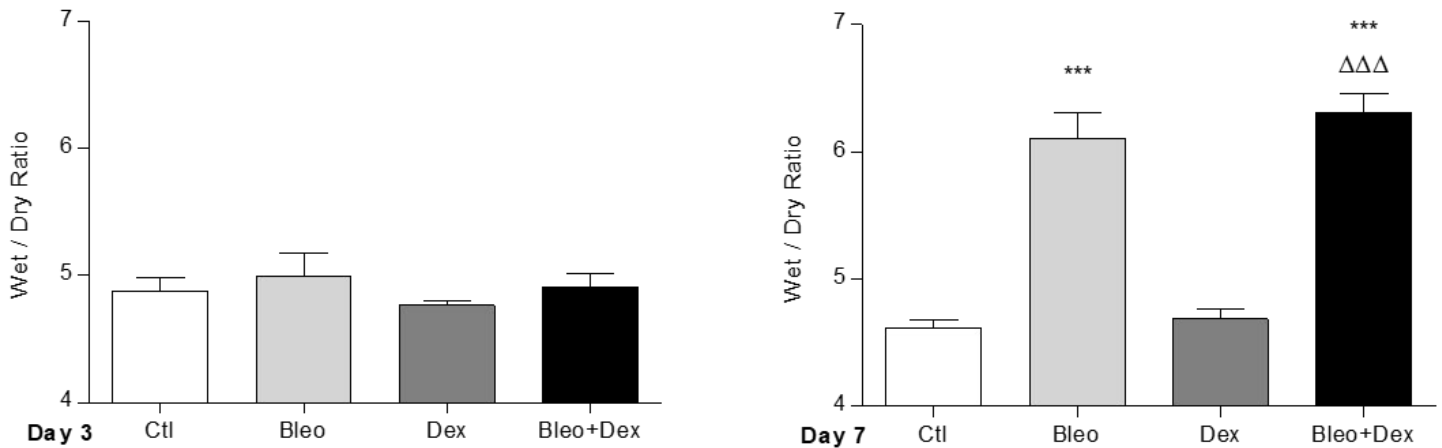


Figure 3: Effect of dexamethasone on edema formation after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Wet-to-dry lung weight ratios (edema index) were measured 3 (n= 12, left panel) and 7 (n=14-22, right panel) days after initial instillation (day 1) of saline (Ctl, 0.9%) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg) and daily treatments (i.p. administration) with saline (0.9%) or dexamethasone (Dex, 0.5 mg/kg, 100 μ l). Values are means \pm SEM, *** $p < 0.001$ vs Ctl condition, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$ vs Dex condition. 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test.

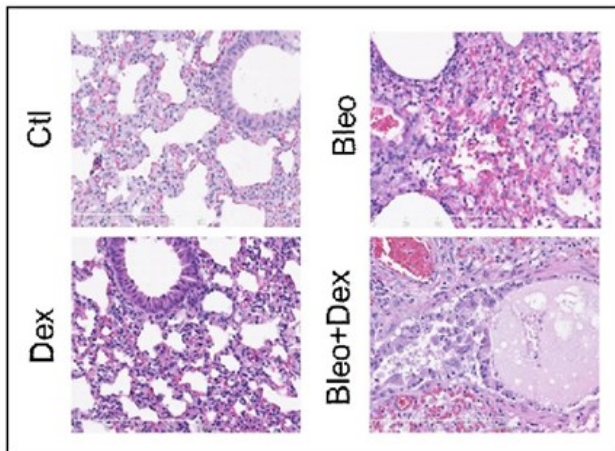
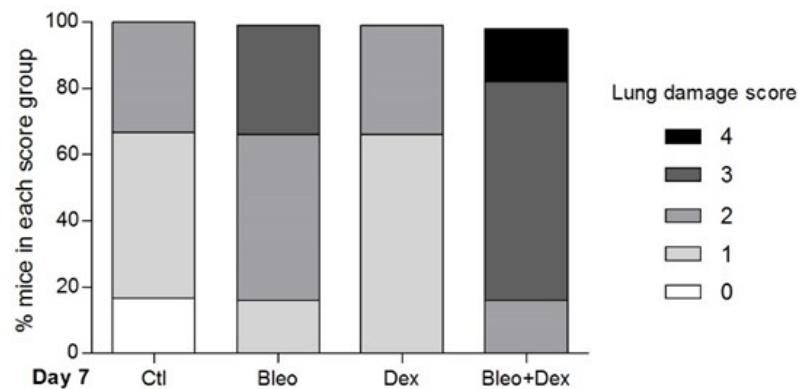
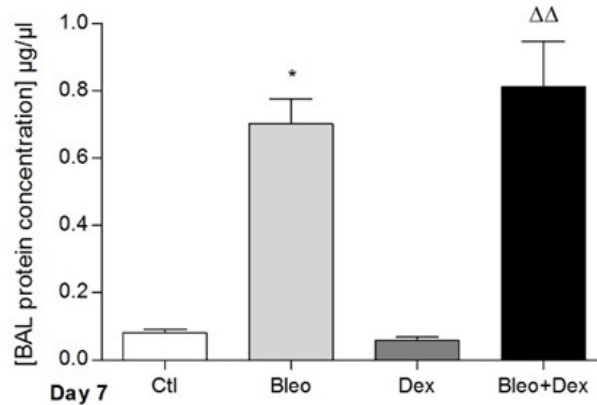
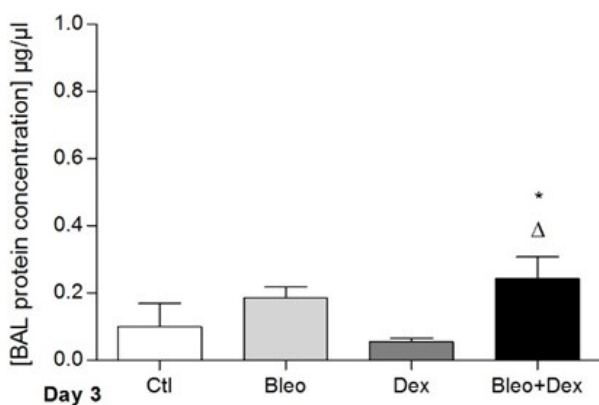
A.**B.****C.**

Figure 4: Effect of dexamethasone on alveolar epithelial damage after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Histological sections of mouse lungs stained with hematoxylin-eosin (Magnification x20. Scale: 200 μm , **A**) and repartition of lung damage scores at day 7 (**B**, n=6-8) are presented for each group (Ctl (saline (i.t.)/saline (i.p.)); Bleo (bleo (i.t.)/saline (i.p.)); Dex (saline (i.t.)/dex (i.p.)) and Bleo+Dex (bleo (i.t.)/dex (i.p.)). The concentration of proteins in BAL ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, **C**, n=5-6) was measured at day 3 (left panel) and 7 (right panel). Values are means \pm SEM, * $p < 0.05$ vs Ctl condition, $\Delta p < 0.05$, $\Delta\Delta p < 0.01$ vs Dex condition. 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test.

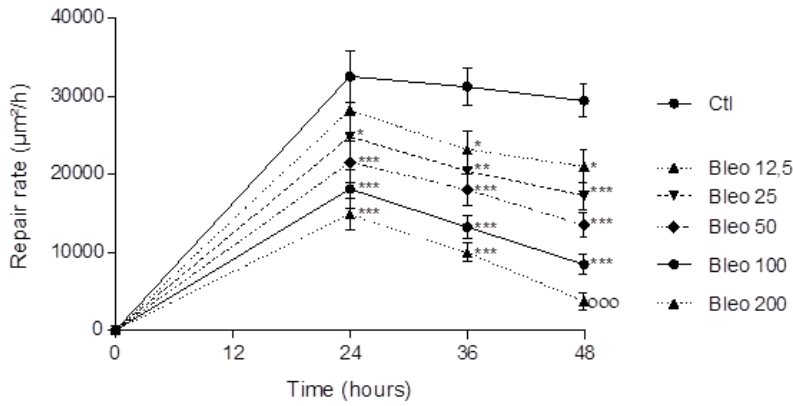
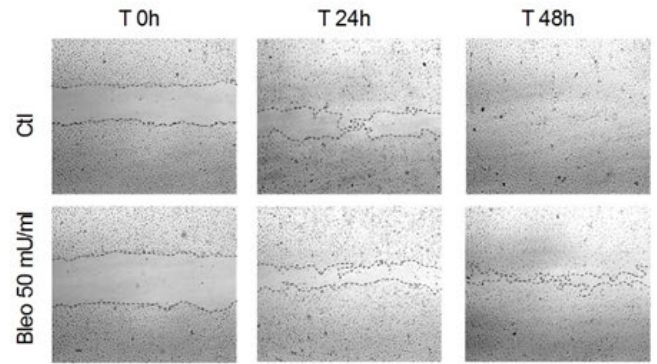
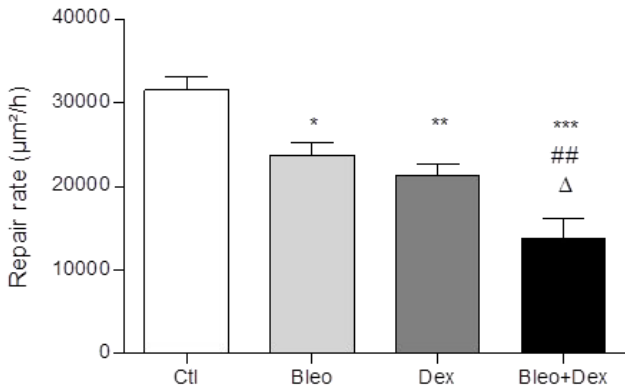
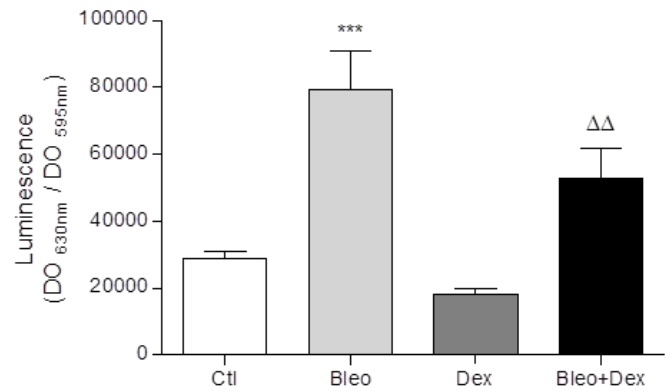
A.**B.****C.****D.**

Figure 5: Effect of dexamethasone on the repair rates of primary ATII cell monolayers. A.

Primary rat ATII cell monolayers were injured mechanically, and repair rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) were measured over periods of 24, 36 and 48 h in the control (Ctl) condition (saline, 0.9%) and after treatments with increasing doses of bleomycin (Bleo, 12.5, 25, 50, 100, 200 mU/ml, $n=8$). **B.** Representative photographs of healing ATII cell monolayers at 0, 24 and 48 h after treatment with saline (0.9%) or bleomycin (Bleo, 50 mU/ml). **C.** Repair rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) of ATII cell monolayers in control condition (Ctl, 0.9%), after treatment with bleomycin alone (Bleo, 50 mU/ml, applied at

T0), dexamethasone alone (Dex, 100 nM, applied 24 h before injury) and a combination of bleomycin (50 mU/ml, T0) and dexamethasone (100 nM, 24 h before injury) (Bleo+Dex, n=8). **D.** ATII cell apoptosis in control condition (Ctl, 0.9% saline) and after 24h treatment with bleomycin alone (Bleo, 50 mU/ml), dexamethasone alone (Dex, 100 nM) or a combination of bleomycin (50 mU/ml) and dexamethasone (100 nM) (Bleo+Dex) (n=10). Values are means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Ctl condition, ## $p < 0.01$ vs Bleo condition, $^{\Delta} p < 0.05$ vs Dex condition. 2-way ANOVA and Bonferroni post hoc test (vs control at the same time point, panel **A**), 1-way ANOVA (Agostino/Pearson normality positive tested, $p < 0.0001$) and Bonferroni post hoc test (panel **C**), 1-way ANNOVA Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (panel **D**).

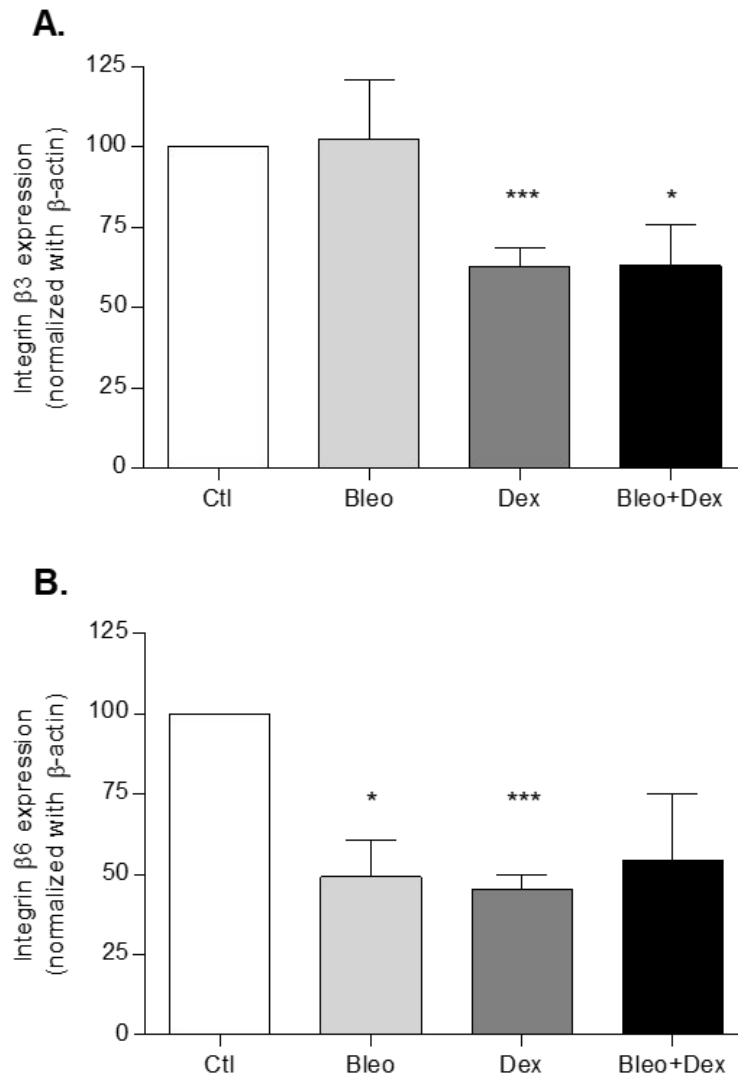
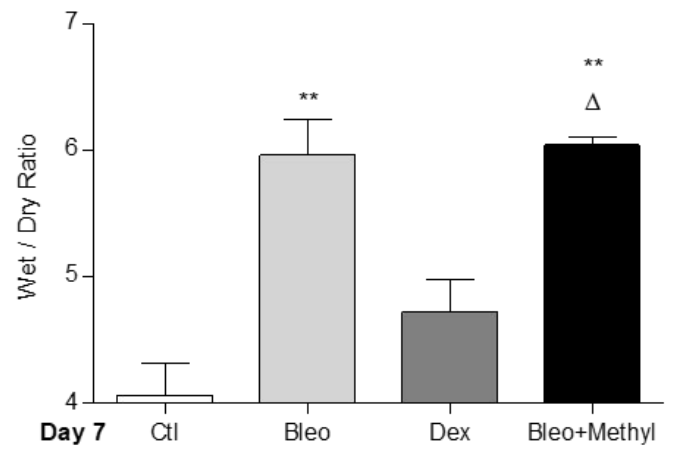
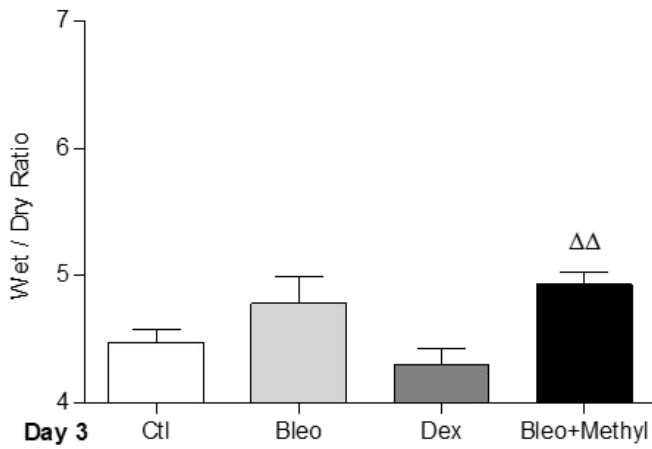


Figure 6. Effect of dexamethasone on $\beta 3$ - and $\beta 6$ -integrin expression in primary ATII cells. Protein expression (% of control condition normalized with actin expression) of $\beta 3$ - (upper panel, n=6-14) and $\beta 6$ -integrin (lower panel, n=3-8) in control, bleomycin, dexamethasone and bleomycin + dexamethasone pretreated (24 h) conditions. Values are presented as means \pm SEM, one simple t-test with a theoretical mean of 100%, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs Ctl condition.



Supplementary 1: Effect of another anti-inflammatory drug, methylprednisolone, on edema index after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Wet/dry ratios were measured 3 (n=6, left panel) and 7 days (n=6, right panel) after instillation of saline (Ctl, 0.9%) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg) and daily treatments (i.p. administration) with saline (0.9%) or methylprednisolone (methyl, 1 mg/kg, 100 μ l). Values are means \pm SEM, ^{**} $p < 0.01$ vs Ctl condition, ^Δ $p < 0.05$, ^{ΔΔ} $p < 0.01$ vs Dex condition. n=6. 1-way ANOVA Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test.

Chapitre 4 : Impact de la déficience d'expression du canal ENaC chez des souris transgéniques sur les paramètres du SDRA induit par la bléomycine

4.1 Statut de l'article #2

Titre: **Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin**

Auteurs: Aubin Vega Mélissa*, Chupin Cécile*, Massé Chantal, Dagenais André, Berthiaume Yves, Brochiero Emmanuelle

Statut: Publié dans *Experimental Physiology* (278) en 2021 (voir annexe B pour la référence 278)

Contribution: Les expérimentations *in vivo* ont initialement été réalisées par une étudiante (C. Chupin) qui avait quitté avant le début de mon doctorat. J'ai donc repris l'ensemble du projet en étant responsable de l'extraction et la compilation des données brutes des expérimentations animales, leur analyse et interprétation, la production des figures, la rédaction du manuscrit et des révisions à la suite de la revue par les pairs.

4.2 Mise en contexte

La présence d'un œdème bilatéral pulmonaire est l'un des critères déterminants du diagnostic de SDRA. La capacité de clairance liquidienne chez les patients atteints de ce syndrome est dépendante du transport actif ionique à travers une barrière alvéolaire intacte (279). Il fut également démontré que les patients SDRA avec une altération sévère de la clairance liquidienne présentent un pronostic de survie réduit (190). Le septa des patients décédés à la suite d'un SDRA, arborent une diminution de l'expression de l'AQP1 et ENaC (280), deux protéines impliquées dans le transport des ions et des fluides, et ce, de façon indépendante à leur étiologie.

Le canal sodique ENaC joue un rôle prépondérant dans le phénomène de résorption liquidienne alvéolaire en condition physiologique et pathologique. L'insuffisance respiratoire ((281) par

hypoxie ou hypercapnie) et les médiateurs inflammatoires ((282) TNF- α , TGF- β , IL-1 β) sont des facteurs qui régulent à la baisse l'expression et/ou l'activité d'ENaC et qui sont présents dans les cas de SDRA. Dans un modèle *in vivo* (75), l'ablation génétique (KO) de la sous-unité alpha du canal ENaC (α -ENaC) a conduit au décès des souriceaux rapidement après leur naissance puisqu'ils étaient incapables de résorber le liquide pulmonaire, tandis que les souris avec une expression partielle d'ENaC (souris α ENaC(-/-)Tg+) ne présentent pas de mortalité à la naissance et sont donc envisageables pour des études expérimentales.

Puisque l'environnement pulmonaire peut avoir un grand impact sur la modulation d'ENaC, nous voulions définir si le niveau d'expression d'ENaC lui-même pouvait avoir un impact sur l'homéostasie alvéolaire en condition physiologique chez les animaux adultes, et si la modulation de l'expression de ENaC pouvait influencer les paramètres caractéristiques de la phase aiguë du SRDA dans des modèles 1) d'œdème induit par la thiourée et 2) de dommages alvéolaires induits par la bléomycine dans des souris WT et α ENaC(-/-)Tg+.

4.3 Manuscrit de l'article #2

IMPACT OF ENAC DOWN-REGULATION IN TRANSGENIC MICE ON THE OUTCOMES OF ACUTE LUNG INJURY INDUCED BY BLEOMYCIN

Aubin-Vega M^{1,2,*}, Chupin C^{1,2*}, Massé C^{1,3}, Dagenais A^{1,3}, Berthiaume Y^{1,2,3,#}, Brochiero E^{1,2,#}

* Co-first authors, # co-senior authors

¹ Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

² Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

³ Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada

Email addresses:

melissa.aubin.vega@umontreal.ca, [REDACTED], chantal.Masse@ircm.qc.ca

[REDACTED], yves.berthiaume@umontreal.ca,

emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

ABSTRACT

The exudative phase of acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by extended alveolar damage, resulting in accumulation of protein-rich inflammatory oedematous fluid in the alveolar space. Na⁺ reabsorption through ENaC channels is a major driving force for alveolar fluid clearance (AFC) in physiological and pathological conditions. It has previously been shown that partial α ENaC impairment in transgenic (α ENaC(-/-)Tg⁺) mice results in reduced AFC in basal conditions and increased wet/dry ratio after thiourea-induced lung edema, a model where the integrity of the alveolar epithelium is preserved. The goal of this study was to further investigate the impact of α ENaC down-regulation in α ENaC(-/-)Tg⁺ mice using an experimental model of acute lung injury (ALI) induced by bleomycin.

A non-significant trend in enhanced weight loss and mortality rates was observed after the bleomycin challenge in α ENaC(-/-)Tg⁺, compared to wild-type (WT) mice. Bronchoalveolar lavage (BAL) analyses revealed increased TNF α levels and protein concentrations, as indexes of lung inflammation and alveolar damage, in α ENaC(-/-)Tg⁺ mice, compared to WT, at day 3 post-bleomycin; although no statistical difference was no longer measured at day 7. Differential immune cell counts were similar in WT and α ENaC(-/-)Tg⁺ mice challenged with bleomycin. Moreover, lung weight measurements indicated similar edema levels in WT mice and in transgenic mice with impaired ENaC channels.

Altogether, our data indicated that change in ENaC expression does not elicit a significant impact on lung edema level/resolution in the bleomycin model, featuring alveolar damage.

ABBREVIATIONS LIST

AFC: Alveolar fluid clearance; ALI: Acute lung injury; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; ATI: alveolar type I cells; ATII: alveolar type II cells; BAL: bronchoalveolar lavages; Bleo: bleomycin; ENaC: Epithelial Na⁺ Channels; Thio: Thiourea; Tg: transgenic; TNF α : tumor necrosis factor alpha; W/D: wet-to-dry ratio;

INTRODUCTION

Fluid absorption through type I (ATI) and type II (ATII) alveolar epithelial cells is essential to maintain alveolar spaces virtually free of liquid, a physiological condition essential for optimal gas exchange (Basset, 1987a, 1987b). Alveolar fluid clearance (AFC) depends on sodium (Na^+) absorption, driven by passive Na^+ entry through apical Na^+ channels and active exit by the basolateral Na^+/K^+ -ATPase (Basset, 1987a, 1987b). The importance of Na^+ transport through Epithelial Na^+ Channels (ENaC) and nonselective cation channels in AFC has been established *in vitro* and in several animal models (Basset, 1987b; Fang, 2004; Hummler, 1996; Li, 2006; O’Brodivich, 1990; Smedira, 1991; Trac, 2017). Notably, Hummler *et al.* demonstrated that αENaC knock-out (KO) in mice was associated with a lethal phenotype at birth, due to the inability to clear alveolar fluid (Hummler, 1996). Furthermore, partial αENaC silencing in rats resulted in increased extravascular lung water and newborn mortality (Li, 2007). Finally, it has been established that active Na^+ absorption across the alveolar epithelial barrier is the primary mechanisms for resolution of hydrostatic or cardiogenic pulmonary oedema in uninjured lungs (Matthay, 2014).

It has been shown that Na^+ absorption is also critical for AFC in injured lungs (Matthay, 2014). Indeed, gene transfer with cationic lipid-mediated or adenovirus-mediated transfer of the Na^+/K^+ -ATPase pump has been shown to mitigate pulmonary edema in different models of acute lung injury (ALI) (Adir, 2008; Factor, 2000; Stern, 2000). The contribution of ENaC to the resolution of pulmonary edema has also been investigated by Egli *et al.* (Egli, 2004) in transgenic mice ($\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$), exhibiting reduced αENaC expression, using a model of acute lung edema induced by thiourea, which causes diffuse vascular endothelial damage (Cunningham, 1972). Data showed that $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ mice exhibited reduced AFC, increased lung edema severity and slower rates of edema resolution in thiourea challenged mice (Egli, 2004). However, the thiourea model, used in the study by Egli *et al.* (Egli, 2004) induces lung edema secondary to diffuse vascular damage while the alveolar epithelium remains relatively intact (Cunningham, 1972). Therefore, this animal model might not be totally representative of the injury observed in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Indeed, ARDS is characterized by an exacerbated

inflammatory response and a severe damage of both the alveolar epithelium and vascular endothelium, leading to lung edema flooding (Albertine, 1998; Berthiaume, 1999; Ingbar, 1998; Matthay, 2019). As previously discussed (Berthiaume, 1999), the progressive epithelial injury seen in ARDS patients can be of heterogenous severity among alveoli/areas.

Therefore, the goal of our study was to evaluate if ENaC downregulation, using α ENaC(-/-)Tg+ mice, would worsen the outcomes of ALI in an animal model harboring a damage of the alveolar epithelium. Although no single animal model recapitulates all the characteristics of ARDS in humans (Aeffner, 2015; Matute-Bello, 2008; Richard, 2006), we opted for the well-characterized model of bleomycin-induced ALI. We focused our study on the acute exudative phase (over a 7-day period), featuring severe alveolar epithelial and vascular endothelial damage as well as lung edema flooding and exacerbated inflammatory response (with neutrophil infiltration and cytokine release), before establishment of fibrosis (day 12–21) (Goto, 2010; Matute-Bello, 2008; Saito, 2008). Our hypothesis was that bleomycin-induced ALI would lead to outcomes of similar to worsened severity in α ENaC(-/-)Tg+ compared to wild-type mice. The effect of α ENaC downregulation in these transgenic mice was thus evaluated by assessing mouse survival, inflammatory response, alveolar damage and lung edema indexes after the bleomycin challenge.

METHODS

Ethical approval

All procedures on animals were approved by the Institutional Animal Protection Committee (CIPA, Approval references #H040056Ybs and IP19019EBR) of the Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines. In addition, the experimental protocols are in agreement with Experimental Physiology journal's principles and regulations for animal studies.

Animal care

α ENaC transgenic (α ENaC(-/-)Tg+) mice, harboring a non-lethal down-regulation of α ENaC expression/function were generated as previously described (Egli, 2004; Hummler, 1997). The

initial breeding pair (on NMRI background) was kindly provided by Dr E. Hummler (Lauzanne, Switzerland). The mouse colony was then maintained by breeding heterozygous mice (male $\alpha\text{ENaC}(+/-)\text{Tg}+$ x female $\alpha\text{ENaC}(+/-)\text{Tg}+$) at the animal care facility of CRCHUM and backcrossed with NMRI WT mice (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA) every 10 generations. Mice were housed under standard humidity and lighting conditions (12:12-h light-dark cycles) and allowed free access to standard mouse diet and water *ad libitum*.

For transparency, authors would like to clarify that, as recommended by our Institutional Animal Protection Committee, according to the principles of the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement), our protocol was initially designed to compare controls to two distinct experimental groups aimed at investigating two separate scientific questions. The first one was to evaluate the impact of a treatment with a corticosteroid (dexamethasone) on the resolution of bleomycin-induced ALI (comparison between the control groups and mice treated with dexamethasone after the bleomycin challenge). These results have already been published (Aubin Vega, 2019). The second question was to explore the impact of αENaC down-regulation (in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice) in the bleomycin-induced ALI model (data presented here comparing the control and $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ groups). Thus, in order to decrease the number of animals used as per the 3Rs principles, the same group of animals were used as control within the two studies performed at the same time and the values reported here (Ctl group) are similar to the one recently published in (Aubin Vega, 2019).

Intratracheal instillation

Experiments were conducted on 7- to 10-week-old male WT and $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}$ mice, randomly divided into Ctl (instillation of saline) and Bleo (instillation of Bleomycin, see below) groups. More precisely, mice were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a solution (0.01 ml/g) of 13% ketamine (100 mg/ml) and 1.3% xylazine (20 mg/ml) in 0.9% saline. Mice were then positioned on their back on a 45° table and instilled intratracheally (i.t.) via a catheter with saline (0.9%, 50 μl) or bleomycin (MaynePharma Canada, Qc, Canada, 4 U/kg, 50 μl) under direct visualization of the vocal cord, following a modified, non-surgical and non-damaging method (Guilbault, 2005; Weksler, 1994).

In another series of experiments, a model of thiourea-induced acute lung edema was used. Briefly, WT and $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ mice were treated by an (i.p.) injection with saline (0.9%, 150 μl) or thiourea (40 mg/kg (effective dose previously used in NMRI mice ((Egli, 2004), Sigma, 150 μl)).

Animals were then euthanatized (lethal dose of ketamine-xylazine (0.02 ml/g, i.p.) followed by inferior *vena cava* severing) at different time points (as detailed in the following sections describing experimental procedures and outcome measurements).

Physiological parameters

The mice weight variations were calculated from the measured weights at day 3 or 7, including before sacrifice of mice reaching the endpoints (see below), and reported as % of initial weight before bleomycin i.t instillation. In compliance with the CCAC standards and following daily animal assessment by the CRCHUM animal care personnel, mice reaching endpoints (respiratory failure, loss of more than 30% of the initial weight, prostration, uncontrollable pain, dehydration) were sacrificed according to the procedure approved by the CRCHUM institutional animal care committee. To avoid a potential bias by using the animals with the better outcomes, mice reaching endpoints were included in the calculation of the weight variation and survival rates (reported as % of living mice in each group at 3, 7 and 12 days after the beginning of the bleomycin challenge). Subsequent experimental procedures (described below) were performed at 3 and 7 days after bleomycin challenge (*i.e.* during the acute exudative phase). At this time points no (day 3) or small (day 7) mortality rates were observed.

Lung edema (wet/dry ratio)

After euthanasia on day 3 and 7 (model of bleomycin-induced ALI) or 4 and 7 hours (corresponding to the peak effect and resolution phase, respectively, of lung edema in the thiourea model), the lungs were removed and directly weighed (wet weight). Lungs were then heated to 95°C for 24 h to measure the dry weight, and then to calculate the wet/dry weight ratio, index of lung edema.

Bronchoalveolar lavages (BAL)

In another series of experiments, bronchoalveolar lavages (6 repeated i.t. instillation of 1 mL, pooled together on ice) were performed after euthanasia at day 3 and 7 post-bleomycin challenge. After centrifugation (200 g, 4 °C, 8 min), the supernatant was aliquoted and stored at -80°C until subsequent use to determine protein concentration and TNF α levels (see below).

The protein concentration in BAL supernatants was assessed by the Bradford method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON, Canada). TNF α concentrations (pg/ml) were measured (in triplicates at room temperature) by AlphaLISA technology (AL505 C/F, PerkinElmer Discovery Services, RRID:SCR_012163, Montreal, Qc, Canada) following manufacturer's recommendation, from a standard curve (dynamic range is from 2.0 to 30,000 pg/ml), after reading with the EnVision-Alpha Reader (PerkinElmer).

Cell pellets were resuspended in PBS (500 μ l), and cell suspensions were then diluted at a density of 1×10^6 cells/ml before cytocentrifugation (300 rpm, 3 min, Shandon Cytospin 3 Centrifuge, Block Scientific, NY, USA) onto glass slides (4×10^4 cells/slide). Cells were then stained with Hema-3[®] (Fisher, US) to allow differential cell count (number of neutrophils, macrophages, lymphocytes and eosinophils reported as %, among a total of 400 leukocytes/slide).

Short-circuit current measurements through primary alveolar epithelial cells

Primary alveolar epithelial cells were isolated from adult Sprague-Dawley rats (Aubin Vega 2019; Dagenais, 2006, 2004). Animals were anesthetized by intra-peritoneal lethal injection of somnotol (40mg/kg), exsanguinated, tracheatomized and lungs were inflated and perfused to remove excess blood and alveolar macrophages before digestion with elastase (160U/rat). After collection, lungs were minced and the resulting suspension was filtered. A differential adherence technique was then used to discard the remaining macrophages to purify alveolar epithelial cells which were then seeded on permeant filters in MEM + FBS 10% + septra mycin. At day 3, alveolar cell cultures were treated or not with bleomycin (apical side, 50 mU/ml, a dose determined in a previous study (Aubin Vega, 2019)) for 24 h before short-circuit currents measurements in Ussing chamber (Dagenais, 2006, 2004). Amiloride (10 μ M, apical side) was then applied to compare amiloride-sensitive sodium transepithelial currents.

Statistical analysis

Mice survival rates are represented as % of living mice in the initial experimental group. All other data are presented as means \pm standard deviation (SD). Graphs and statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (v5-8, GraphPad Prism, RRID:SCR_002798, CA, USA). Normality tests (Agostino & Pearson) were first performed, followed by statistical tests, adapted to each type of experiments, as specified in each figure legend. A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Lung delivery of bleomycin (Bleo, 4 U/kg) was associated with a significant loss of weight, an indicator of the clinical deterioration of animal condition, in WT mice at day 3 and 7 (**Figure 1A**). This weight loss was slightly, but not significantly, greater in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice (Tg), at day 7 after the bleomycin challenge.

A 100% survival rate was observed in WT and $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice in control conditions, whereas bleomycin-induced ALI resulted in increasing mortality rates in both groups (WT Bleo and Tg Bleo). The trend in higher mortality in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$, compared to WT mice, was not statistically significant ($p= 0.2782$, **Figure 1B**).

The levels of $\text{TNF}\alpha$, which play a key role in alveolar damage and dysfunction after ALI (Patel, 2013) have then been measured in the BALs of WT and $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice. Our results showed that the increase in $\text{TNF}\alpha$ induced after bleomycin delivery was higher at day 3 in transgenic than in WT mice. The $\text{TNF}\alpha$ concentration in Tg mice then diminished at day 7 to a level similar as the one measured in WT mice (**Figure 2A**).

Differential cell counts of immune cells then indicated a similar increase in neutrophils in WT and transgenic mice, with a parallel decrease in the proportion of macrophages, after the bleomycin challenge (**Figure 2B-C**). In all experimental conditions, the proportion of lymphocytes and eosinophils remained lower than 5% (data not showed).

Our data also showed that alveolar damage induced by bleomycin was associated with a progressive increase in protein concentration in BAL supernatants, which was significant as early as day 3 in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice, whereas significance was reached at day 7 in WT mice (**Figure 3**). The trend in higher protein content in BAL from $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice collected at day 7, compared to WT, remained non statistically significant.

αENaC down-regulation in transgenic mice was also accompanied with a small, but significant, elevation of the baseline wet/dry ratio (**Figure 4**), 3 days following i.t. instillation with the PBS (control condition). However, edema flooding, following damage of the alveolar epithelial/endothelial barrier induced by bleomycin, was similar ($p=0,9071$) in the lungs of mice harboring normal (WT) and reduced (Tg) ENaC expression (**Figure 4A**). As shown in **Figure 4B**, we verified that bleomycin *per se* did not significantly impact ENaC currents through alveolar epithelial cells which are responsible for secondary liquid resorption.

Because a previous study (Egli, 2004) showed that these transgenic mice exhibited slower resolution rates of lung edema in a model of thiourea-induced vascular permeability (Cunningham, 1972), we felt that it was important to demonstrate that the lack of worsening in the bleomycin model was not due to a defective phenotype of $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice used in our protocol. As shown in **Figure 5**, αENaC impairment resulted in slight but significant increase in baseline wet/dry ratio in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice (Tg/PBS vs WT/PBS at 4h). This is similar to what was observed in the bleomycin protocol (**Figure 4**). Moreover, WT mice exhibited a significant decrease in lung edema at 7h (WT/Thio 4h vs WT/Thio 7h), whereas no resolution was observed in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice (Tg/Thio 4h vs Tg/Thio 7h, **Figure 5**). This impairment in lung oedema resolution in the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice is in agreement with previous observations by Egli *et al.* (Egli, 2004).

DISCUSSION

Our study shows that ENaC downregulation in α ENaC(-/-)Tg⁺ mice did not worsen the outcomes of bleomycin-induced lung injury, an animal model harboring a significant alveolar damage, inflammatory response and lung edema flooding.

Several observations indicate that the primary outcomes of bleomycin are not severely aggravated in the α ENaC(-/-)Tg⁺ mice. First, the progressive reduction in body weight that is associated with intratracheal instillation of bleomycin (Cowley, 2019) was not increased in Tg compared to WT mice (**Figure 1**). Secondly, the number of mice requiring euthanasia because they reached endpoints, established by the Institutional Animal Protection Committee, was not statistically different in the two Bleo experimental groups (WT/Bleo vs Tg/Bleo). Although Hummler *et al.* demonstrated that the lethal pulmonary phenotype of α ENaC KO mice at birth (Hummler, 1996) was rescued by transgenic α ENaC expression (Hummler, 1997) in physiological conditions; the survival rates of these α ENaC(-/-)Tg⁺ mice during pathological experimental models (e.g. with exposure to hyperoxia or thiourea (Egli, 2004)) have however not been reported.

Although bleomycin did induce, as expected, an inflammatory response in the lungs, it was almost identical in the α ENaC(-/-)Tg⁺ and WT mice at day 7. Indeed, no difference in differential immune cell counts in BAL was noted between WT and Tg mice at days 3 and 7 post-bleomycin (**Figure 2**). There was, however, a 2.9-fold increase in TNF α at day 3 after bleomycin instillation in Tg mice, compared to the WT Bleo group. This increase in TNF α level did not persist overtime since it reached a value similar to that measured in BAL from WT Bleo mice on day 7. This early (day 3) exacerbated pro-inflammatory TNF α levels during bleomycin-induced ALI in α ENaC(-/-)Tg⁺ mice has, to the best of our knowledge, never been reported before. However, a relationship between ENaC down-regulation and inflammation has previously been shown in a model of transgenic mice with reduced β ENaC expression, exhibiting higher renal cytokine levels (TNF α , IL-6 et IL-1 β), which could be secondary to altered blood flow and defective autoregulatory response (Drummond, 2011; Grifoni, 2010). However, the mechanism by which α ENaC impairment may be

responsible for increased lung TNF α levels, as observed in our study at day 3 after bleomycin, would deserve clarification in further studies.

Could the transient increase in TNF α be involved in the lung injury of the α ENaC(-/-)Tg⁺ mice? Indeed, TNF α has been shown to play a role in tight junction protein and lung barrier alteration as well as alveolar damage and dysfunction (Mazzon, 2007; Patel, 2013). Therefore, the inflammatory response to bleomycin with enhanced TNF α levels on day 3 might have contributed to the significant rise in BAL proteins that we observed as early as day 3 in Tg Bleo mice (**Figure 3**). At this time point, the ongoing alveolar damage is however probably not enough severe/uniform to lead to a significant increase in wet/dry weight. At day 7, TNF α and proteins reached similar levels in WT Bleo and Tg Bleo mice (**Figures 2 and 3**), indicating that ENaC impairment did not elicit a sustained aggravating effect on the inflammatory response and permeability of the alveolar barrier. At this time point, the alveolar injury is well established leading to statistically significant increase in wet/dry weight ratio in both WT and Tg mice. However, our data showed that the edema level was not significantly increased in Tg Bleo, compared to WT Bleo mice (**Figure 4**). Indeed, although we observed on day 3 following PBS instillation a slightly, but significantly higher W/D ratio in Tg than WT mice, the decrease in ENaC expression in the α ENaC(-/-)Tg⁺ mice did not worsen the severity of lung edema after the bleomycin-induced ALI on day 7.

The lack of edema worsening in α ENaC(-/-)Tg⁺ Bleo mice is surprising since the capacity to remove pulmonary edema is impaired in most patients with ARDS, at least in part, due to decreased expression and function of ENaC and Na⁺/K⁺-ATPase (for review see Matthay 2014 (Matthay, 2014)). Indeed, ENaC downregulation has been reported during ARDS and in several ALI models (Huppert, 2017). Furthermore, decreased ENaC expression and fluid transport through ATEC cells have also been measured after exposure to edema fluids from ARDS patients (Lee, 2007). We have also previously observed that TNF α , which is elevated on day 3 in the α ENaC(-/-)Tg⁺ mice (**Figure 2**), downregulated the expression and activity of ENaC channels, and secondarily liquid clearance through the alveolar epithelium (Dagenais, 2006, 2004). Based on these observations,

we should expect a significant increase in wet/dry weight ratio in the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ compared to WT mice on days 3 and 7. At day 3, the lack of significant increase in wet/dry ratio is probably due to the fact that the level of alveolar injury is variable/heterogenous and not severe enough (**Figure 3**) to lead to a substantial amount of lung edema in all animals. Indeed, the individual data in **Figure 4A** shows that only few animals exhibited increased wet/dry weight ratio in response to bleomycin compared to the PBS control group. At day 7, there is a sustained inflammatory response (**Figure 2**) and significant alveolar injury (increase in BAL proteins, **Figure 3**) that could lead to a decrease in ENaC activity and a rise in wet/dry weight ratio in both WT and Tg mice. Indeed, we have previously shown that bleomycin induces severe alveolar damage with pneumocytes sloughing (Aubin Vega, 2019). A loss or injury of type I and type II alveolar epithelial cells, expressing ENaC channels, might impair sodium and liquid absorption. As shown in one of our recent studies, wounded cultured alveolar epithelial cells induced a decrease in ENaC mRNA expression (Dagenais, 2018). Beside epithelial injury, the associated inflammatory response observed (day 7, **Figure 2**) could also lead to a decrease in ENaC activity and expression (Dagenais, 2006, 2004). The lack of edema worsening in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$, compared to WT mice, can be explained by the fact that the alveolar damage and inflammatory response probably decreased ENaC function in both the WT and Tg models. The interrelationship between ENaC expression/activity and alveolar injury/repair would thus deserve further study since recent evidence suggests a role of ENaC in the wound healing processes of various cellular types (for review see (Chifflet, 2016)).

Is it possible that the results observed might not be related to an impact of epithelial injury or to the associated inflammatory response but rather to a direct effect of bleomycin? Folkesson *et al.* previously reported a decreased expression and function of ENaC in alveolar type cells isolated from rat lungs, 10 days after intratracheal administration of bleomycin (Folkesson, 1998). Surprisingly, they also observed an increase in alveolar liquid clearance in rat lungs at this time point. This improved alveolar clearance was explained by an increase in the number of alveolar type II cells due to the ongoing repair phase occurring 10 days after bleomycin (Folkesson, 1998). This is a major difference between our studies. Whereas we focused on the acute exudative inflammatory phase, featuring a severe epithelial damage, theirs was done when epithelial repair

was ongoing, as shown by the increased number of alveolar type II cells. This is also confirmed by the fact that there was a minimal increase in wet/dry weight ratio in their animals, compared to the one measured in ours. Nevertheless, since their data suggest that bleomycin might have downregulated ENaC, we studied the impact of bleomycin on ENaC activity in rat alveolar type II cells in primary culture. As shown in **Figure 4B**, we did not observe a direct effect of bleomycin on ENaC currents.

We could also wonder if the lack of edema/damage worsening that we observed might be secondary to a loss of the ENaC transgenic phenotype in the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ mice used in our study. To explore this possibility, we evaluated in our $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ mice, as it was done previously (Egli, 2004), lung edema resolution after a thiourea challenge (**Figure 5**). The thiourea model is characterized by an increase in vascular permeability (while the alveolar epithelial integrity is quite preserved (Cunningham, 1972; Egli, 2004; Giri, 1991; Michel, 1985)), whereas the bleomycin model features severe alveolar epithelial injury (Aubin Vega, 2019; Matute-Bello, 2008). In agreement with the previous findings of Egli *et al.* (Egli, 2004), we observed impaired lung edema resolution after thiourea, confirming the expected downregulated ENaC phenotype in our transgenic mice.

We are aware that there are potential limitations to our study. Indeed, the mouse strain (NMRI) is not the one most frequently used (C57BL/6J) in studies on bleomycin-induced lung injury. Nevertheless, the outcomes we observed, as measured by survival, weight loss, edema level and inflammatory response, are similar to the one observed in the C57BL/6J strain (Chua, 2007; Cowley, 2019; Milton, 2012). Moreover, our results might have been impacted by the sacrifice of some mice, which have reached the endpoints established by the Institutional Animal Protection Committee. However, to avoid a potential bias by using the animals with the better outcomes, mice reaching endpoints were included in the calculation of the weight variation and survival rates. Subsequent experimental procedures were performed 3 and 7 days after the bleomycin challenge where no (day 3) or minimal (day 7) mortality rates were observed.

Altogether, our data indicated that ENaC downregulation in α ENaC(-/-)Tg⁺ mice does not elicit a significant impact on the main outcomes in the bleomycin model, featuring a severe alveolar damage. This suggests that the recovery process after ALI is not only dependant on lung capacity, mainly driven by ENaC, to remove fluid, but also on alveolar epithelial ability to restore its integrity and function. This might also explain why therapies aimed only at enhancing edema resolution through ENaC stimulation have failed (Matthay, 2011; Smith, 2012). Indeed, both ENaC alteration and alveolar damage have been reported in ARDS patients, which may contribute to the lack of efficacy of pharmacological treatments targeting ENaC. Thus, the development of novel therapeutic avenues that are favoring the restoration of alveolar integrity as well as its capacity for edema resolution will be essential for patient recovery (Berthiaume, 1999; Fitzgerald, 2014; Matthay, 2014; Shimabukuro, 2003; Ware, 2000).

REFERENCES

- Adir, Y., Welch, L. C., Dumasius, V., Factor, P., Sznajder, J. I., & Ridge, K. M. (2008). Overexpression of the Na⁺K⁺/ATPase α 2-subunit improves lung liquid clearance during ventilation-induced lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(6), 1233–1237. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00076.2007>
- Aeffner, F., Bolon, B., & Davis, I. C. (2015, December 1). Mouse models of acute respiratory distress syndrome. *Toxicologic Pathology*, Vol. 43, pp. 1074–1092. <https://doi.org/10.1177/0192623315598399>
- Albertine, K. H. (1998). Histology of pulmonary edema and the acute respiratory distress syndrome. In M. A. Matthay & D. Ingbar (Eds.), *Lung biology in Health and Disease* (pp. 37–83). New York: Marcel Dekker.
- Aubin Vega, M., Chupin, C., Pascariu, M., Privé, A., Dagenais, A., Berthiaume, Y., & Brochiero, E. (2019). Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice. *Physiological Reports*, 7(21), 1–12. <https://doi.org/10.14814/phy2.14253>
- Basset, G., Crone, C., & Saumon, G. (1987a). Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *The Journal of Physiology*, 384(1), 325–345. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016457>
- Basset, G., Crone, C., & Saumon, G. (1987b). Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *The Journal of Physiology*, 384(1), 311–324. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016456>
- Berthiaume, Y., Lesur, O., & Dagenais, a. (1999). Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax*, 54(2), 150–160. <https://doi.org/10.1136/thx.54.2.150>
- Chifflet, S., & Hernandez, J. A. (2016). The Epithelial Sodium Channel and the Processes of Wound Healing. *BioMed Research International*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/5675047>
- Chua, F., Dunsmore, S. E., Clingen, P. H., Mutsaers, S. E., Shapiro, S. D., Segal, A. W., ... Laurent, G. J. (2007). Mice lacking neutrophil elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*, 170(1), 65–74.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060352>

- Cowley, P. M., Roberts, C. R., & Baker, A. J. (2019). Monitoring the Health Status of Mice with Bleomycin-induced Lung Injury by Using Body Condition Scoring. *Comparative Medicine*, *69*(2), 95–102. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000060>
- Cunningham, A., & Hurley, J. (1972). Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat : a topographical and electron-microscope study. *J. Path*, *106*(May 1971), 25–35. <https://doi.org/10.1002/path.1711060103>.
- Dagenais, A., Desjardins, J., Shabbir, W., Roy, A., Fillion, D., Sauvé, R., & Berthiaume, Y. (2018). Loss of barrier integrity in alveolar epithelial cells downregulates ENaC expression and activity via Ca²⁺ and TRPV4 activation. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *470*(11), 1615–1631. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2182-4>
- Dagenais, A., Fréchette, R., Clermont, M.-E., Massé, C., Privé, A., Brochiero, E., & Berthiaume, Y. (2006). Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *291*, L1220–L1231. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00511.2005>
- Dagenais, A., Fréchette, R., Yamagata, Y., Yamagata, T., Carmel, J.-F., Clermont, M.-E., ... Berthiaume, Y. (2004). Downregulation of ENaC activity and expression by TNF- α in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *286*(2), L301–L311. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00326.2002>
- Drummond, H. A., Grifoni, S. C., Abu-Zaid, A., Gousset, M., Chiposi, R., Barnard, J. M., ... Stec, D. E. (2011). Renal inflammation and elevated blood pressure in a mouse model of reduced β -ENaC. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *301*(2), 0–6. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00694.2010>
- Egli, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., ... Scherrer, U. (2004). Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol*, *560*(3), 857–865. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.066704>
- Factor, P., Dumasius, V., Saldias, F., Brown, L. A. ., & Sznajder, J. I. (2000). Adenovirus-mediated transfer of an Na⁺K⁺/ATPase β 1 subunit gene improves alveolar fluid clearance and survival

- in hyperoxic rats. *Human Gene Therapy*, 11(16), 2231–2242.
<https://doi.org/10.1089/104303400750035753>
- Fang, X., Song, Y., Zemans, R., Hirsch, J., & Matthay, M. A. (2004). Fluid transport across cultured rat alveolar epithelial cells: A novel in vitro system. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1 31-1), 104–110.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00176.2003>
- Fitzgerald, M., McAuley, D. F., & Matthay, M. (2014). Is there a need for emerging drugs for the acute respiratory distress syndrome? *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 19(3), 323–328.
<https://doi.org/10.1517/14728214.2014.953052>
- Folkesson, H. G., Nitenberg, G., Oliver, B. L., Jayr, C., Albertine, K. H., & Matthay, M. A. (1998). Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin. *Am. J. Physiol.*, 275(3 Pt 1), L478-490.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.3.L478>
- Giri, S. N., Hollinger, M. A., & Rice, S. A. (1991). Effects of thiourea on pulmonary vascular permeability and on lung and plasma histamine levels in rats. *Toxicology Letters*, 57(3), 283–290. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(91\)90202-H](https://doi.org/10.1016/0378-4274(91)90202-H)
- Goto, H., Ledford, J. G., Mukherjee, S., Noble, P. W., Williams, K. L., & Wright, J. R. (2010). The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(12), 1336–1344.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200907-1002OC>
- Grifoni, S. C., Chiposi, R., McKey, S. E., Ryan, M. J., & Drummond, H. A. (2010). Altered whole kidney blood flow autoregulation in a mouse model of reduced β -ENaC. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 298(2), 285–292.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00496.2009>
- Guilbault, C., Martin, P., Houle, D., Boghdady, M. L., Guiot, M. C., Marion, D., & Radzioch, D. (2005). Cystic fibrosis lung disease following infection with *Pseudomonas aeruginosa* in *Cftr* knockout mice using novel non-invasive direct pulmonary infection technique. *Laboratory Animals*, 39(3), 336–352. <https://doi.org/10.1258/0023677054306944>
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., ... Rossier, B. (1996).

- Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.*, 12, 925–928. <https://doi.org/10.1038/ng0396-325>
- Hummler, E., Barker, P., Talbot, C., Wang, Q., Verdumo, C., Grubb, B., ... Rossier, B. (1997). A mouse model for the renal salt-wasting syndrome pseudohypoaldosteronism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11710–11715. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11710>
- Huppert, L. A., & Matthay, M. A. (2017). Alveolar fluid clearance in pathologically relevant conditions: In vitro and in vivo models of acute respiratory distress syndrome. *Frontiers in Immunology*, 8(APR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00371>
- Ingbar, D., Wendt, C., & Crandall, E. D. (1998). Na, K-ATPase and the clearance of pulmonary edema fluid. In M. Matthay & D. Ingbar (Eds.), *Pulmonary Edema* (pp. 477–499). New York: Marcel Dekker.
- Lee, J. W., Fang, X., Dolganov, G., Fremont, R. D., Bastarache, J. A., Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2007). Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24109–24119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700821200>
- Li, T., & Folkesson, H. G. (2006). RNA interference for α -ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(4), 649–660. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00205.2005>
- Li, T., Koshy, S., & Folkesson, H. G. (2007). Involvement of α ENaC and Nedd4-2 in the conversion from lung fluid secretion to fluid absorption at birth in the rat as assayed by RNA interference analysis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(4), 1069–1078. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00151.2007>
- Matthay, M. A. (2014). Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(11), 1301–1308. <https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0535OE>
- Matthay, M. A., Brower, R. G., Carson, S., Douglas, I. S., Eisner, M., Hite, D., ... Thompson, B. T. (2011). Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized β 2-agonist for treatment of acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*,

- 184(5), 561–568. <https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2090OC>
- Matthay, M. A., Zemans, R. L., Zimmerman, G. A., Arabi, Y. M., Beitler, J. R., Mercat, A., ... Calfee, C. S. (2019). Acute respiratory distress syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(18), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, 379–399. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008.-Acute>
- Mazzon, E., & Cuzzocrea, S. (2007). Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respiratory Research*, 8(75), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-8-75>
- Michel, R. P. (1985). Lung Microvascular Permeability to Dextran in a-Naphthylthiourea-Induced Edema. *Am P Pathol*, 119, 474–484.
- Milton, P. L., Dickinson, H., Jenkin, G., & Lim, R. (2012). Assessment of respiratory physiology of C57BL/6 mice following bleomycin administration using barometric plethysmography. *Respiration*, 83(3), 253–266. <https://doi.org/10.1159/000330586>
- O’Brodivich, H., Hannam, V., Seear, M., & Mullen, J. B. M. (1990). Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *Journal of Applied Physiology*, 68(4), 1758–1762. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.4.1758>
- Patel, B. V, Wilson, M. R., Dea, K. P. O., & Takata, M. (2013). TNF-Induced Death Signaling Triggers Alveolar Epithelial Dysfunction in Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*, 190, 4274–4282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202437>
- Richard, J. C., & Guérin, C. (2006). Animal models of ARDS. *Reanimation*, Vol. 15, pp. 21–28. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2005.12.008>
- Saito, F., Tasaka, S., Inoue, K. I., Miyamoto, K., Nakano, Y., Ogawa, Y., ... Ishizaka, A. (2008). Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(5), 566–571. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0299OC>
- Shimabukuro, D. W., Sawa, T., & Gropper, M. A. (2003). Injury and repair in lung and airways. *Critical Care Medicine*, 31(8 Suppl). <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000081437.06466.b3>

- Smedira, N., Gates, L., Hastings, R., Jayr, C., Sakuma, T., Pittet, J. F., & Matthay, M. A. (1991). Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits. *Journal of Applied Physiology*, 70(4), 1827–1835. <https://doi.org/10.1152/jappl.1991.70.4.1827>
- Smith, F. G., Perkins, G. D., Gates, S., Young, D., McAuley, D. F., Tunnicliffe, W., ... Lamb, S. E. (2012). Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): A multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*, 379(9812), 229–235. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61623-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61623-1)
- Stern, M., Ulrich, K., Robinson, C., Copeland, J., Griesenbach, U., Masse, C., ... Alton, E. (2000). Pretreatment with cationic lipid-mediated transfer of the Na⁺ K⁺/ATPase pump in a mouse model in vivo augments resolution of high permeability pulmonary oedema. *Gene Therapy*, 7, 960–966. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301193>
- Trac, P. T., Thai, T. L., Linck, V., Zou, L., Greenlee, M., Yue, Q., ... Eaton, D. C. (2017). Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ α -ENaC channels and contribute to AFC. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(6), L797–L811. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00379.2016>
- Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 343(10), 1334–1349. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421806>
- Weksler, B., Ng, B., Lenert, J., & Burt, M. (1994). A simplified method for endotracheal intubation in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 76(4), 1823–1825. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.4.1823>

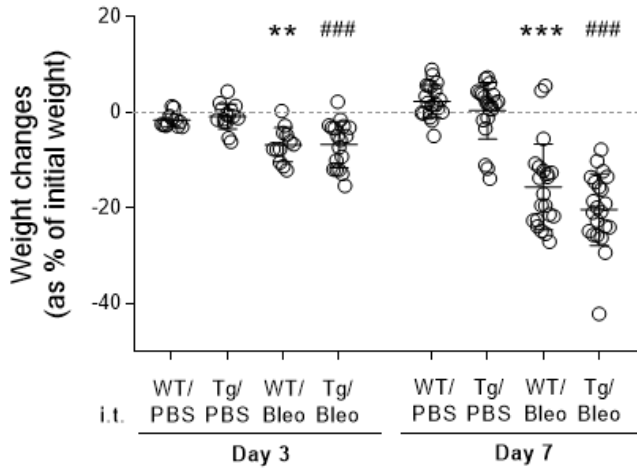
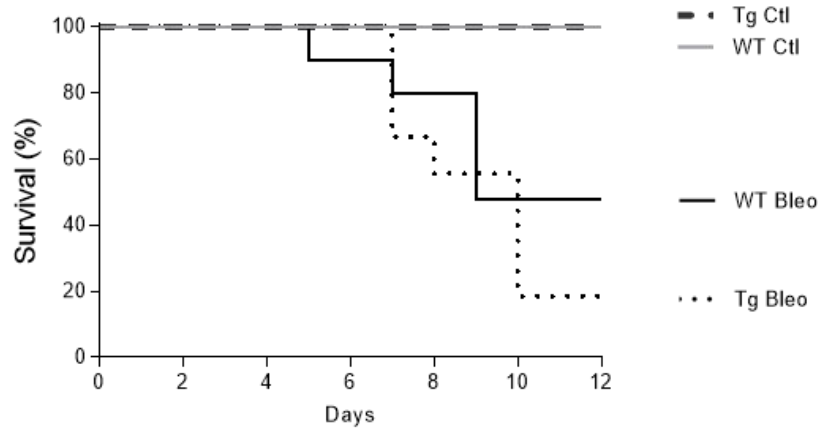
A.**B.**

Figure 1: Impact of ENaC down-regulation on weight changes and survival after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Weight changes (A) and survival (B) (%) were compared as a function of time after i.t. installation (at day 1) of saline (0.9%, 50 μ l) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg, 50 μ l), in WT or α ENaC(-/-)Tg+ NMRI mice. Values are mean \pm SD. A. Weight changes (Day 3: D'Agostino & Pearson omnibus normality test $p < 0.0001$, One-way ANOVA followed by bonnferroni post-hoc, $n=12-18$. Day 7: Normality test negative. Kruskal-Wallis followed by Dunns post-hoc, $n=21-22$) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs WT Ctl at the same time point. ### $p < 0.001$ vs Tg Ctl at the same time point. B. Survival curve (Log-rank Mantel-Cox Test, $n= 6-19$) ** $p < 0.01$ vs WT Ctl curve, ## $p < 0.01$ vs Tg Ctl curve).

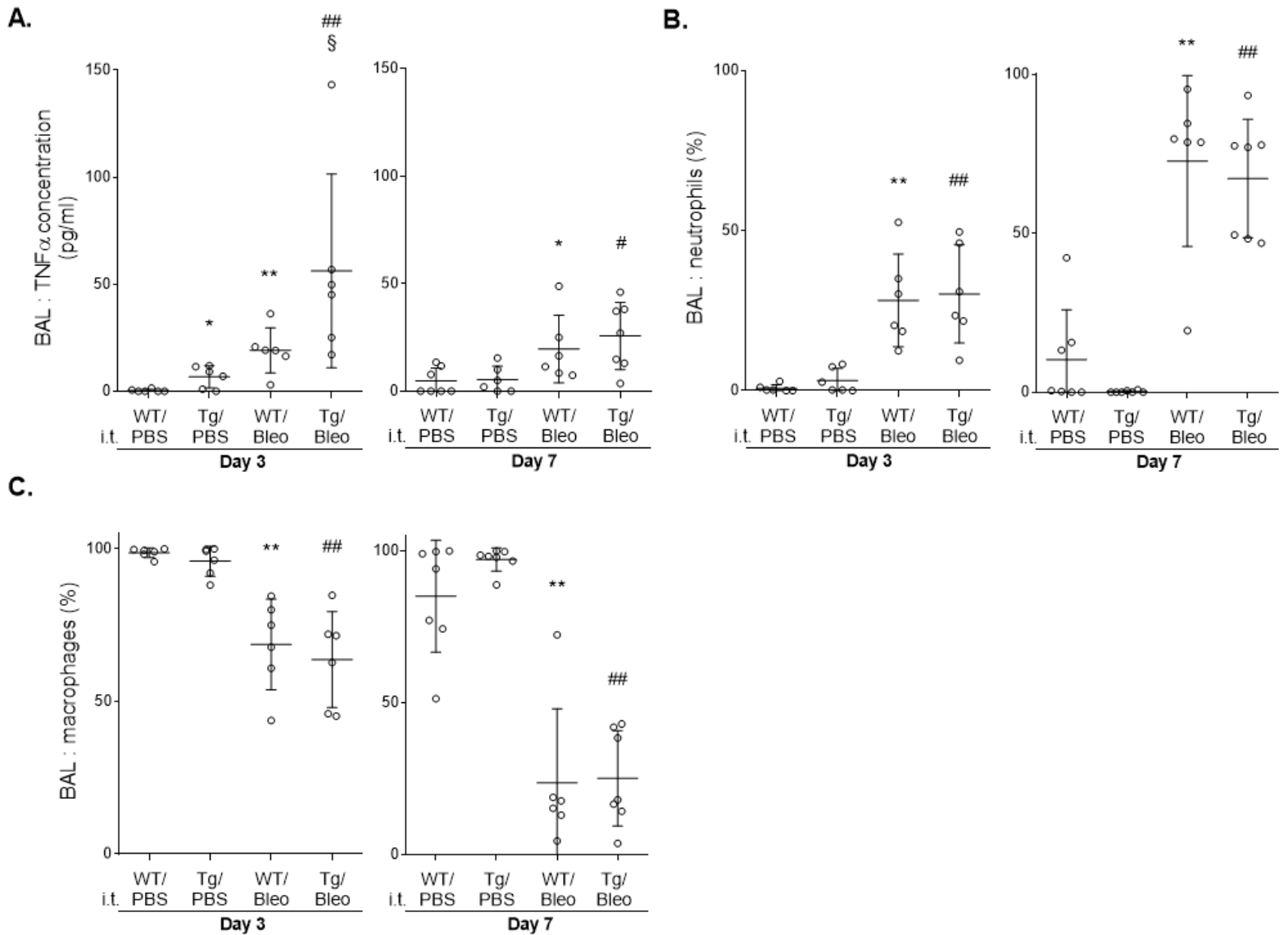


Figure 2: Effect of ENaC down-regulation on the inflammatory response after bleomycin-induced acute lung injury in mice. **A.** TNF α levels (pg/ml) detected at day 3 (n=6) and 7 (n=6-7) in BAL collected from WT or α ENaC(-/-)Tg+ mice after bleomycin (4 U/kg, 50 μ l)-induced lung injury. Differential cell count (% of neutrophils (**B**) and macrophages (**C**)) in BAL collected from Tg mice 3 or 7 days after the bleomycin challenge (4 U/kg, 50 μ l i.t., n=6-7). Values are means \pm SD, * p <0.05 vs WT Ctl condition, ** p <0.01 vs WT Ctl, # p <0.05 vs Tg Ctl, ## p <0.01 vs Tg Ctl, § p <0.05 vs WT Bleo at the same time point. Mann-Whitney test (**A**, between WT Ctl vs Tg Ctl and WT bleo vs Tg bleo); 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc test (**B**, **C**).

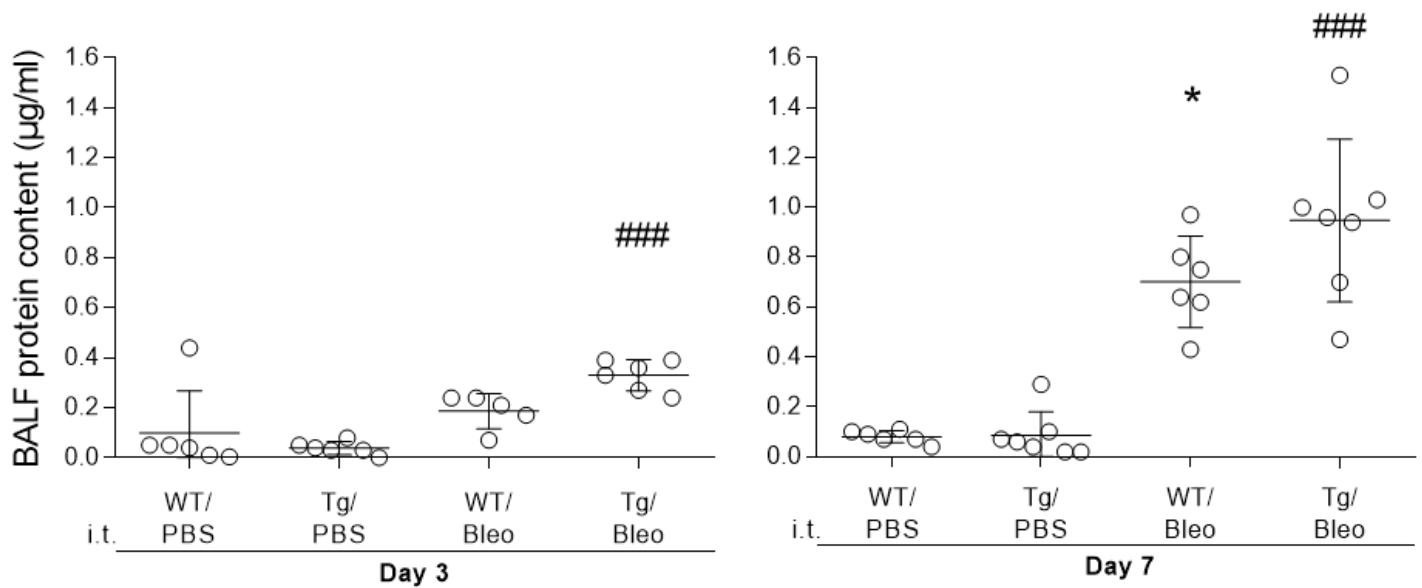


Figure 3: Effect of ENaC down-regulation on alveolar epithelial damage after bleomycin-induced acute lung injury in mice. The concentration of proteins in BAL ($\mu\text{g}/\text{ul}$) was measured at day 3 ($n=5-6$) and 7 ($n=6-7$) for each group (WT Ctl, WT Bleo, Tg Ctl and Tg Bleo). Values are means \pm SD, * $p < 0.05$ vs WT Ctl condition, ### $p < 0.001$ vs Tg Ctl condition at the same time point. 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc test.

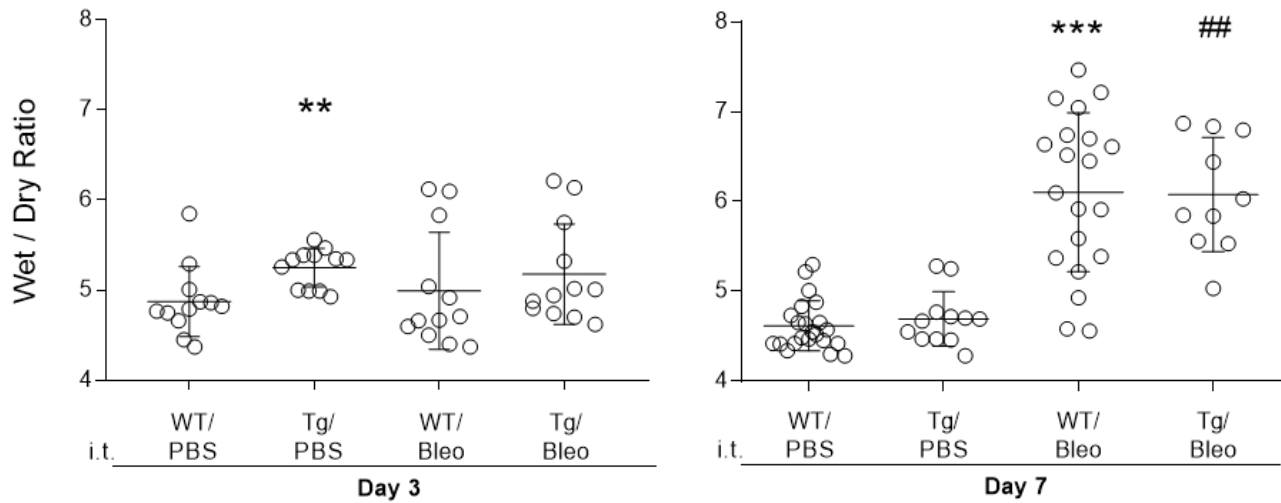
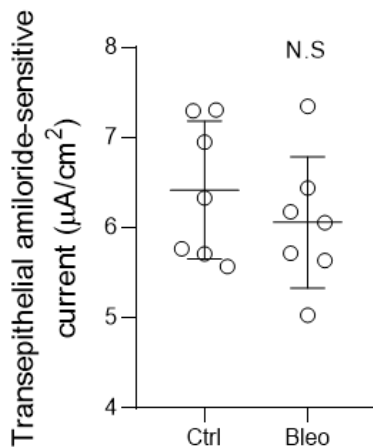
A.**B.**

Figure 4: Effect of ENaC down-regulation on edema formation after bleomycin-induced acute lung injury. **A.** Wet-to-dry lung weight ratios (edema index) were measured 3 (n=12) and 7 days (n=10-22) after instillation (day 1) of saline (0.9%) or bleomycin (Bleo, i.t., 4U/kg) in WT or α ENaC(-/-)Tg+ mice. **B.** Amiloride-sensitive short-circuit current measurements in Ussing chamber through primary cultures of alveolar epithelial cells (isolated from rat lungs), pretreated or not for 24 h with bleomycin (50 μ M/ml, apical side, n=7). Values are means \pm SD. **A.** ** $p < 0.01$ vs WT Ctrl mice, *** $p < 0.001$ vs WT Ctrl condition, ## $p < 0.01$ vs Tg Ctrl mice. 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis; Dunn's post hoc test for each time point. **B.** Non-significant (N.S) vs Ctrl condition. Non-parametric Mann-Whitney t-test.

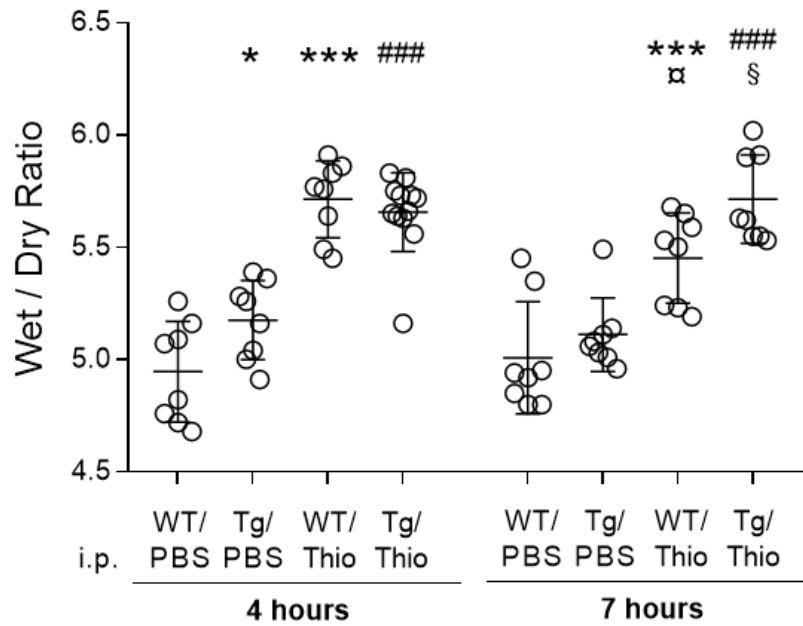


Figure 5: Effect of ENaC down-regulation on edema formation after a thiourea challenge in mice. Wet-to-dry lung weight ratios (edema index) were measured 4 hours (n= 8-12) and 7 hours (n=8) days after initial i.p. injection of saline (0.9%, Ctl) or thiourea (40 mg/kg, Thio), in WT or α ENaC(-/-)Tg+ mice. Values are means \pm SD, * $p < 0.05$ vs WT Ctl condition, *** $p < 0.001$ vs WT Ctl condition, ### $p < 0.001$ vs Tg Ctl mice condition, § $p < 0.05$ vs WT Thio condition at the same time point, α $p < 0.05$ vs WT Thio at 4h condition. 2-way ANOVA and Bonferroni post hoc test.

Chapitre 5 : Impact de la modulation du canal potassique KvLQT1 sur l'homéostasie liquidienne alvéolaire dans un modèle murin d'oedème pulmonaire induit par la thiourée

5.1 Statut de l'article #3

Titre: **Impact of KvLQT1 potassium channel modulation on alveolar fluid homeostasis in an animal model of thiourea-induced lung edema**

Auteurs: Aubin Vega Mélissa, Girault Alban, Adam Damien, Chebli Jasmine, Privé Anik, Maillé Émilie, Robichaud Annette, Brochiero Emmanuelle

Statut: Publié dans *Frontiers in Physiology section Respiratory Physiology and Pathophysiology* (158) en 2023 (voir annexe C pour la référence 158)

Contribution: J'ai participé à la grande majorité des expérimentations *in vivo* et je me suis chargée de l'extraction et la compilation des données brutes, leur analyse et interprétation, la production des figures, la rédaction du manuscrit et des révisions à la suite de la revue par les pairs.

5.2 Mise en contexte

La résorption de l'œdème pulmonaire est l'un des éléments clefs dans la résolution du SDRA. En effet, la présence de liquide dans les alvéoles affecte la qualité des échanges gazeux en plus d'imposer un stress mécanique à l'épithélium qui entraîne davantage de dommages. Tel que mentionné précédemment, un épithélium intègre et fonctionnel est indispensable au bon fonctionnement de la clairance alvéolaire par le mécanisme actif de transport ionique et fluide du système ENaC et Na⁺/K⁺-ATPase (279).

En fonction de ces connaissances, des stratégies favorisant l'augmentation de l'expression et de l'activité du canal ENaC ou de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase ont été amplement étudiées. L'utilisation d'agonistes β-adrénergiques ou de glucocorticoïdes sont quelques-unes des options qui, par leur effet bénéfique sur la clairance liquidienne observée dans les modèles *in vivo* (283), n'a

malheureusement pas permis d'obtenir des résultats concluants sur la résolution du SDRA. Des stratégies complémentaires favorisant la clairance alvéolaire seraient donc souhaitables.

Les études précédentes du laboratoire (154,178) ont montré que l'activation des canaux K^+ avait la capacité d'améliorer l'absorption sodique et la résorption liquidienne par l'épithélium alvéolaire en culture primaire *in vitro* toutefois, le rôle de ces canaux K^+ , notamment du canal KvLQT1, n'avait jamais été étudié *in vivo* dans des conditions physiologiques pour l'homéostasie alvéolaire et dans des conditions pathologiques d'œdème pulmonaire.

Nous avons donc débuté par caractériser le phénotype pulmonaire de souris knock-out (KO) pour le canal KvLQT1 en conditions physiologiques. Par la suite, nous avons utilisé un modèle d'œdème pulmonaire induit par la thiourée afin de se focaliser sur le rôle du KvLQT1 dans le mécanisme de clairance liquidienne alvéolaire.

5.3 Manuscrit de l'article #3

IMPACT OF KvLQT1 POTASSIUM CHANNEL MODULATION ON ALVEOLAR FLUID HOMEOSTASIS IN AN ANIMAL MODEL OF THIOUREA-INDUCED LUNG EDEMA

Mélissa AUBIN VEGA^{1,2}, Alban GIRAULT^{1,2,4}, Damien ADAM^{1,2}, Jasmine CHEBLI^{1,2}, Anik PRIVÉ¹,
Émilie MAILLÉ¹, Annette ROBICHAUD³, Emmanuelle BROCHIERO^{1,2*}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc., Montréal, Québec, Canada

⁴Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire (LPCM), Amiens, France

Email addresses:

melissa.aubin.vega@umontreal.ca, alban.girault@u-picardie.fr, damien.adam@umontreal.ca,

annette.robichaud@scireq.com, emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

Keywords: potassium channels, pulmonary edema, animal model, ion/liquid transport, ENaC, Na⁺/K⁺-ATPase, AQP5, lung homeostasis

ABSTRACT

Alveolar ion and fluid absorption is essential for lung homeostasis in healthy conditions as well as for the resorption of lung edema, a key feature of acute respiratory distress syndrome. Liquid absorption is driven by active transepithelial sodium transport, through apical ENaC Na⁺ channels and basolateral Na⁺/K⁺-ATPase. Our previous work unveiled that KvLQT1 K⁺ channels also participate in the control of Na⁺/liquid absorption in alveolar epithelial cells. Our aim was to further investigate the function of KvLQT1 channels and their interplay with other channels/transporters involved in ion/liquid transport *in vivo* using adult wild-type (WT) and KvLQT1 knock-out (KO) mice under physiological conditions and after thiourea-induced lung edema. A slight but significant increase in water lung content (WLC) was observed in naïve KvLQT1-KO mice, relative to WT littermates, whereas lung function was generally preserved and histological structure unaltered. Following thiourea-induced lung edema, KvLQT1-KO did not worsen WLC or lung function. Similarly, lung edema was not aggravated by the administration of a KvLQT1 inhibitor (chromanol). However, KvLQT1 activation (R-L3) significantly reduced WLC in thiourea-challenged WT mice. The benefits of R-L3 were prevented in KO or chromanol-treated WT mice. Furthermore, R-L3 treatment had no effect on thiourea-induced endothelial barrier alteration but restored or enhanced the levels of epithelial alveolar AQP5, Na⁺/K⁺-ATPase, and ENaC expressions. Altogether, the results indicate the benefits of KvLQT1 activation in the resolution of lung edema, probably through the observed up-regulation of epithelial alveolar channels/transporters involved in ion/water transport.

INTRODUCTION

The epithelial tissue lining alveoli is essential to lung homeostasis and function. The alveolar epithelium is composed of alveolar type I (ATI) cells, responsible for gas exchange, and alveolar type II (ATII) cells, which produce and secrete the surfactant, crucial for alveolar stability and lung compliance. In addition, ATII cells are regarded as progenitor cells for lung self-regeneration and

repair after injury (Barkauskas et al., 2013). ATI and ATII cells also play a critical role in the control of fluids at the surface of alveoli. Indeed, fluid absorption, through the paracellular route or via aquaporins across ATI and ATII cells, is essential to maintain alveolar air spaces virtually free of liquid, necessary for effective gas exchange. Liquid clearance is essentially driven by sodium (Na^+) absorption, which depends on passive entry, mainly through apical ENaC channels, and then on active Na^+ exit by the basolateral Na^+/K^+ -ATPase. Potassium (K^+) ion recycling, via basolateral K^+ channels, is also crucial to maintain the driving force for Na^+ absorption (Basset et al., 1987).

The importance of Na^+ transport, through ENaC channels, in alveolar fluid clearance has been demonstrated *in vitro* as well as in various animal models, in physiological conditions, and after acute lung injury (Basset et al., 1987; O'Brodivich et al., 1990; Smedira et al., 1991; Hummler et al., 1996; Fang et al., 2004; Li and Folkesson, 2006; Matthay, 2014). Notably, Hummler *et al.* reported that α -ENaC knock-out (KO) mice were unable to clear alveolar fluid at birth and rapidly died from respiratory distress (Hummler et al., 1996). Although partial transgenic expression of α -ENaC in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ mice rescued the lethal lung phenotype after birth, the remaining impairment in Na^+ transport was associated with a lower resolution rate of acute pulmonary edema after thiourea-induced lung injury (Egli et al., 2004; Aubin Vega et al., 2021). Several experimental studies also demonstrated the role of the Na^+/K^+ -ATPase in alveolar edema clearance (Berthiaume et al., 1987; Olivera et al., 1994; Saldías et al., 1998). Furthermore, previous work highlighted the importance of K^+ channel function in lung ion and fluid absorption. Indeed, it has been reported that $\text{KCa}3.1$ and K_{ATP} channels play a role in Na^+ and K^+ transport pathways and alveolar fluid clearance (Han et al., 2010). Our previous *in vitro* studies also revealed that KvLQT1 and K_{ATP} channels, which contribute to the major part of basolateral K^+ currents across primary rat alveolar epithelial cells, participate in the control of Na^+ transport, through the regulation of ENaC mRNA and protein expression (Leroy et al., 2004, 2006; Bardou et al., 2012). Furthermore, we demonstrated that pharmacological activation of KvLQT1 or K_{ATP} channels secondarily enhanced alveolar fluid clearance through the alveolar epithelium *in vitro* (Leroy et al., 2006; Bardou et al., 2012). In resected human lungs, Sakuma *et al.* also reported that a K_{ATP} channel opener favored alveolar liquid absorption, by a process secondarily mediated by

amiloride-sensitive ENaC channels (Sakuma et al., 1998). However, to the best of our knowledge, the function of KvLQT1 channels in lung fluid clearance has never been studied before *in vivo*. Therefore, the aim of our study was to investigate the function of KvLQT1 channels *in vivo*, using complementary molecular and pharmacological approaches, i.e., KO mice with a targeted mutation in the gene coding for the α -subunit (KCNQ1) of the KvLQT1 channel and lung treatments with pharmacological KvLQT1 modulators. KvLQT1 function was studied in physiological conditions, and then, in a model of pulmonary edema induced by a thiourea challenge to assess the impact of KvLQT1 modulation on fluid clearance. This well-established, long-standing model is characterized by the development of lung edema, within both interstitial and alveolar spaces, peaking at ~4 hours after thiourea injection (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004), which initial rapid removal has been shown to be preferentially driven through alveolar reabsorption (Havill and Gee, 1987). Our results indicated that KvLQT1 activation favors the resolution of lung edema at 4h, probably through the observed up-regulation in alveolar epithelial ENaC channels, AQP5, and Na⁺/K⁺-ATPase expression.

MATERIALS AND METHODS

Animals and ethical statements

Mice with a targeted disruption in the *kcnq1* gene (constitutive *kcnq1*^{-/-} knock-out (KO) mice), coding for the KCNQ1 protein (α -subunit of the KvLQT1 K⁺ channel) was originally generated by insertion of a neomycin cassette into exon 2 by Dr. K. Pfeifer's group (Laboratory of Mammalian Genes and Development, NICHD/National Institutes of Health, Bethesda, USA), as previously described (Casimiro et al., 2001). The initial breeding pairs (on a C57BL/6J background) were kindly given by Dr. K. Pfeifer. The mouse colony was then maintained by breeding heterozygous mice (male *kcnq1*^{+/-} x female *kcnq1*^{+/-}) at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) animal care facility and backcrossed with C57BL/6J wild-type mice (purchased from Jackson Laboratory) every 10 generations. Animals were maintained in a controlled environment with *ad libitum* access to water and food (2018 Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo, USA). Pups were ear punched for genotyping by PCR (using G-KOF (5'-CCA

GGA GTG GGT GGT TCT AC -3'), G-KONF (5'-CGC TTC CTC GTG CTT TAC G-3') and G-KOR (5'-GCC AGC ACT AAA GAT CTT GC-3') primers (Integrated DNA Technologies, US) amplifying 240- and 370-bp products, for WT and mutant alleles) at weaning, and designed WT and KO mice. All procedures involving the use of animals were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the CRCHUM, in agreement with Canadian Council for Animal Care (CCAC) guidelines.

***In vivo* experimental design**

In vivo experiments were performed on 6 to 10 weeks old mice, randomly divided into the experimental groups described below (matched for weight and sex). WT and KO mice were first compared under basal physiological conditions and then after thiourea-induced acute lung edema. Thiourea (TU, 5 mg/kg, Sigma) was injected intraperitoneally (i.p., 150 μ L); the control group received the same volume of PBS (i.p.) (i.e., 4 experimental groups: WT/PBS, KO/PBS, WT/TU, and KO/TU).

The effect of pharmacological treatments with KvLQT1 modulators was also assessed. Briefly, mice received the KvLQT1 activator R-L3 (4 μ M, 1/1000 DMSO (vehicle,(veh)) in PBS, Tocris Bioscience, UK), the KvLQT1 inhibitor chromanol (Chrom, 20 μ M, 1/1000 DMSO (veh) in PBS, Tocris Bioscience USA), a combination of chromanol and R-L3 (R+C) or PBS (PBS+veh (1/1000 DMSO in PBS, Sigma)) by intranasal instillation (i.n., 50 μ L), one hour before the treatment with thiourea (TU, i.p.) or PBS (PBS, i.p.). Groups (i.n./i.p.): PBS/PBS, Chrom/PBS, R-L3/PBS, PBS/TU, Chrom/TU, R-L3/TU and/or R+C/TU are indicated in each figure legends, as appropriate. Four hours after injection of thiourea (or PBS, i.p.), mice were euthanized with an overdose of pentobarbital (i.p.), and lungs were removed to perform water lung content assays, histology/immunofluorescence (IF) analyses or isolation of primary airway or alveolar epithelial cells (see below).

Water lung content assay

After euthanasia, the inferior vena cava was severed; the lungs were removed and directly weighed (wet weight, W). Lungs were heated to 95°C for twenty-four hours to measure the dry

weight (D) and then to calculate the water lung content using the formula (Kabir et al., 2002) :

$$\text{WLC (mg/g)} = \frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{mice weight}}$$

Evans blue extravasation assay

The Evans Blue extravasation assay, a commonly used technique for pulmonary permeability evaluation after endothelial damage, was performed on thiourea-challenged mice. Briefly, animals were treated with PBS or R-L3 (4 μM , i.n.) before thiourea (5 mg/kg, i.p.) administration and finally, three and a half hour later, a solution of Evans Blue (30 mg/kg, Sigma) was injected by the tail vein (i.v.). After 30 minutes of blood circulation, mice were euthanized; lungs were perfused with PBS-EDTA (5 mM, 1 mL) via the pulmonary artery, collected, and washed in PBS baths. Lungs were then minced with scissors and incubated with formamide (Sigma) for eighteen hours at 37°C. The homogenate was centrifuged and the luminescence in the supernatant was measured at 620-740 nm, according to a standard curve of Evans Blue dye. Results were corrected for heme pigment with the following formula:

$$E_{620} (\text{EBD corrected}) = E_{620} - (1.426 \times E_{740} + 0.030)$$

Histological analyses and immunostainings (pro-SPC and podoplanin) of cryomatrix-embedded frozen lung tissue sections

To prevent alveolar collapse, a solution of 4% paraformaldehyde (500 μL , Electron microscopy sciences, USA) was administered by intratracheal instillation (i.t.) before lung collection. Tissue samples were incubated in a sucrose gradient (twenty-four hours for each gradient of 5%, 10%, and 20%) in a solution of paraformaldehyde (0.4%) and embedded in resin (Shandon Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific). After cryosections (5 μm) with a cryostat device (Leica Microsystems, CM1950110111 model), slides were then stained with hematoxylin and eosin (Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit, ThermoScientific, USA) and scanned with a Versa stand on a Leica® light microscope, before histological analysis.

For pro-SPC and podoplanin immunostainings, tissue sections were fixed with 4% paraformaldehyde, membranes were permeabilized with 0.01% Triton X-100 and then blocked with a solution of PBS + 10% FBS (Saradigm, USA) + 10% BSA (Sigma-Aldrich) for one hour. Slides

were incubated overnight at 4°C with anti-pro-SPC (1:100, #AB3786 Millipore, USA) or anti-podoplanin (1:100, #Ab109059, Abcam) rabbit polyclonal antibodies. The day after, tissues were blocked again and incubated with Alexa Fluor™ 568 conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies (1:200, Life Technologies, USA) for one hour followed by a DAPI staining (1:1000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken with an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = 0.75) and analyzed with ICY software. Our analysis protocol allows a quantitative measurement of the intensity (in pixels) of the specific signal of each region of interest (ROI) (stained with each specific primary antibody), normalized to the total number of DAPI-positive cells (more than 10,000 cells have been analyzed for each staining). This ICY protocol also enables adjustment of the parameters of ROI detection to eliminate any potential background signal. However, our control assays (**Supplementary Fig. 1**) showed an absence of background, confirming the specificity of all primary and secondary antibodies used in our assays.

AQP5 immunostaining on formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue sections

After mice euthanasia, an i.t. instillation of formalin (500 µL, Chaptec, Canada) was made before lung collection. Tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin, then in paraformaldehyde 4% (Electron microscopy sciences, USA), dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentrations, cleared in xylene (Chaptec), and embedded in paraffin (Leica Biosystems, USA). Tissue sections (5 µm) were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of ethanol solutions of decreasing concentrations. For AQP5 detection by immunostaining, tissue sections were processed for heat-induced antigenic retrieval (with citrate buffer, pH 3.45) and then blocked with a solution of PBS + 10% FBS (Saradigm, USA) + 10% BSA (Sigma-Aldrich) + 0.01% Triton X-100 (Amersham Biosciences, Sweden) for one hour. Slides were then incubated overnight at 4°C with an anti-AQP5 rabbit polyclonal antibody (1:100, #AQP-005, Alomone Labs, Israël). The day after, they were blocked again and incubated with an Alexa Fluor™ 568 conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:200, Life Technologies, USA) for one hour followed by a DAPI staining (1:1000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken with an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted

fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = 0.75) and analyzed with ICY Software (see section 3.5).

Lung function measurements

The mechanical properties of the respiratory system were assessed in live WT and KO mice, challenged, or not, with thiourea and treated or not with the KvLQT1 activator, R-L3, using the flexiVent FX system (SCIREQ, Montreal, QC, Canada), as previously described (Robichaud et al., 2017). Briefly, mice received an administration of xylazine hydrochloride (12 mg/mL, i.p.) 5 minutes before being deeply anesthetized with sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.). They were then tracheotomized, cannulated (18-gauge metal cannula having a typical resistance of 0.22 cmH₂O.s/mL), and connected to a computer-controlled small animal ventilator for mechanical ventilation. The following settings were used: a tidal volume of 10 mL/kg, frequency of 150 breaths/min, inspiratory to expiratory ratio (I:E) of 2:3, and positive end-expiratory pressure (PEEP) of 3 cmH₂O. Data acquisitions started after two deep lung inflations to 30 cmH₂O, to open closed lung areas as well as to standardize lung volumes, and following observation of a stable ventilation pattern without spontaneous effort. If needed, an additional dose (0.25 – 0.5 mg/kg, i.p.) of the anesthetic agent was administered and approximately 2 minutes of default ventilation was applied to allow for the drug effect to be reached. Four consecutive and different measurement perturbations were performed as one cycle, and the cycle was repeated until three acceptable measurements were recorded. The entire measurement sequence lasted on average 4-5 minutes per subject and lung function was assessed either under basal physiological conditions or four hours after thiourea-induced lung edema. More specifically, pressure-volume (PV) curves were constructed by inflating the lungs by increments of pressure from PEEP up to 30 cmH₂O and then deflating in a similar manner. Pressure and volume signals were recorded at each increment following a brief plateau (1 second) and used to construct partial PV curves. The deflation limbs were analyzed as previously described (Robichaud et al., 2017) and used for the determination of quasi-static compliance (C_{st}). The area between the inflation and deflation limb (Area) was also calculated and the work-of-breathing was determined from the area under the inflation curve normalized to the volume at maximal pressure and expressed per liter to reflect a

normalized inspiratory work of breathing (WOB_n) from a large amplitude maneuver (Phillips et al., 2012; Gremlich et al., 2020; Robichaud et al., 2021). The mechanical properties of the respiratory system were also determined, using both single (SnapShot-150) and broadband (Quick Prime-3) forced oscillation perturbations. The overall resistance (R_{rs}), elastance (E_{rs}) and compliance (C_{rs}) of the respiratory system were obtained, as previously described (Robichaud et al., 2017), from the fitting of the classic single compartment model to the experimental signals of a single forced oscillation measurement. Similarly, the constant-phase model (Hantos et al., 1992) was fit to the respiratory input impedance data from the broadband forced oscillation perturbation to describe the mechanical properties of the subject's respiratory system using parameters such as the Newtonian resistance (R_N) which is dominated by the airway resistance as well as tissue elastance (H) and tissue damping (G) to respectively express the stiffness of the respiratory tissues and the tissue resistance which contains a contribution from the small peripheral airways. Finally, an assessment of the subject's inspiratory capacity was obtained from the deep lung inflation maneuver to 30 cmH₂O, as previously described (Robichaud et al., 2017). At the end of the experiment, averages of the collected datasets were calculated, first for each subject and parameter and then for each experimental group.

Isolation of mouse airway epithelial cells

Mouse airway epithelial cells were isolated from non-treated WT and KO mice. After dissection, the trachea was cut lengthwise and incubated for the night at 4°C in minimal essential medium (MEM, Life Technologies) supplemented with 7.5 % NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Ontario, Canada), 10 mM HEPES (Thermo-Fisher Scientific Inc., #SH3023701), 0.05 mg/mL gentamycin (Life Technologies), 50 U/mL penicillin-streptomycin (ThermoScientific), and containing a mix of 0.1 % protease (from *Streptomyces griseus*; Sigma-Aldrich) and 10 µg/mL DNase (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas; Roche, USA). The cells were then gently scraped off the cartilaginous structure and the activity of protease/DNase was neutralized by adding FBS. The collected cell suspension was then centrifuged, counted, and seeded into Transwell® (0.4 µm pore size, Corning, USA) coated with Purecol® (Cedarlane, Burlington, Canada). Cells were cultured in CnT-17 medium (CELLnTEC Advanced Cell Systems, Bern,

Switzerland) + 20% FBS for 13 days. Then, the medium bathing the apical side of the airway epithelium was removed to create an air-liquid interface. Forty-eight hours later, the medium from the basolateral compartment was replaced by complete SAGM™ (LHC basal medium supplemented with the SAGM™ kit, Clonetics, Walkersville, MD) added with 25 ng/mL EGF (Sigma-Aldrich), 100 U/mL of penicillin-streptomycin (ThermoScientific), 0.07 µg/mL phosphorylethanolamine (Sigma-Aldrich), 1.86 ng/mL ethanolamine (Sigma-Aldrich), 0.05 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich), electrolytes and trace elements (kindly provided by Dr. Scott Randell, University of North Carolina) for 2 days, before electrophysiological experiments in Ussing chambers.

Measurement of short-circuit currents in Ussing chambers

Short-circuit currents (I_{sc}) were measured through polarized cultures of airway epithelial cells (isolated from WT and KO mice) grown on permeant filters at the air-liquid interface. After stabilization of the short-circuit current, the total basolateral K⁺ current was determined after permeabilization of the apical membrane with amphotericin B (7.5 µM, Sigma-Aldrich) and establishment of an apical-to-basolateral K⁺ gradient. The apical side was bathed with a high K⁺ physiological solution containing: 81 mM NaCl, 65.4 mM KCl, 0.78 mM NaH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM glucose, and 15 mM HEPES, pH 7.4, whereas for the basolateral side, 60 mM of KCl was replaced by an equivalent amount of *N*-methyl-D-glucamine chloride. Therefore, all ion concentrations, except K⁺, were symmetrical in solutions bathing both sides of the membrane, meaning that only K⁺ ions can be conducted through the basolateral membrane. In these experimental conditions, the difference between total K⁺ basolateral currents in cell cultures from WT and KO mice corresponds to the current driven by KvLQT1 channels. After stabilization of the current, 20 µM chromanol was added to the basolateral medium, to determine the chromanol-sensitive basolateral K⁺ current through KvLQT1 channels.

Isolation of alveolar type II (ATII) epithelial cells

ATII cells were isolated from WT mouse lungs in the control condition and after thiourea-induced acute lung edema treated or not with R-L3. After collection, the lungs were washed with a

physiological solution to remove excess blood cells and alveolar macrophages. Then, the lungs were digested within an elastase solution (30 U/mice, Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. USA, 30-45 minutes), minced, and the resulting cell suspension was filtered. Alveolar epithelial cells were purified using a differential adherence technique (Dobbs et al., 1986), which enhances the purity of the alveolar type II (ATII) cell pool by up to 86% (Brochiero et al., 2004). Cells were counted and the cell suspension was resuspended in PBS to reach a density of 80,000 cells (in 200 μ L PBS/slide) after cytocentrifugation with Cytospin 4 (Thermo Fisher, UK) for immediate immunofluorescence assay.

α -ENaC and Na^+/K^+ -ATPase immunostaining of ATII cells

Cytopentrifuged, freshly isolated ATII cells were fixed with 4% paraformaldehyde, membranes were permeabilized with 0.01% Triton X-100 (for Na^+/K^+ -ATPase staining) and then blocked with a solution of PBS + 10% FBS (Saradigm, USA) + 10% BSA (Sigma-Aldrich) (before α -ENaC staining) or with a solution of PBS + 1% BSA + 5% goat serum (Life Technologies, USA) (before Na^+/K^+ -ATPase staining). Slides were incubated overnight at 4°C with anti- α -ENaC rabbit polyclonal (1:100, #AB2184369, Invitrogen, USA) or anti- Na^+/K^+ -ATPase mouse monoclonal (1:100, clone C464.6, Millipore, USA) antibodies. The day after, they were blocked again, incubated with Alexa Fluor™ 568 conjugated donkey anti-rabbit secondary (α -ENaC staining) or Alexa Fluor™ 568 conjugated goat anti-mouse secondary antibodies ((Na^+/K^+ -ATPase staining), 1:200, Life Technologies, USA) for one hour, followed by a DAPI staining (1:1000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken with an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = 0.75) and analyzed with ICY software (see section 3.5).

Statistical analyses

The data are presented in dot plot graphs with mean \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). First, normality tests (Agostino/Pearson) were performed followed

by the appropriate statistical tests, as described for each figure legend. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Effective *kcnq1* extinction in lung tissues of constitutive *kcnq1*^{-/-} (KO) mice was first validated. As expected, amplification by PCR of genomic DNA extracted from ear and lung tissues of WT and KO mice generated 240- and 370-bp products specific to the WT and mutant alleles (Casimiro et al., 2001), respectively (**Figure 1A**). Moreover, immunofluorescence analyses confirmed KvLQT1 protein extinction in epithelial airway cells collected from KO mice, compared to WT (**Figure 1B**). Short-circuit current measurements in Ussing chamber (see representative traces in **Figure 1C**) showed that the total basolateral K⁺ current in cell cultures from WT mice ($42.8 \pm 6.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, **Figure 1D**, WT) was significantly higher than in cultures from KO mice ($22.6 \pm 4.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, **Figure 1D**, KO), i.e. a difference of $20.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, corresponding to the current driven by KvLQT1 channels (47% of the total basolateral currents). We also showed that chromanol-sensitive KvLQT1 currents were abolished ($-0.4 \pm 0.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) through primary cultures of airway epithelial cells, collected from KO mice (**Figure 1E**). It has to be noted that transepithelial resistances of WT and KO cell cultures were similar (**Figure 1F**).

The impact of KvLQT1-KO has already been studied in several organs (Casimiro et al., 2001; Knollmann et al., 2004; Boini et al., 2009; Song et al., 2009; Wang et al., 2009), but, to the best of our knowledge, the lung phenotype has not been defined yet. The observed reduction (47%, $p < 0.01$) in total basolateral K⁺ currents in KO mice indicated the large contribution of KvLQT1 channels (**Figure 1D**), while remaining K⁺ currents can be conducted by other classes of K⁺ channels also expressed in the lung (Bardou et al., 2009). KvLQT1-KO was associated with a small but statistically significant rise in water lung content, compared to WT (**Figure 2A**). However, lung function analyses showed that the PV curves (**Figure 2B**) constructed with the flexiVent system, as well as static compliance (C_{st} , **Figure 2C**) from the two experimental groups were similar. Slight but significant changes were measured in overall respiratory system resistance (Rrs), elastance (Ers), and compliance (Crs) as well as tissue damping (G), related to alterations of the peripheral

tissues. No difference was observed for the other respiratory mechanic parameters measured, including airway resistance (R_n) (**Supplementary Figure 2**). Also, no histological differences were noticeable between lungs from WT and KO mice (**Figure 2D**). These results indicate that the KvLQT1 deletion did not elicit major functional and structural impairments under basal physiological conditions.

We then evaluated the role of KvLQT1 channels using a well-established acute model of thiourea-induced lung edema, peaking at 4h (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004). As expected, increased water lung content was observed in WT mice challenged with thiourea (WT/PBS/TU, **Figure 3A**). In KO mice, similar levels of lung edema were measured indicating a comparable response to thiourea (WT/PBS/TU and KO/PBS/TU groups, **Figure 3A**). The impact of KvLQT1 pharmacological inhibition in thiourea-challenged mice was also assessed. Chromanol administration to the lungs (by intranasal instillation) did not worsen the edema index of thiourea-challenged WT mice (WT/PBS/TU vs WT/Chrom/TU groups, **Figure 3A**).

In addition to the lung edema, a shift in the shape of the PV curve (**Figure 3B**, left panel), as reflected by a slight but statistically significant decrease in the static compliance (C_{st} ; **Figure 3B**, right panel) was observed after the thiourea challenge in WT mice. As shown in **Supplementary Figure 3**, other parameters (E_{rs} , C_{rs} , A , IC , and H) are also modified after thiourea-induced lung edema.

Consistent with the water lung content results, no worsening of the lung function parameters (**Figure 3C + Supplementary Figure 4**) was observed in KO animals which exhibited similar sensitivity to thiourea. Moreover, similar histological features were seen in WT and KO thiourea mice (**Figure 3D**).

Interestingly, the pharmacological activation of KvLQT1 with R-L3 induced a statistically significant reduction of the water lung content in WT mice treated with thiourea (R-L3/TU mice, compared to the PBS/TU group, **Figure 4A**, left panel). This beneficial effect of R-L3 was abolished in KvLQT1-KO mice (R-L3/TU KO mice, **Figure 4A**, middle panel) as well as in WT mice co-treated with the

KvLQT1 inhibitor chromanol (R-L3+Chrom/TU (R+C/TU) group, **Figure 4A**, right panel), thus confirming that the observed decrease in lung edema in R-L3-treated WT mice (R-L3/TU group) is mediated by KvLQT1 channels.

Exposure to thiourea is associated with alveolar capillary injury and a secondary increase in vascular permeability (Giri et al., 1991), as confirmed by the increased Evans Blue dye extravasation from the blood in lung homogenates from thiourea-challenged WT mice (**Figure 4B**). We thus tested the hypothesis that the beneficial effect of the KvLQT1 activator R-L3 on the edema index could be due to endothelial barrier preservation. Nonetheless, the observed increase in endothelial permeability in thiourea-challenged mice was not prevented by the R-L3 treatment (**Figure 4B**). Moreover, the treatment with R-L3 did not improve the shape of the PV curve, the static compliance (C_{st} , **Figure 4C**), and other respiratory mechanic parameters at the dose tested (**Supplementary Figure 3**). Hematoxylin-eosin staining of lung sections from WT mice after thiourea-induced lung edema, treated (R-L3/TU) or not (PBS/TU) with R-L3 (**Figure 4D**) did not reveal any major disruption of alveolar epithelial structure.

We then postulated that the benefits of KvLQT1 activation on edema resolution could be mediated through an improvement in alveolar epithelial integrity and/or function. To test this hypothesis, we performed immunofluorescence assays with specific markers of alveolar epithelial cells as well as proteins involved in Na^+ and secondary liquid, absorption (**Figures 5-6**). Because type I alveolar epithelial (ATI) cells are especially vulnerable to injury, we further assessed the expression of two ATI markers; podoplanin (**Figure 5A**) and AQP5 (**Figure 5B**). A statistically significant decrease in podoplanin and AQP5 was observed after the thiourea challenge (PBS/TU). Importantly, KvLQT1 activation with R-L3 (R-L3/TU group) partially restored aquaporin (AQP5) expression; this effect is statistically significant (**Figure 5B**). We then observed that the staining intensity of the pro-SPC protein (ATII marker, **Figure 5C**) was significantly reduced in lung sections from thiourea-challenged mice, but treatment with R-L3 failed to reverse this deleterious effect.

Finally, the expression of ENaC channels and Na⁺/K⁺-ATPase was assessed (**Figure 6**), given their major contribution in Na⁺, and secondarily liquid, absorption through the alveolar epithelium. Immunostainings of primary alveolar epithelial cells, freshly isolated from WT mice, indicated that the intensity of ENaC expression per cell tends to decrease after thiourea-induced lung edema (PBS/TU, compared to PBS/PBS) (**Figure 6A**), while the R-L3 treatment (R-L3/TU) allows to recover ENaC expression levels to a value slightly above the control (without thiourea) (**Figure 6A**). Exposure to thiourea (PBS/TU) did not significantly alter the Na⁺/K⁺-ATPase level of intensity (**Figure 6B**) but significantly reduced the number of Na⁺/K⁺-ATPase marked regions (ROI, not shown). Importantly, KvLQT1 activation with R-L3 (R-L3/TU) upregulated the intensity of Na⁺/K⁺-ATPase expression per DAPI-positive cell (**Figure 6B**).

DISCUSSION

The goal of this study was to investigate the function of KvLQT1 channels using *in vivo* complementary molecular and pharmacological approaches in mice, both under physiological conditions as well as following acute lung edema induced by thiourea. We found that the deletion of KvLQT1 channels, which account for approximately 50% of the total basolateral K⁺ current, was associated, in physiological conditions, with a slight rise in water lung content, whereas neither histological changes nor major alterations in respiratory function were observed. Moreover, neither KvLQT1-KO nor its pharmacological inhibition (with chromanol) worsened the lung edema induced by thiourea. However, lung administration of the KvLQT1 activator R-L3 significantly reduced the thiourea-induced pulmonary edema in WT mice. This beneficial effect was prevented in KO and chromanol-treated WT mice, confirming a KvLQT1-dependent mechanism. R-L3 treatment in WT mice also reversed the thiourea-induced decrease in aquaporin channel AQP5 and ENaC expression and enhanced the Na⁺/K⁺-ATPase levels, which may favor lung edema clearance, as observed.

Kcnq1^{-/-} KO mice used in our study were originally generated as a model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome, a disorder featuring profound bilateral deafness and a cardiac phenotype (Casimiro et al., 2001). As expected, we noted that KO mice exhibited head bobbing and

intermittent bidirectional circling, a behavior symptomatic of inner ear defects, usually referred to as the shaker/waltzer phenotype. Altered inner ear, cardiac, and thyroid gland phenotypes have already been reported in these KO mice (Casimiro et al., 2001; Tosaka et al., 2003; Knollmann et al., 2004, 2007; Fröhlich et al., 2011). A study on insulin sensitivity also showed an impact of KCNQ1 disruption on glucose uptake in various tissues including lungs (Boini et al., 2009). However, the lung morphological and functional phenotype associated with KvLQT1 disruption has, to the best of our knowledge, never been investigated before, neither in physiological nor pathological conditions.

According to our histological observations of lung sections, the deletion of the KvLQT1 α -subunit KCNQ1 did not cause any morphological changes in the lungs. In agreement with our data, previous work showed that disruption of the KvLQT1 β -subunit (KCNE3) did not alter the morphology of small intestine, colon, tracheal, and lung epithelia, while ion transport properties through the intestinal and tracheal epithelia were dramatically affected (Preston et al., 2010). Structural changes associated with KvLQT1 dysfunction have however been observed in other organs. Indeed, gross morphological anomalies in inner ear structures and severe histological alterations of the gastric mucosa, accompanied by deafness and impaired acid secretion, respectively, have been reported using KCNQ1-KO mice models (Lee et al., 2000; Casimiro et al., 2001).

Functional electrophysiological analyses in Ussing chamber revealed that total basolateral K^+ currents were reduced by $20.2 \mu A/cm^2$ (i.e. a 47% decrease) in airway epithelial cells from KO mice, compared to WT (**Figure 1D**). These data are in agreement with previous reports, including from our laboratory, indicating a major contribution of KvLQT1 channels to the total basolateral K^+ conductance in murine tracheal and alveolar epithelial cells (Grahammer et al., 2001; Leroy et al., 2004; Trinh et al., 2007) as well as human airway epithelial cell models (Cowley and Linsdell, 2002; Trinh et al., 2008). Our measurements also confirmed that KCNQ1 extinction in KO mice abolished the chromanol-sensitive basolateral K^+ currents (**Figure 1E**). We noted however that the amplitude of the K^+ current sensitive to $20 \mu M$ chromanol in WT mice was lower ($10 \mu A/cm^2$)

than the decrease ($20.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) in total K^+ current induced by the full extinction of KvLQT1 in KO mice. Higher chromanol concentrations would probably have elicited a larger inhibition, but non-specific effects at a high dose could not have been ruled out.

As illustrated by the individual data reported in **Figure 1D-E**, the amplitude of the chromanol-sensitive KvLQT1 currents and the impact of KvLQT1 extinction on the total basolateral K^+ current are variable among animals, suggesting that the relative contribution of KvLQT1 channels may vary in resting conditions. Actually, more than 30 different K^+ channels, from different classes, have been detected in the respiratory epithelium (Bardou et al., 2009). Although the function of many of these lung K^+ channels is still unknown, some of them (including KCa and K_{ATP} channels (Cowley and Linsdell, 2002; Bernard et al., 2003; Leroy et al., 2004; Trinh et al., 2008)) may contribute to the remaining K^+ current observed in KvLQT1-KO cells, in basal conditions.

A small, but significant, increase in basal water lung content was observed in the lungs of KvLQT1-KO mice, compared to WT, under basal physiological conditions (**Figure 2A**). This observation may be explained, at least in part, by the impact of KvLQT1 disruption on alveolar fluid homeostasis. Indeed, our previous work unveiled that KvLQT1 channel chronic inhibition impaired liquid absorption through primary alveolar cell cultures (Leroy et al., 2006; Bardou et al., 2012). No increase in water lung content was however observed after a short treatment with chromanol in the basal condition in WT mice (**Figure 3A**, Chrom/PBS). Lung function in KO mice was mostly preserved with only minor changes in some mechanical parameters (*Rrs*, *Ers*, *Crs*, *G*) of the overall respiratory system (**Supplementary Figure 2**). While the rise in water lung content may contribute to the observed increase in tissue damping and overall respiratory resistance, either by fluid accumulation or compression of the airways, the involvement of other parameters (e.g., alteration in lung surfactant production) cannot be ruled out.

The role of KvLQT1 channels was also studied under conditions inducing edema in the lung. In WT mice, acute exposure to thiourea (4h) resulted in a change in the shape of the PV curves, with a statistically significant decrease in static compliance and lung edema flooding, indicated by a

>50% increase in water lung content (**Figure 3A-B**). This observation is in agreement with previous reports (Hesse, Cunningham, Havill, Egli) showing the development of lung edema, peaking at ~4h. We are aware that this water lung content elevation could be secondary, at least in part, to interstitial fluid accumulation. Indeed, the presence of alveolar fluids was not visible on our histological images of lung sections from thiourea-challenged mice. This could be due to a limitation related to our protocol of H&E staining of 5 μm sections of embedded tissues, observed with a light microscope with a 20x objective, which is not well adapted for the observation of alveolar liquid, as confirmed by the CRCHUM pathologist we consulted. Nevertheless, the flooding of lung edema within both the interstitial and alveolar compartments has been previously well described (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004). Using 1 μm sections of Araldite-embedded lung tissues, Cunningham *et al.* (Cunningham and Hurley, 1972) observed the first signs of developing edema in the perivascular space, at 2 hours after thiourea injection, followed at 3-4 hours by edema fluid infiltration within alveoli. Similarly, histological examination of 1 μm sections of Epon-embedded lungs stained with toluidine blue revealed alveolar edema 4h after thiourea administration (Egli et al., 2004). Havill et al. (Havill and Gee, 1987) also reported the flooding of edema fluids in the perivascular and alveolar compartments of thiourea animals, peaking at 2-4 hours, and which initial rapid removal was preferentially driven through alveolar reabsorption.

Although the KO mice exhibited elevated basal water lung content in physiological conditions, the lung weight analyses following thiourea exposure demonstrated a similar edema index as the WT control mice (exhibiting functional KvLQT1 channels) or the WT ones treated with the KvLQT1 inhibitor. Similarly, lung function parameters were not worsened in KO mice (**Supplementary Figure 4**). A compensatory effect through other types of K^+ channels (indicated by the remaining K^+ conductance in KO mice) may explain this observation.

Importantly, lung treatment with R-L3 significantly reduced the lung edema induced by thiourea in WT mice (**Figure 4A**). This beneficial effect of R-L3 was prevented by a co-treatment with the chromanol inhibitor or in KO mice lacking the KCNQ1 α -subunit, confirming the specificity of the

R-L3 effect through KvLQT1 channels. To the best of our knowledge, this is the first evidence of KvLQT1 channel involvement in lung edema resolution using an *in vivo* model. Nevertheless, Sakuma *et al.* previously reported that an opener of another type of K⁺ channel (i.e. K_{ATP}) enhanced the K⁺ transport and alveolar fluid clearance in human resected lungs (Sakuma *et al.*, 1998). These data are in agreement with our previous *in vitro* studies (Leroy *et al.*, 2006; Bardou *et al.*, 2012) showing improved fluid absorption through polarized primary cultures of alveolar epithelial cells after treatment with K_{ATP} and/or KvLQT1 activators.

The measurements of respiratory mechanics done in the present study showed that lung administration of the KvLQT1 activator did not reverse the effect of thiourea on the shape of the PV loop and quasi-static compliance (C_{st}) at the dose and time studied (**Figure 4C**).

As expected, our data (**Figure 4B**) confirmed that the thiourea challenge was associated with an increase in lung vascular permeability, due to endothelial barrier damage (Cunningham and Hurley, 1972; Giri *et al.*, 1991). Evans blue extravasation was similar in R-L3/TU mice, indicating that the benefits of KvLQT1 activation on lung edema were not due to a protective effect on the endothelial barrier. Expression and function of various types of KCa, K_{ATP}, and Kv channels, including members of the Kv7/KCNQ family, have been observed in endothelial and/or vascular smooth cells (Chatterjee *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2010; Haick and Byron, 2016; Simonsen *et al.*, 2017). However, direct evidence of KvLQT1 function in endothelial integrity, using specific pharmacological drugs, has, to the best of our knowledge, never been reported. Nevertheless, inhibition of vascular Kv7 channels, after intravenous administration of the broad KCNQ blocker linopirdine reduced fluid resuscitation requirements and tissue edema formation after hemorrhagic shock (Nassoiy *et al.*, 2018). On the contrary, Khimenko *et al.* showed that K_{ATP} activation both protected against, and reversed, the increase in endothelial permeability associated with ischemia-reperfusion injury in a model of isolated rat lungs (Khimenko *et al.*, 1995).

Although previous ultrastructural examination under electron microscopy after thiourea exposure (Michel, 1985) showed lung microvascular abnormalities, these are not detectable under light microscopy. Our histological analyses of lung parenchymal sections neither revealed any differences in alveolar structures between our experimental groups (PBS/PBS, PBS/TU, and R-L3/TU conditions, **Figure 4D**). Immunofluorescence assays however showed a significant reduction in ATI (podoplanin and AQP5) and AII (pro-SPC) specific cell markers as well as a trend in ENaC reduction (**Figure 5A-C, Figure 6A**). These results indicate an alteration of alveolar epithelial integrity and/or functionality after the thiourea challenge. It might be postulated that the decrease in water channel AQP5 expression may contribute to lung liquid accumulation in thiourea-treated mice. However, models of acute lung injury (including the one induced by thiourea) in AQP-KO mice, indicated that these water channels are not essential for lung liquid clearance (Song et al., 2000). The decrease in pro-SPC levels, as well as lung edema formation, could both contribute to the altered compliance observed in thiourea-treated mice (**Figure 3B**).

Despite the R-L3 treatment, pro-SPC levels remained low in thiourea-challenged mice (**Figure 5C**). A relationship between alveolar surfactant protein expression and the function of another class of K⁺ channel (K2P) has however been shown in a model of lung injury induced by a combination of hyperoxia and mechanical ventilation (Schwingshackl et al., 2017). Importantly, KvLQT1 activation with R-L3 reversed the decrease in AQP5 expression induced by thiourea (**Figure 5B**). The same pattern was also observed in ENaC levels (although the difference was not statistically significant, **Figure 6A**). KvLQT1 activation also induced a significant up-regulation of Na⁺/K⁺-ATPase expression in alveolar cells isolated from R-L3/TU-treated mice (**Figure 6B**). In control experiments, we also defined the level of expression of podoplanin, AQP5, ENaC, and Na⁺/K⁺-ATPase in alveolar cells isolated from mice treated with R-L3, without any thiourea challenge. As shown in **Supplementary Figure 5**, quantitative ICY analyses of immunostaining assays did not reveal any changes in podoplanin and AQP5 levels, whereas a rising trend in Na⁺/K⁺-ATPase and a significant increase in ENaC were observed. In agreement with our results, one of our previous *in vitro* studies showed that KvLQT1 activation was associated with an increase in α -ENaC promoter activity (through regulation of MAPK activity), a rise in ENaC expression and function,

and subsequently, improved liquid absorption through primary alveolar epithelial cell cultures (Leroy et al., 2006; Bardou et al., 2012). Sakuma *et al.* also reported an increase in alveolar fluid clearance after K_{ATP} channel activation, mediated by amiloride-sensitive sodium channels (Sakuma et al., 1998). Moreover, a rise in Na^+/K^+ -ATPase expression, after gene transfer, was shown to reduce the wet-to-dry ratio in thiourea-treated mice (Stern et al., 2000). Altogether, the up-regulation of AQP5, α -ENaC, and Na^+/K^+ -ATPase alveolar expression, secondary to KvLQT1 activation, may contribute to the liquid clearance after thiourea-induced lung edema. It could be thus postulated that the beneficial effect of the KvLQT1 activator on the resolution of lung edema may mainly be driven by the action of alveolar cells, rather than interstitial fluid removal, as indicated by an absence of endothelial preservation by the R-L3 treatment.

In summary, our study demonstrated that KvLQT1 extinction slightly altered alveolar liquid homeostasis in physiological conditions but did not worsen lung edema in thiourea-treated mice. The relative contribution, and compensatory effects, of other classes of K^+ channels (e.g., K_{ATP} , K2P, KCa) would need further investigations. Nevertheless, our data indicated a beneficial effect of KvLQT1 activation on lung edema clearance, most probably through the observed up-regulation of channels/transporters involved in alveolar ion/water absorption (as represented in the schematic model in **Figure 7**).

We are aware that the model of thiourea-induced lung edema recapitulates only part of the main features of acute respiratory distress syndrome (characterized by endothelial vascular and epithelial alveolar damage, exacerbated inflammatory response, and lung edema). Therefore, the role of KvLQT1 channels in the resolution of ARDS parameters remains to be confirmed using complementary models of acute lung injury mimicking direct or extra-pulmonary causes of ARDS. Moreover, other types of K^+ channels, including stretch-activated channels, have been proposed as therapeutic targets for ARDS (Schwingshackl, 2016). Combined treatments, targeting KvLQT1, K_{ATP} , and/or K2P channels, might also be considered.

REFERENCES

- Aubin Vega, M., Chupin, C., Massé, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E. (2021). Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin. *Exp. Physiol.* 106, 1110–1119. doi: 10.1113/EP089060.
- Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., et al. (2012). K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 1682–1690. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.02.025.
- Bardou, O., Trinh, N. T. N., and Brochiero, E. (2009). Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 296, L145–L155. doi: 10.1152/ajplung.90525.2008.
- Barkauskas, C. E., Cronce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., et al. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 123, 3025–3036. doi: 10.1172/JCI68782.
- Basset, G., Crone, C., and Saumon, G. (1987). Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J. Physiol.* 384, 311–324. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016456.
- Bernard, K., Bogliolo, S., Soriani, O., and Ehrenfeld, J. (2003). Modulation of Calcium-dependent Chloride Secretion by Basolateral SK4-like Channels in a Human Bronchial Cell Line. *J. Membr. Biol.* 196, 15–31. doi: 10.1007/s00232-003-0621-3.
- Berthiaume, Y., Staub, N. C., and Matthay, M. A. (1987). Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J. Clin. Invest.* 79, 335–343. doi: 10.1172/JCI112817.
- Boini, K. M., Graf, D., Hennige, A. M., Koka, S., Kempe, D. S., Wang, K., et al. (2009). Enhanced insulin sensitivity of gene-targeted mice lacking functional KCNQ1. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, 22–26. doi: 10.1152/ajpregu.90839.2008.
- Brochiero, E., Dagenais, A., Privé, A., Berthiaume, Y., and Grygorczyk, R. (2004). Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L382–92. doi: 10.1152/ajplung.00320.2002.
- Casimiro, M. C., Knollmann, B. C., Ebert, S. N., Vary, J. C., Greene, A. E., Franz, M. R., et al. (2001). Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen

- Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2526–2531. doi: 10.1073/pnas.041398998.
- Chatterjee, S., Chapman, K. E., and Fisher, A. B. (2008). Lung ischemia: A model for endothelial mechanotransduction. *Cell Biochem. Biophys.* 52, 125–138. doi:10.1007/s12013-008-9030-7.
- Cowley, E. A., and Linsdell, P. (2002). Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J. Physiol.* 538, 747–757. doi: 10.1013/jphysiol.2001.013300.
- Cunningham, A., and Hurley, J. (1972). Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study. *J. Pathol.* 106, 25–35. doi: 10.1002/path.1711060103.
- Dobbs, L. G., Gonzalez, R., and Williams, M. C. (1986). An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 134, 141–145.
- Egli, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., et al. (2004). Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol* 5603, 857–865. doi: 10.1113/jphysiol.2004.066704.
- Fang, X., Song, Y., Zemans, R., Hirsch, J., and Matthay, M. A. (2004). Fluid transport across cultured rat alveolar epithelial cells: A novel in vitro system. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, 104–110. doi: 10.1152/ajplung.00176.2003.
- Fröhlich, H., Boini, K. M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., Ureche, O. N., Föllner, M., et al. (2011). Hypothyroidism of gene-targeted mice lacking Kcnq1. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 461, 45–52. doi: 10.1007/s00424-010-0890-5.
- Giri, S. N., Hollinger, M. A., and Rice, S. A. (1991). Effects of thiourea on pulmonary vascular permeability and on lung and plasma histamine levels in rats. *Toxicol. Lett.* 57, 283–290. doi: 10.1016/0378-4274(91)90202-H.
- Grahammer, F., Warth, R., Barhanin, J., Bleich, M., and Hug, M. J. (2001). The Small Conductance K⁺ Channel, KCNQ1. Expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J. Biol. Chem.* 276, 42268–42275. doi: 10.1074/jbc.M105014200.
- Gremlich, S., Roth-Kleiner, M., Equey, L., Fytianos, K., Schittny, J. C., and Cremona, T. P. (2020). Tenascin-C inactivation impacts lung structure and function beyond lung development. *Sci. Rep.* 10, 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-61919-x.

- Haick, J. M., and Byron, K. L. (2016). Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels. *Pharmacol. Ther.* 165, 14–25. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.05.002.
- Han, D. Y., Nie, H. G., Gu, X., Nayak, R. C., Su, X. F., Fu, J., et al. (2010). K⁺ channel openers restore verapamil-inhibited lung fluid resolution and transepithelial ion transport. *Respir. Res.* 11, 1–17. doi: 10.1186/1465-9921-11-65.
- Hantos, Z., Daroczy, B., Suki, B., Nagy, S., and Fredberg, J. J. (1992). Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J. Appl. Physiol.* 72, 168–178. doi: 10.1152/jappl.1992.72.1.168.
- Havill, A. M., and Gee, M. H. (1987). Resolution of increased permeability pulmonary edema in rats. *Am. J. Pathol.* 127, 441–446. doi: PMID: 3109247.
- Hesse, F. E., and Loosli, C. G. (1949). The lining of the alveoli in mice, rats, dogs, and frogs following acute pulmonary edema produced by ANTU poisoning. *Anat. Rec.* 105, 299–323. doi: 10.1002/ar.1091050207.
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., et al. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 12, 925–928. doi: 10.1038/ng0396-325.
- Kabir, K., Gelinas, J. P., Chen, M., Chen, D., Zhang, D., Luo, X., et al. (2002). Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock* 17, 300–303. doi: 10.1097/00024382-200204000-00010.
- Khimenko, P. L., Moore, T. M., and Taylor, A. E. (1995). ATP-sensitive K⁺ channels are not involved in ischemia-reperfusion lung endothelial injury. *J. Appl. Physiol.* 79, 554–559. doi: 10.1152/jappl.1995.79.2.554.
- Knollmann, B. C., Casimiro, M. C., Katchman, A. N., Sirenko, S. G., Schober, T., Rong, Q., et al. (2004). Isoproterenol exacerbates a long QT phenotype in Kcnq1-deficient neonatal mice: Possible roles for human-like Kcnq1 isoform 1 and slow delayed rectifier K⁺ current. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 311–318. doi: 10.1124/jpet.103.063743.
- Knollmann, B. C., Sirenko, S., Rong, Q., Katchman, A. N., Casimiro, M., Pfeifer, K., et al. (2007). Kcnq1 contributes to an adrenergic-sensitive steady-state K⁺ current in mouse heart.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 212–218. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.038.
- Lee, M. P., Ravenel, J. D., Hu, R. J., Lustig, L. R., Tomaselli, G., Berger, R. D., et al. (2000). Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J. Clin. Invest.* 106, 1447–1455. doi: 10.1172/JCI10897.
- Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E. (2004). Molecular identity and function in transepithelial transport of $K_{(ATP)}$ channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L1027–37. doi: 10.1152/ajplung.00249.2003.
- Leroy, C., Privé, A., Bourret, J.-C., Berthiaume, Y., Ferraro, P., and Brochiero, E. (2006). Regulation of ENaC and CFTR expression with K^+ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L1207–L1219. doi: 10.1152/ajplung.00376.2005.
- Li, T., and Folkesson, H. G. (2006). RNA interference for α -ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, 649–660. doi: 10.1152/ajplung.00205.2005.
- Matthay, M. A. (2014). Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1301–1308. doi: 10.1164/rccm.201403-0535OE.
- Michel, R. P. (1985). Lung Microvascular Permeability to Dextran in α -Naphthylthiourea-Induced Edema. Sites of filtration, patterns of accumulation, and effects of fixation. *Am P Pathol* 119, 474–484.
- Nassoiy, S. P., Babu, F. S., LaPorte, H. M., Byron, K. L., and Majetschak, M. (2018). Effects of the Kv7 voltage-activated potassium channel inhibitor linopirdine in rat models of haemorrhagic shock. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 45, 916–926. doi: 10.1111/1440-1681.12958.
- Ng, F. L., Davis, A. J., Jepps, T. A., Harhun, M. I., Yeung, S. Y., Wan, A., et al. (2010). Vascular KCNQ channels in humans: The sub-threshold brake that regulates vascular tone? *Br. J. Pharmacol.* 162, 42–53. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01065.x.
- O’Brodivich, H., Hannam, V., Seear, M., and Mullen, J. B. M. (1990). Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 68, 1758–1762. doi: 10.1152/jappl.1990.68.4.1758.
- Olivera, W., Ridge, K., Wood, L. D. H., and Sznajder, J. I. (1994). Active sodium transport and

- alveolar epithelial Na-K-ATPase increase during subacute hyperoxia in rats. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 266, L577–L584. doi: 10.1152/ajplung.1994.266.5.l577.
- Phillips, J. E., Peng, R., Burns, L., Harris, P., Garrido, R., Tyagi, G., et al. (2012). Bleomycin induced lung fibrosis increases work of breathing in the mouse. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 25, 281–285. doi: 10.1016/j.pupt.2011.10.001.
- Preston, P., Wartosch, L., Günzel, D., Fromm, M., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., et al. (2010). Disruption of the K⁺ channel β -subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *J. Biol. Chem.* 285, 7165–7175. doi: 10.1074/jbc.M109.047829.
- Robichaud, A., Fereydoonzad, L., Collins, S. L., Loube, J. M., Ishii, Y., Horton, M. R., et al. (2021). Airway compliance measurements in mouse models of respiratory diseases. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 321, 204–212. doi: 10.1152/AJPLUNG.00470.2020.
- Robichaud, A., Fereydoonzad, L., Limjunyawong, N., Rabold, R., Allard, B., Benedetti, A., et al. (2017). Automated full-range pressure-volume curves in mice and rats. *J. Appl. Physiol.* 123, 746–756. doi: 10.1152/jappphysiol.00856.2016.
- Sakuma, T., Takahashi, K., Ohya, N., Nakada, T., and Matthay, M. A. (1998). Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 16–22. doi: 10.1111/j.1600-0773.1998.tb01436.x.
- Saldías, F., Lecuona, E., Friedman, E., Barnard, M. L., Ridge, K. M., and Sznajder, J. I. (1998). Modulation of lung liquid clearance by isoproterenol in rat lungs. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 274, L694–L701. doi: 10.1152/ajplung.1998.274.5.l694.
- Schwingshackl, A. (2016). The role of stretch-activated ion channels in acute respiratory distress syndrome: finally a new target? *J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311, 639–652. doi: 10.1152/ajplung.00458.2015.-Mechanical.
- Schwingshackl, A., Lopez, B., Teng, B., Luellen, C., Lesage, F., Belperio, J., et al. (2017). Hyperoxia treatment of TREK-1/TREK-2/TRAAK-deficient mice is associated with a reduction in surfactant proteins. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L1030–L1046. doi: 10.1152/ajplung.00121.2017.
- Simonsen, U., Wandall-Frostholm, C., Oliván-Viguera, A., and Köhler, R. (2017). Emerging roles of

- calcium-activated K channels and TRPV4 channels in lung oedema and pulmonary circulatory collapse. *Acta Physiol.* 219, 176–187. doi: 10.1111/apha.12768.
- Smedira, N., Gates, L., Hastings, R., Jayr, C., Sakuma, T., Pittet, J. F., et al. (1991). Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits. *J. Appl. Physiol.* 70, 1827–1835. doi: 10.1152/jappl.1991.70.4.1827.
- Song, P., Groos, S., Riederer, B., Feng, Z., Krabbenhöft, A., Smolka, A., et al. (2009). KCNQ1 is the luminal K⁺ recycling channel during stimulation of gastric acid secretion. *J. Physiol.* 587, 3955–3965. doi: 10.1113/jphysiol.2009.173302.
- Song, Y., Fukuda, N., Bai, C., Ma, T., Matthay, M. A., and Verkman, A. S. (2000). Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: Studies in transgenic aquaporin null mice. *J. Physiol.* 525, 771–779. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00771.x.
- Stern, M., Ulrich, K., Robinson, C., Copeland, J., Griesenbach, U., Masse, C., et al. (2000). Pretreatment with cationic lipid-mediated transfer of the Na⁺-K⁺/ATPase pump in a mouse model in vivo augments resolution of high permeability pulmonary oedema. *Gene Ther.* 7, 960–966. doi: 10.1038/sj.gt.3301193.
- Tosaka, T., Casimiro, M. C., Rong, Q., Tella, S., Oh, M., Katchman, A. N., et al. (2003). Nicotine induces a long QT phenotype in Kcnq1-deficient mouse hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 980–987. doi: 10.1124/jpet.103.053017.
- Trinh, N. T. N., Privé, A., Kheir, L., Bourret, J.-C., Hijazi, T., Amraei, M. G., et al. (2007). Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L870–L882. doi: 10.1152/ajplung.00362.2006.
- Trinh, N. T. N., Privé, A., Maillé, E., Noël, J., and Brochiero, E. (2008). EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L866–L880. doi: 10.1152/ajplung.90224.2008.
- Wang, H., Iguchi, N., Rong, Q., Zhou, M., Ogunkorode, M., Inoue, M., et al. (2009). Expression of the Voltage-Gated potassium channel KCNQ1 in mammalian taste bud cells and the effect of its null-mutation on taste preferences. *J. Comp. Neurol.* 23, 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.

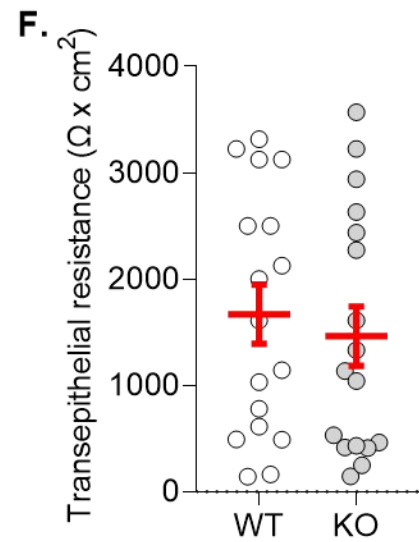
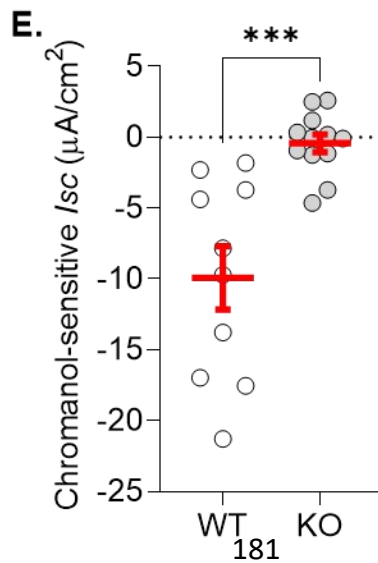
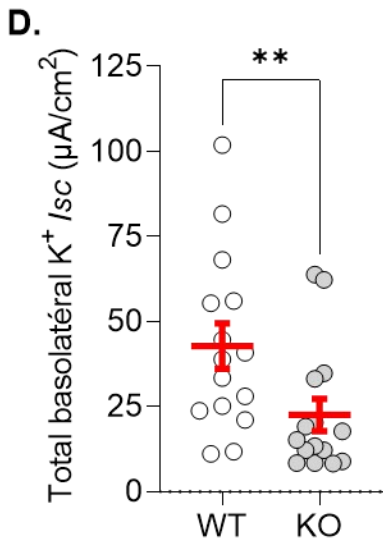
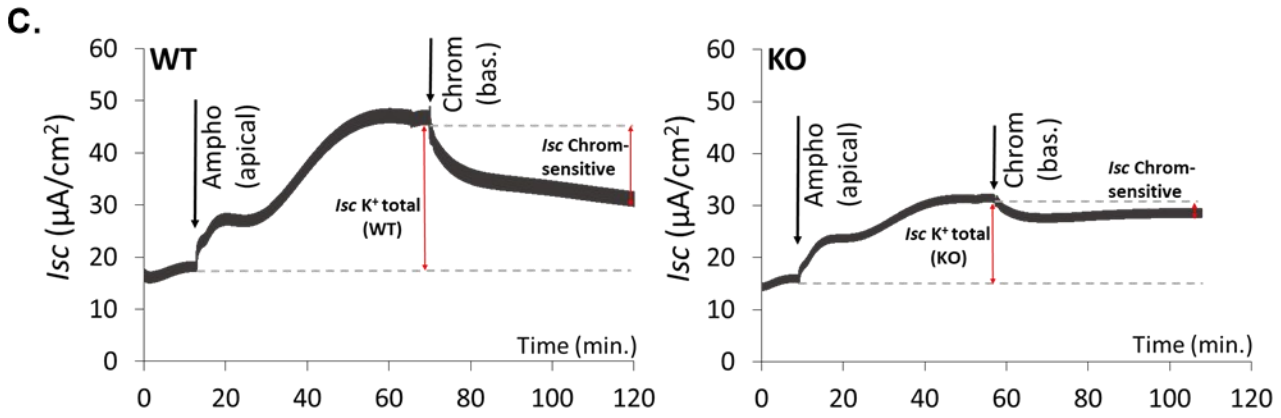
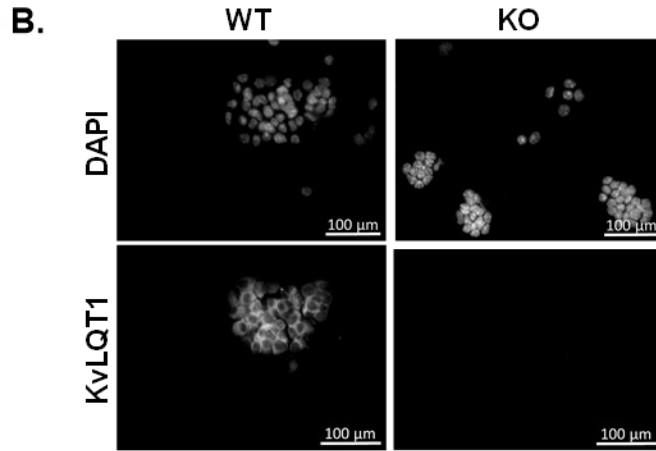
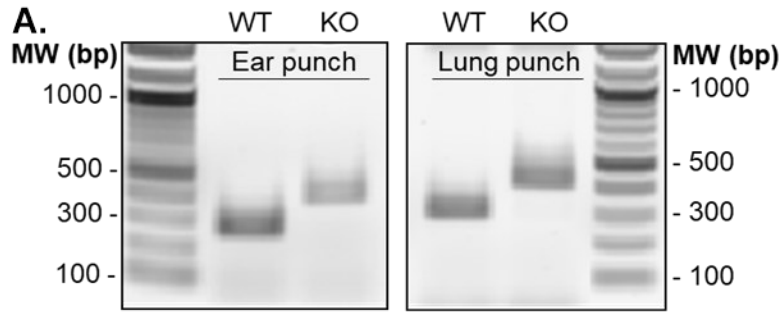


Figure 1: Validation of KvLQT1 extinction in mouse lungs. **A.** Detection of the 240- and 370-pb products, specific to the WT and mutant alleles, amplified by PCR from genomic DNA of ear punches and lung tissues from WT and KO mice. Representative immunofluorescence images of KvLQT1 channel protein staining performed on freshly isolated mouse airway epithelial cells (**B**, n=4, Magnification: 200x Scale: 100 μ m). **C.** Representative short-circuit current traces, measured in Ussing chamber, of primary cultures of airway epithelial cells, isolated from WT (left panel) and KO mice (right panel). After current stabilization, 7.5 μ M amphotericin B was added and an apical-to-basolateral K⁺ gradient was established, before addition of 20 μ M chromanol (at the basolateral side). Total basolateral (**D**) and chromanol-sensitive (**E**) K⁺ currents (I_{sc} μ A/cm²) as well as transepithelial resistance (Ω xcm²) of WT and KvLQT1-KO cell cultures (n=10-15). Values are means \pm SEM. Non-parametric Mann-Whitney t-test (Agostino/Pearson normality test: negative, panels **D** and **E**) and unpaired t-test (Agostino/Pearson normality test: positive, panel **E**). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs WT mice.

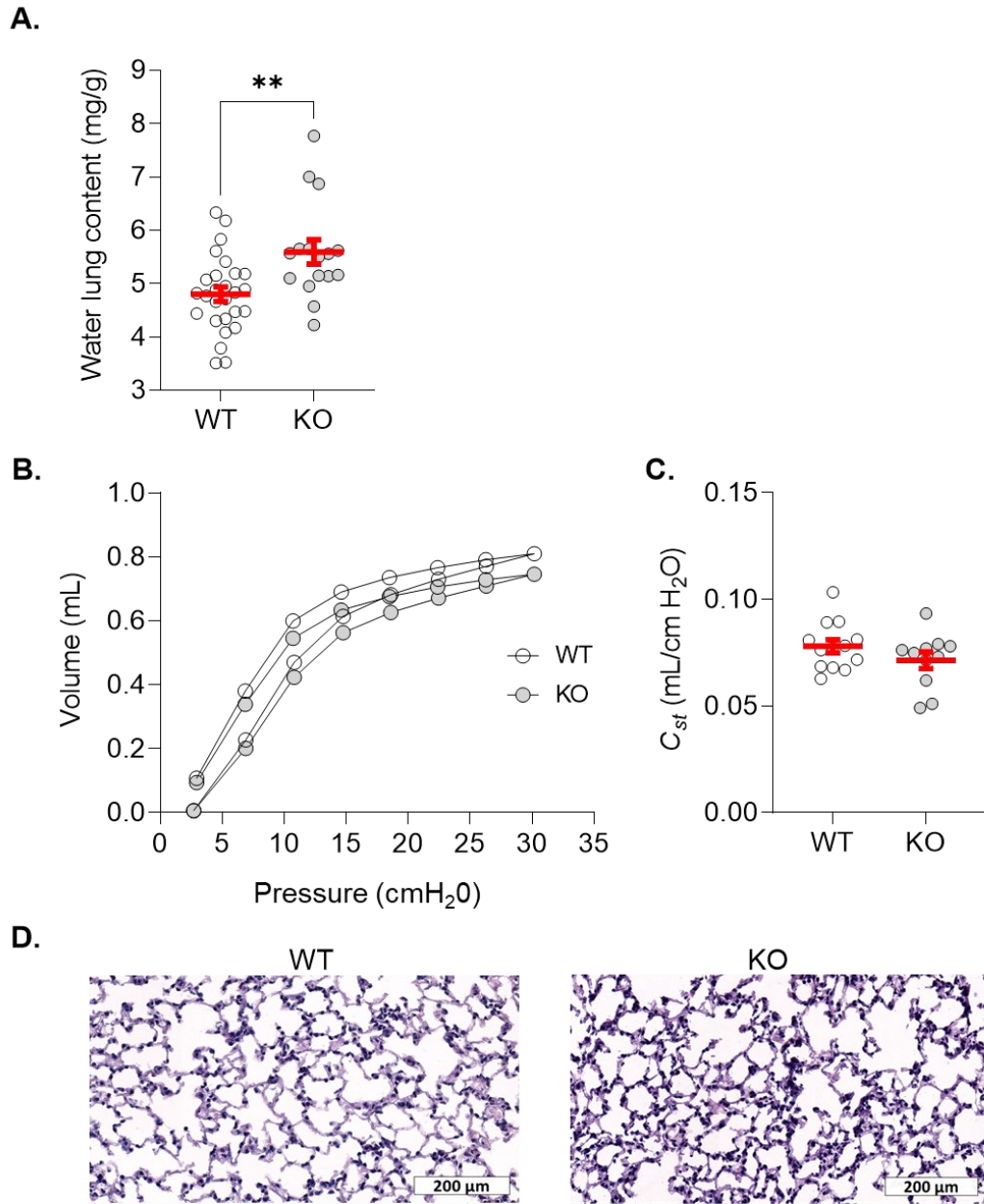
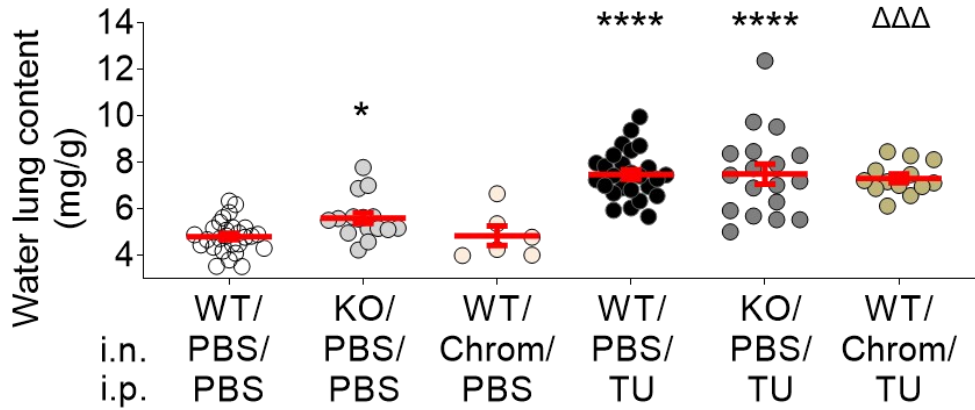
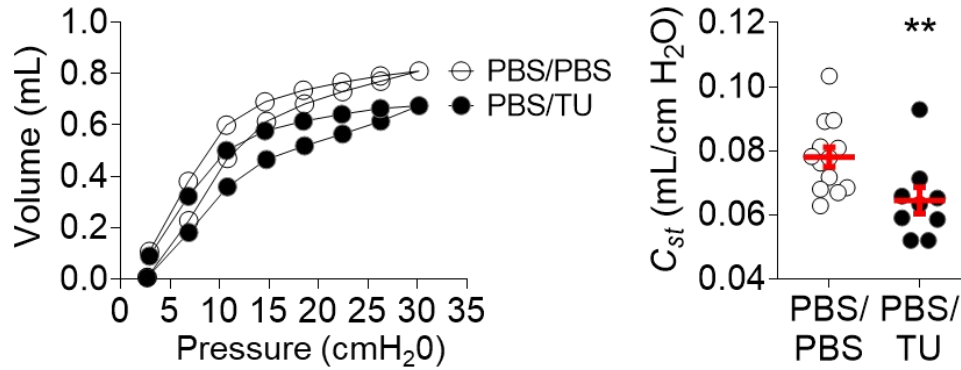


Figure 2: Lung phenotype assessment of the KvLQT1-KO mouse model. **A.** Water lung content (mg/g) from control (non-treated) WT and KO mice (n=16-27). Mean pressure-volume loops, **B)** and C_{st} (quasi-static compliance at 5 cmH₂O, **C)** were measured with flexiVent among control (non-treated) WT and KO mice (n=11-13). Representative images of histological sections from WT and KO mouse lungs stained with hematoxylin-eosin (**D**, Scale: 200 μm). Values are presented as means ± SEM. Unpaired t-test (Agostino/Pearson normality test: positive) was practiced for panel **A**. ***p* < 0.01 vs WT mice.

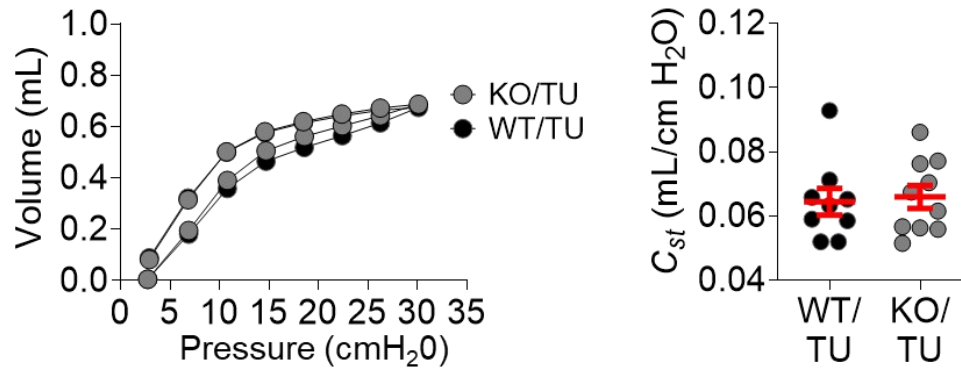
A. WT and KO



B. WT



C. WT and KO



D. WT and KO

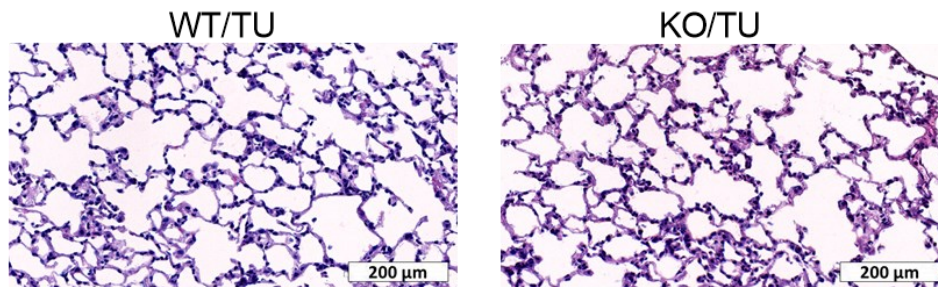


Figure 3: Impact of KvLQT1 extinction and pharmacological inhibition on thiourea-induced acute lung edema and function in mice. **A.** WT mice were pretreated with PBS (i.n.) or with the KvLQT1 inhibitor chromanol (Chrom, 20 μ M, i.n.) one hour before i.p. injection (150 μ L) of PBS (control condition) or thiourea (TU, 5 mg/kg). KO mice also received PBS (i.n) prior to PBS or thiourea injection. Four hours later, lungs were collected for measurement of the water lung content within the 6 experimental groups in WT mice (i.n/i.p): PBS/PBS, Chrom/PBS, PBS/TU, and Chrom/TU and KO mice: PBS/PBS and PBS/TU, n= 6-27. Mean pressure-volume loops and *Cst* were also measured in separate WT control (PBS/PBS) and thiourea-treated (PBS/TU) mice (**B**, n=9-13) with the flexiVent system as well as in WT and KO thiourea-treated mice (**C**, WT/TU vs KO/TU, n=9-10). Representative images of histological sections from WT and KO thiourea-treated mouse lungs stained with hematoxylin-eosin (**D**, Scale: 200 μ m). Values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test were practiced (normality Agostino/Pearson test: positive) and One-way ANOVA non-parametric comparison test (normality Agostino/Pearson test: negative) were applied to panel **A**. Non-parametric Mann-Whitney t-test (Agostino/Pearson normality test: negative) was practiced for panel **B**. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs PBS/PBS, $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ vs Chrom/PBS.

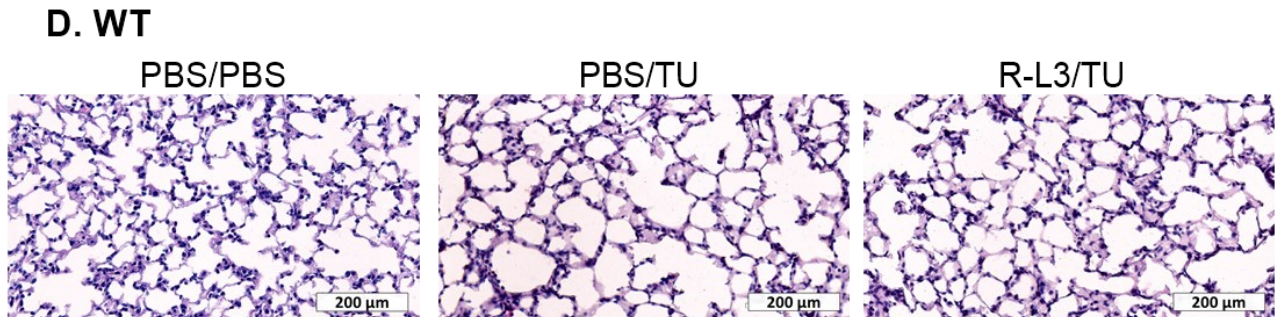
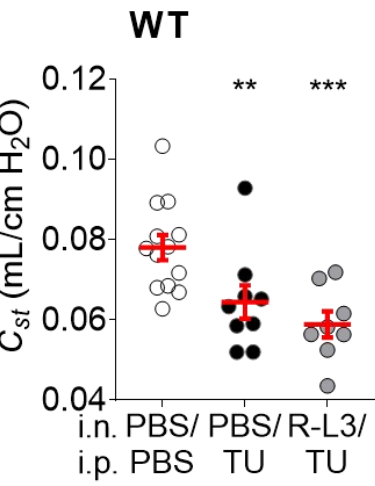
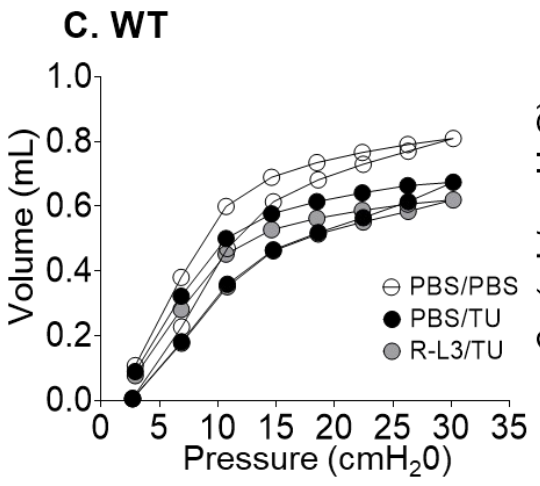
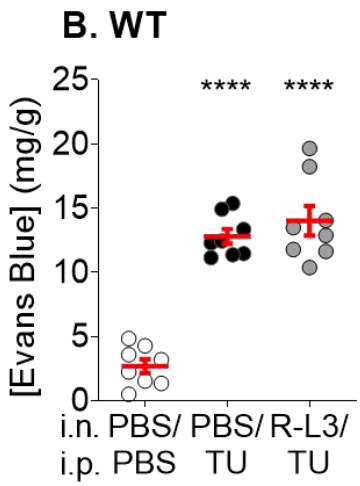
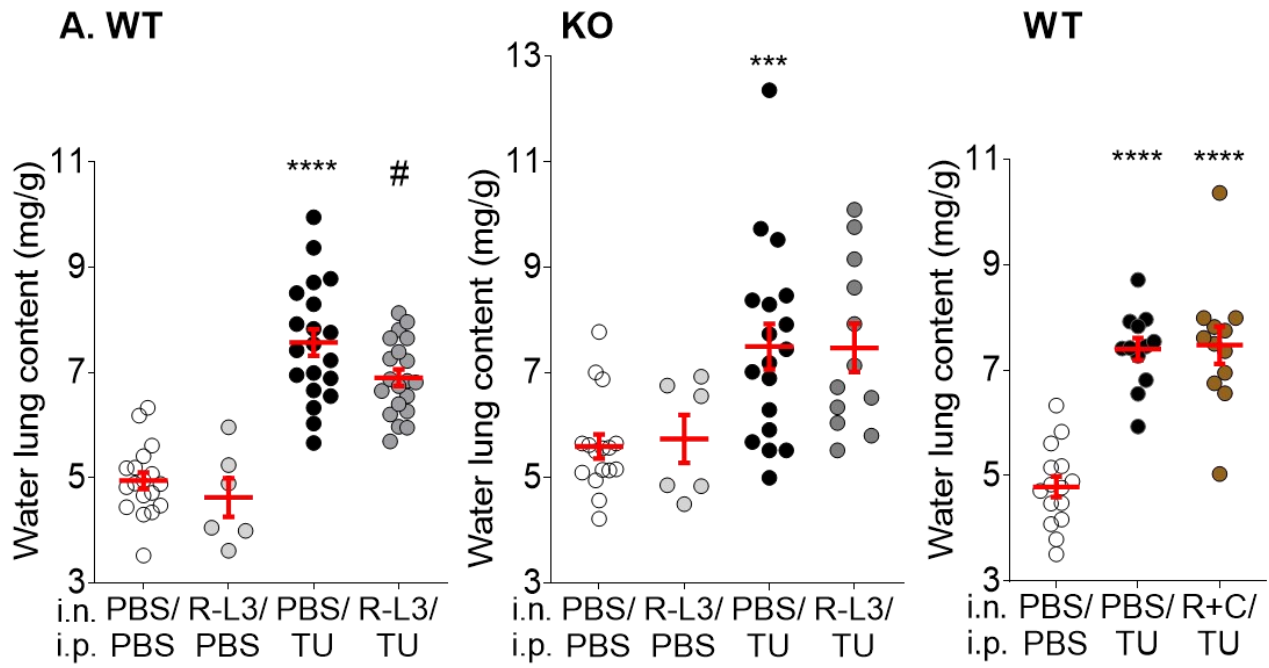


Figure 4: Beneficial impact of KvLQT1 activation on thiourea-induced acute lung edema in WT mice. **A.** After treatment with the pharmacological KvLQT1 activator R-L3 (4 μ M, i.n.) or PBS (i.n.), a group of WT (left panel, n= 6-20) or KO (middle panel, n=6-18) mice were challenged with thiourea (TU, 5 mg/kg, i.p.) or PBS (i.p.). Four hours after, lungs were collected for measurement of the water lung content within the 4 experimental groups (i.n/i.p: PBS/PBS, R-L3/PBS, PBS/TU, and R-L3/TU). Also, WT mice were treated with a combination of R-L3+chromanol (R+C, 4 μ M and 20 μ M respectively, i.n) or PBS before the challenge with thiourea (TU, 5 mg/kg, i.p.) or PBS (i.p.) and the water lung content was compared among the 3 experimental groups (i.n/i.p: PBS/PBS, PBS/TU, and R+C/TU, n=12-15) (right panel). Endothelial permeability (**B**, n=8), assessed by Evans blue (20mg/kg, 100 μ L, i.v.) extravasation from the circulation to the lungs, was measured in the control condition (i.n./i.p.: PBS/PBS) and after the thiourea challenge (i.p.: TU, 5 mg/kg) in WT mice treated with the KvLQT1 activator R-L3 (i.n/i.p.: R-L3/TU) or not (PBS/TU). Mean pressure-volume loops (**C**, middle panel) and *Cst* (**C**, right panel) (n=8-13) in WT control animals (PBS/PBS) and mice treated with R-L3 (i.n/i.p.: R-L3/TU) or not (PBS/TU) were measured with the flexiVent system. Representative images of histological sections from WT thiourea mouse lungs treated or not with the KvLQT1 activator stained with hematoxylin-eosin (**D**, Scale: 200 μ m). Values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test were practiced (normality Agostino/Pearson test: positive) for panels **A**, **B** and **C**. ** p < 0.01 *** p < 0.001 **** p < 0.0001 vs PBS/PBS and # p < 0.05 vs PBS/TU.

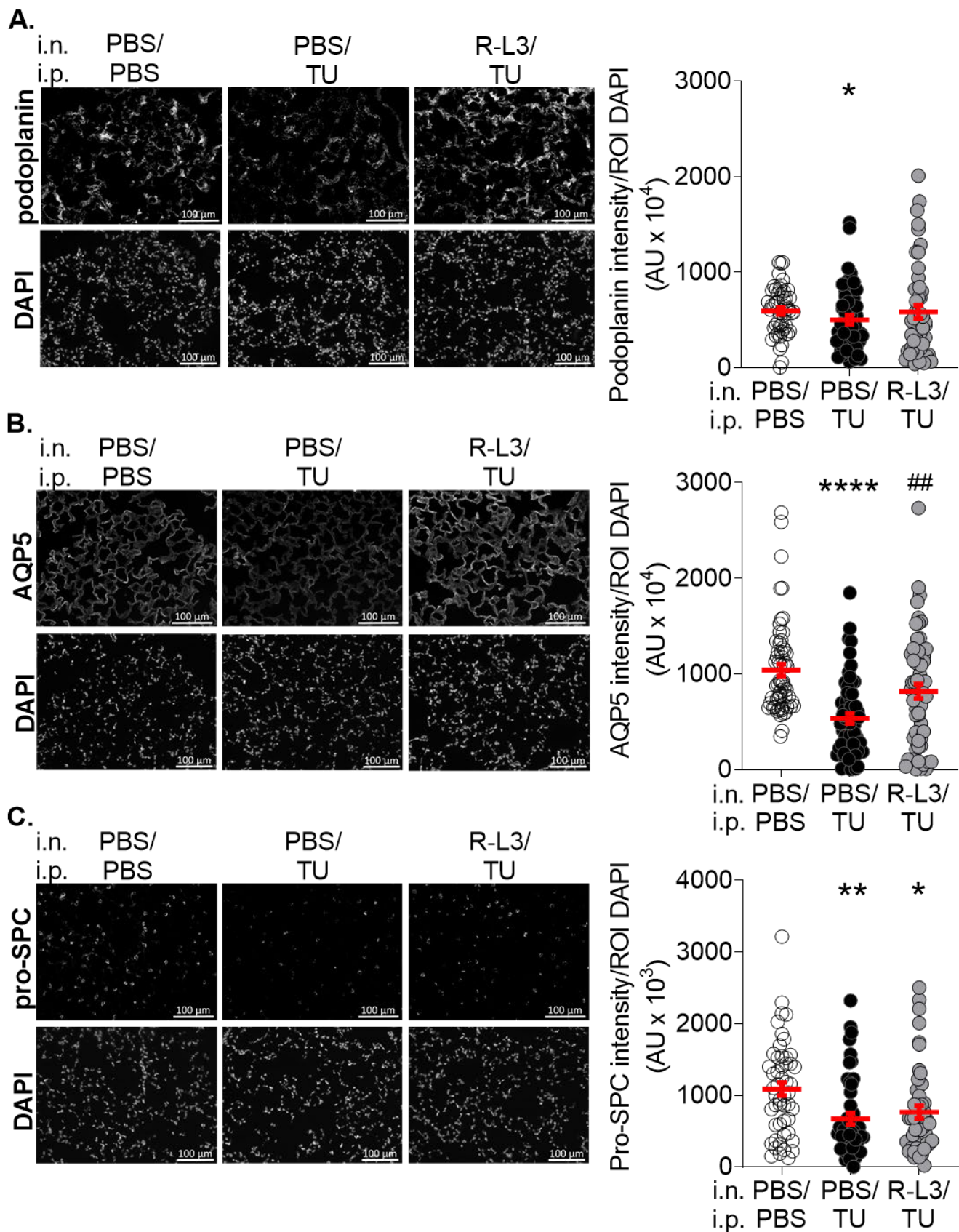


Figure 5: Impact of KvLQT1 activation on alveolar type I (AT1) and II (ATII) epithelial cell markers in thiourea-challenged WT mice. Representative immunofluorescence images (left panels) of lung sections (5 μm , Scale: 100 μm) from WT control mice (PBS/PBS), challenged with thiourea (TU, 5 mg/kg i.p., PBS/TU) and treated or not (PBS) with the KvLQT1 activator R-L3 (R-L3/TU) stained with the AT1 markers podoplanin (**A**, n=50 images), AQP5 (**B**, n=59-60) or ATII marker pro-SPC (**C**, n=48-51). Nuclei were stained by DAPI. Quantification (right panels) of podoplanin, AQP5, and pro-SPC marker intensities was made with a protocol exploited by ICY software. Values are presented as means \pm SEM. Non-parametric Mann-Whitney t-test (Agostino/Pearson normality test: negative) for panel **A**. One-way ANOVA non-parametric comparison test (normality Agostino/Pearson test: negative) for panel **B** and **C**. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or **** $p < 0.0001$ vs PBS/PBS, ## $p < 0.01$ vs PBS/TU.

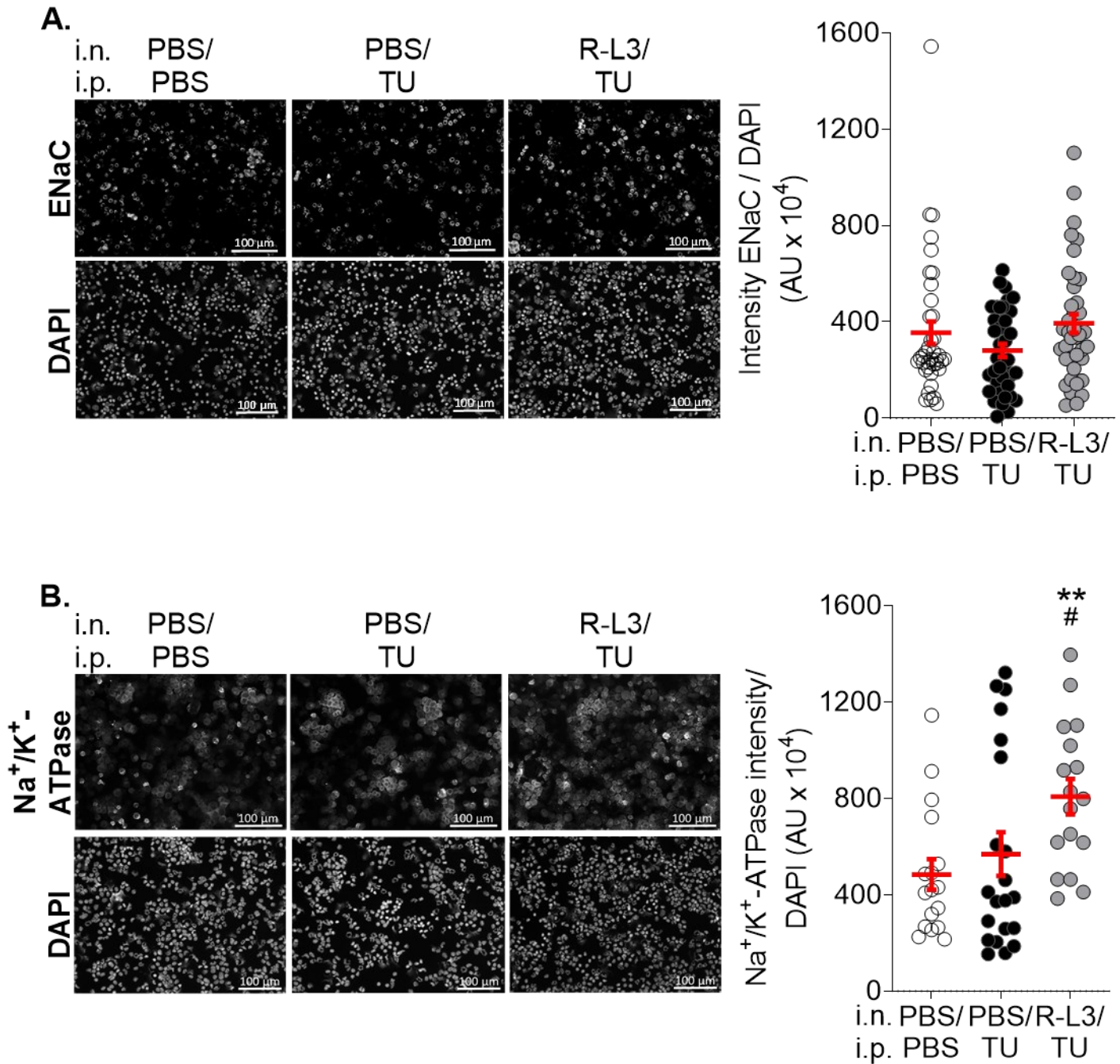


Figure 6: Impact of KvLQT1 activation on α -ENaC and Na⁺/K⁺-ATPase protein expression in alveolar epithelial cells after thiourea-induced lung edema in WT mice. Representative immunofluorescence images (left panels, Scale: 100 μ m) of the α -ENaC subunit (A, n=3 experiments, including a pool of 14 mice each) and Na⁺/K⁺-ATPase (B, n=3 experiments, including a pool of 14 mice) staining performed on ATII cells freshly isolated from lungs from WT control

mice (i.n/i.p.: PBS/PBS) and WT mice challenged with thiourea (i.p.: TU, 5 mg/kg) and treated or not (PBS) with the KvLQT1 activator (i.n/i.p.: R-L3/TU and PBS/TU, respectively). Nuclei were stained by DAPI. Quantification (right panels) of marker intensity was made with a protocol exploited by ICY software. Values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA non-parametric comparison test (normality Agostino/Pearson test: negative) for panel **A**. One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test were practiced (normality Agostino/Pearson test: positive) for panel **B**. **** $p < 0.01$, vs PBS/PBS and # $p < 0.05$ vs PBS/TU for Na⁺/K⁺-ATPase.**

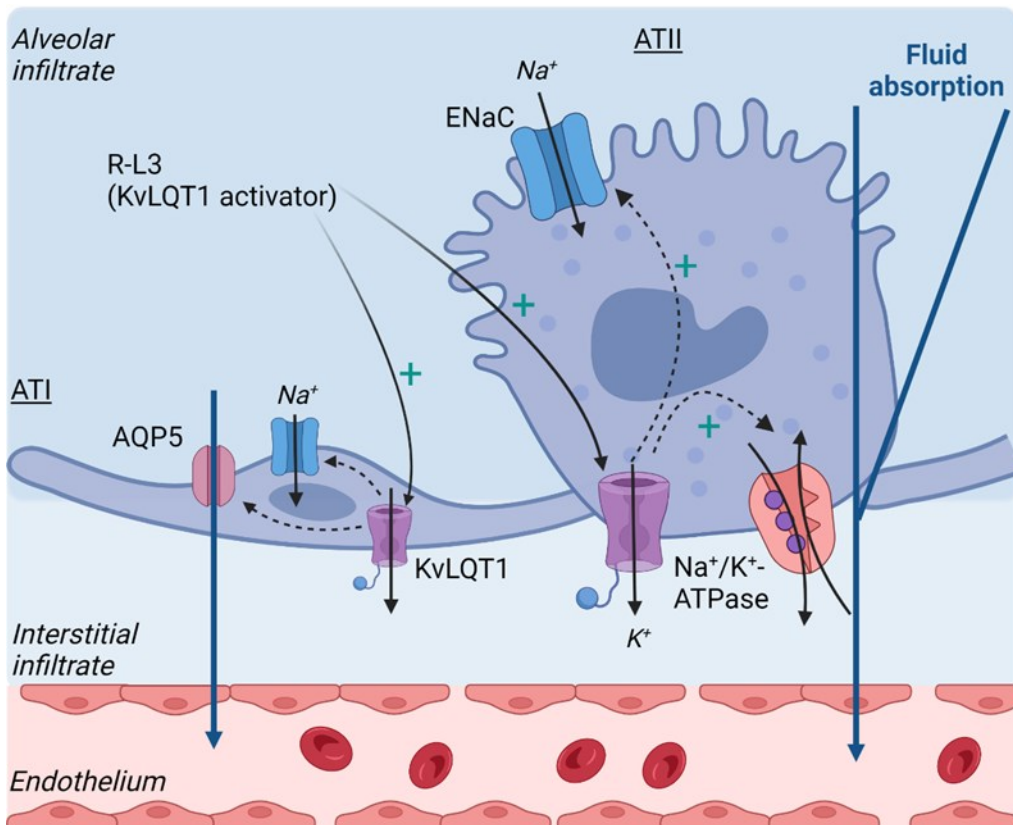


Figure 7: Schematic model describing the beneficial effect of KvLQT1 activation, by R-L3, on lung edema resorption after thiourea challenge, through the observed up-regulation of ion/water channels/transporter involved in sodium and fluid absorption by the alveolar epithelium.
Created by Biorender.com

Chapitre 6 : Rôle du canal KvLQT1 sur les paramètres de la phase aigue exsudative du syndrome de détresse respiratoire aigue induits par la bléomycine *in vivo*

6.1 Statut de l'article #4

Titre: **Role of the potassium channel KvLQT1 on the outcomes of the acute exudative phase of acute lung injury induced by bleomycin *in vivo*.**

Auteurs: Aubin Vega Mélissa, Girault Alban, Adam Damien, Meunier Émilie, Chebli Jasmine, Privé Anik, Robichaud Annette, Brochiero Emmanuelle

Statut: En préparation de publication

Contribution: J'ai participé à la grande majorité des expérimentations *in vivo* et je me suis chargée de l'extraction et la collecte des données, leur analyse et l'interprétation et la production des figures.

6.2 Mise en contexte

La précédente étude (158) a permis de valider le phénotype pulmonaire de nos souris KvLQT1-KO en condition physiologique et en présence d'un œdème pulmonaire seulement. L'étape suivante était d'approfondir notre compréhension de l'implication du canal KvLQT1 grâce à un modèle mimant les principaux paramètres de la phase aiguë du SDRA.

D'après les données de la littérature, la modulation des canaux K⁺ pourrait influencer la gravité des paramètres attribués au SDRA. Le premier exemple (284) concerne la déficience de TREK-1, (un canal K⁺ de la famille des K₂P), qui n'induit aucune altération phénotypique pulmonaire en condition basale chez les souris. Cependant, lorsqu'elles sont soumises à une hyperoxie, suivie d'une période de ventilation mécanique délétère (modèle de double insulte), une aggravation de la compliance pulmonaire, de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de l'apoptose est constatée.

Un deuxième exemple (285) a permis de démontrer que la délétion *in vivo* de *Kcne2* (la sous-unité β entrant dans la composition du canal KvLQT1) induit une altération des réponses biologiques basales notamment sur les gaz sanguins, les médiateurs inflammatoires sécrétés, l'apoptose et la phosphorylation de multiples voies de signalisation. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion pulmonaire (modèle d'atteinte directe), l'ablation de *Kcne2* a notamment aggravé la formation d'œdème et l'atteinte histologique pulmonaire.

Basé sur ces évidences, nous avons émis l'hypothèse que l'ablation génétique de KCNQ1 (sous-unité α du canal KvLQT1) dans les souris (KvLQT1-KO) pourrait aggraver la réponse suite aux lésions pulmonaires induites par la bléomycine. Nous avons débuté par améliorer notre modèle expérimental *in vivo* de SDRA, induit par la bléomycine. Premièrement, nous avons ajusté la dose de bléomycine administrée dans le but de réduire le taux de mortalité. Deuxièmement, nous avons changé la voie d'administration, vers une instillation intranasale plutôt qu'intra-trachéale, afin de faciliter la récupération post-manipulation des animaux. Ainsi, nous avons pu étudier l'atteinte pulmonaire des souris déficientes pour KvLQT1, comparé aux souris sauvages, grâce à des mesures sur la fonction respiratoire, l'état de la barrière alvéolo-capillaire, la sévérité des dommages alvéolaires et la réponse inflammatoire.

6.3 Matériel et méthodes

Animaux et déclaration éthique

Les souris avec une extinction ciblée du gène *kcnq1* (knock-out (KO) constitutif) codant pour la protéine KCNQ1 (sous-unité α du canal potassique KvLQT1) ont été originellement générées dans le laboratoire du Dr. Pfeifer (Laboratory of Mammalian Genes and Development, NICHD/National Institutes of Health, Bethesda, USA), par l'insertion d'une cassette néomycine au niveau de l'exon 2, tel que précédemment décrit (168). Des couples reproducteurs (arborant un fond génétique de souris C57BL/6J) nous ont généreusement été fournis par le Dr. Pfeifer. La colonie d'élevage a alors été maintenue par reproduction de souris hétérozygotes (mâle *kcnq1*^{+/-} x femelle *kcnq1*^{+/-}) à l'animalerie du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Un rétrocroisement a été effectué avec des souris sauvages (WT, C57BL/6J, acquises chez Jackson Laboratory) toutes les 10 générations. Les souris ont été maintenues dans un

environnement contrôlé avec accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture (2018 Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo, USA). Les oreilles des souriceaux ont été poinçonnées lors du sevrage et le tissu digéré pour le génotypage par PCR grâce aux amorces (G-KOF (5'-CCA GGA GTG GGT GGT TCT AC - 3'), G-KONF (5'-CGC TTC CTC GTG CTT TAC G-3') et G-KOR (5'-GCC AGC ACT AAA GAT CTT GC-3') (Integrated DNA Technologies, US) amplifiant des produits de 240- et 370-bp, chez les souris WT et les KO, respectivement. Toutes les procédures impliquant l'utilisation d'animaux ont été préalablement approuvées par le Comité Institutionnel de la Protection des Animaux (CIPA) au CRCHUM, en accord avec les recommandations du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux (CACC).

Conditions expérimentales *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* ont été pratiquées sur des souris de 6 à 10 semaines d'âge, réparties de façon randomisée dans chacun de nos groupes expérimentaux décrits ci-dessous (répartition équilibrée selon le sexe et le poids). Les souris WT et KvLQT1-KO ont d'abord été comparées en condition physiologique. Ces souris ont reçu une instillation intranasale (i.n.) de PBS (50 µl, 1/1000 DMSO (véhicule(veh)) aux deux jours, en respect du protocole expérimental de l'étude #5 (traitement pharmacologique dilué dans veh+PBS) et dans le but de réduire l'utilisation d'animaux, soit l'un des principes des trois Rs de la pratique expérimentale chez les animaux, tel que recommandé par le CIPA. Par la suite, l'impact des dommages pulmonaires induits par la bléomycine a été étudié chez les souris WT et KvLQT1-KO. La bléomycine (Bleo, 3U/kg, Fresenius Kabi, Canada) a été instillée par voie intranasale (i.n., 50 µl) et le groupe contrôle a reçu la même quantité (i.n., 50 µl) de PBS au jour 0.

Les groupes expérimentaux sont alors identifiés comme suit (génotype-i.n.) : WT/PBS, WT/Bleo, KO/PBS et KO/Bleo tel qu'indiqués dans les légendes des figures.

À jour 7, les souris ont été anesthésiées pour la mesure des paramètres systémiques ou l'évaluation de la fonction pulmonaire ou bien euthanasiées par surdose de barbiturique (pentobarbital, injection intrapéritonéale, i.p.) avant la collecte des poumons. Ces échantillons ont alors été utilisés pour la mesure du contenu liquidien pulmonaire, les analyses histologiques, la pratique d'immunomarquages ou l'isolation des cellules primaires alvéolaires (voir ci-dessous).

Évaluation des paramètres systémiques (EPOC)

Au jour 7, chaque souris a été anesthésiée avec un mélange d'isoflurane (3% mélangé à 21% d'oxygène dans le but de reproduire les conditions environnementales de base). Par la suite, nous avons procédé à l'ouverture de l'abdomen dans le but d'accéder à la veine cave inférieure. Un échantillon de sang veineux a ensuite été récupéré avec une seringue de 1 mL préalablement conditionnée avec de l'héparine (Fresenius Kabi). Le sang collecté fut alors introduit dans le système d'analyse sanguin EPOC® (Siemens Healthineers Canada). Cet appareil permet de mesurer les gaz sanguins (pH, pCO₂, pO₂), les électrolytes (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻) et les métabolites (glucose, lactate et urée). Finalement, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les poumons ont été collectés pour en faire l'analyse histologique.

Mesure de la fonction pulmonaire *in vivo* (FlexiVent)

Les propriétés mécaniques du système respiratoire ont été analysées chez les souris WT et KvLQT1-KO vivantes, ayant reçu, ou non, une instillation de bléomycine (i.n., 50ul, 3U/kg), grâce au système flexiVent FX (SCIREQ, Montréal, QC, Canada). La méthode d'exécution et les paramètres ventilatoires pour chacun des types de mesures effectuées ont préalablement été détaillés (158).

Index d'œdème pulmonaire

Suivant l'euthanasie des souris à jour 7, la vena cava inférieure a été sectionnée, les poumons ont été retirés et pesés directement (poids mouillé). Les poumons ont ensuite été chauffés à 95 °C pendant 24 h pour finalement mesurer le poids sec (158). Nous avons alors calculé le contenu liquidien pulmonaire, en tant qu'index de l'œdème pulmonaire, en utilisant la formule ci-dessous (286) :

$$\text{WLC (mg/g)} = (\text{poids mouillé} - \text{poids sec}) / \text{poids souris}$$

Essai de l'extravasation du bleu d'Evans

L'essai d'extravasation du Bleu Evans est une technique communément utilisée qui permet d'évaluer la perméabilité pulmonaire consécutive aux dommages endothéliaux. Cette mesure a été faite chez des souris (WT et KvLQT1-KO) en condition contrôle (PBS) ou sept jours suivants

l'insulte initiale induite par l'instillation de bléomycine (Bléo, 50ul, i.n., 3U/kg). Une solution de bleu d'Evans (50 mg/kg, Sigma) a été injectée par voie intraveineuse via la veine de la queue et après trois heures de circulation sanguine, les souris furent euthanasiées et les poumons perfusés avec du PBS-EDTA (5mM, 1 mL) via l'artère pulmonaire. Une fois les poumons prélevés, ceux-ci ont été nettoyés dans des bains successifs de PBS pour retirer l'excédent de sang. Les poumons ont été émincés avec des ciseaux et incubés avec de la formamide (Sigma) pendant 18 h à 37 °C. Par la suite, l'homogénat a été centrifugé et la luminescence du surnageant mesurée à 620 et 740 nm afin de déterminer la concentration de bleu d'Evans, selon une courbe standard. Une correction a été appliquée pour la possible contamination aux pigments d'hème grâce à la formule suivante :

$$E620 \text{ (EBD corrigé)} = E620 - (1.426 \times E740 + 0.030)$$

Analyse du fluide de lavage broncho-alvéolaire (BAL)

Une série d'animaux (WT et KvLQT1-KO) a été utilisée pour l'analyse du contenu du BAL, 7 jours suivant l'insulte initiale (bléo) ou en condition contrôle (PBS). Après l'euthanasie, 1 mL de PBS a été injecté et délicatement aspiré par voie intratrachéale (i.t.). Le processus a été répété trois fois et les fractions regroupées. Le BAL a ensuite été centrifugé à 700 g pendant 8 minutes à 4 °C. Le surnageant a été récupéré, homogénéisé et utilisé pour la mesure du contenu protéique ou entreposé à -80 °C. La concentration en protéines dans le BAL a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON, Canada).

En parallèle, le culot cellulaire a été resuspendu dans du PBS (400 µl) afin de procéder au comptage des cellules immunitaires totales à l'hémacymètre. Ensuite, cette suspension a été diluée pour atteindre une densité d'environ 80 000 cellules (par 200 µl/lame) avant la cyto centrifugation (850 rpm, 6 min, Thermo Scientific Cytospin 4 Cyto centrifuge, Block Scientific, NY, USA) sur lames de verre. Les lames ont été marquées avec Hema 3™ Stat Pack (Fisher Healthcare, USA) afin de pratiquer le comptage différentiel des cellules immunitaires. Les résultats sont rapportés en pourcentage de neutrophiles et de macrophages sur 400 leucocytes totaux dénombrés par lames.

Analyse histologique

Dans le but de maintenir les espaces alvéolaires ouverts, une solution de fixation de paraformaldéhyde 4% (500 µL, Electron microscopy sciences, USA) a été délicatement introduite par voie i.t. avant la collecte des poumons. Ces tissus ont ensuite été incubés dans des bains successifs de gradient de sucrose (5%, 10% et 20%, dilué dans une solution de paraformaldéhyde 0,4%, 24 h par bain), soit une méthode permettant de préserver l'intégrité structurale des tissus, et ont finalement été inclus dans la résine (Shandon Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific). Ces inclusions ont été coupées au cryostat (Leica Microsystems, modèle CM1950110111) puis les cryosections (5 µm) ont été marquées avec l'hématoxyline-éosine (Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit, ThermoScientific, USA), scannées grâce au Versa stand, avec objectif de 20x, sur microscope à lumière blanche Leica® avant l'analyse histologique.

Une équipe de pathologiste (Dr Feryel Azzi et Dr Guillaume St-Jean de la plateforme de pathologie moléculaire du CRCHUM) ont produit une analyse à l'aveugle des lames histologiques des poumons de souris WT et KvLQT1-KO, instillées ou non (PBS) avec la bléomycine (Bléo, 50ul, i.n., 3U/kg). Le pourcentage total de zones lésées et l'atteinte inflammatoire ont été rapportés. Pour ce dernier critère, un score approfondi (de 0 (absence) à 3 (très sévère)) de sévérité a été déterminé sur ces lames.

Nous avons également complété l'analyse grâce à un protocole automatisé par le logiciel Visiomorph™ (Visiopharm) qui nous a permis d'obtenir la surface du septa, incluant les zones lésées et non lésées, sur la surface totale de notre coupe de tissus. Cette évaluation prend en compte l'épaississement du septa, la présence de foyers fibrotiques et l'infiltration de cellules immunitaires. Ainsi, plus les coupes histologiques présentent de ces lésions, plus le ratio se rapproche de 1.

Immunomarquage de pro-SPC et AQP5 sur des sections de tissus pulmonaires inclus dans la résine

Les sections pulmonaires (5 µm) ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 0,4%, les membranes ont été perméabilisées par 0,1% de Triton X-100 (étape spécifique au marquage de pro-SPC) et bloquées pendant 1 h avec une solution de PBS + 10% FBS (Saradigm, USA) + 10% BSA (Sigma-

Aldrich). Ensuite, les lames ont été incubées à 4 °C, toute la nuit, avec des anticorps de lapin polyclonaux anti-pro-SPC (1:100, #AB3786 Millipore, USA) ou anti-AQP5 (1:100, AQP005, Alomone Labs, Israël). Le jour suivant, les sections ont été incubées à nouveau avec la solution de blocage puis avec un anticorps secondaire d'âne dirigé vers le lapin Alexa Fluor™ 568 (1:200, Life Technologies, USA) pendant 1 h. Le marquage des noyaux cellulaires au DAPI (1:1000, Sigma) fut effectué avant le montage avec le Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Les photos ont été prises avec la caméra Exiqua (QImaging, Canada) sous un microscope inversé à fluorescence (Olympus, Canada) à 200x (NA =0.75) et analysées avec le logiciel ICY. Notre protocole d'analyse préalablement détaillé (156) permet la mesure d'intensité (en pixels), de chaque région spécifique au signal (ROI) et normalisée par le nombre de cellules positives au DAPI (plus de 20 000 cellules par marquage). Ce protocole permet d'ajuster les paramètres de afin de réduire tout signal de bruit de fond.

Isolation des cellules alvéolaires de souris (ATII) et culture primaire

Les ATII ont été isolées à partir de poumons de souris WT et KO en condition contrôle. Environ 2 à 6 poumons de souris par condition ont été combinés pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Après la collecte des poumons, ceux-ci ont été rincés avec une solution physiologique pour retirer l'excédent de cellules sanguines et de macrophages alvéolaires. Les poumons ont ensuite été digérés avec une solution d'élastase (30U/souris, Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. USA, 30-45 minutes), émancés aux ciseaux et la suspension cellulaire a été filtrée. La suspension a été enrichie en cellules alvéolaires (jusqu'à 86%) par une technique d'adhésion différentielle (287) qui permet d'éliminer les macrophages (77). Après centrifugation, le culot cellulaire a été resuspendu dans un milieu DMEM (Gibco, USA) supplémenté avec 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Ontario, Canada) et 50U/mL pénicilline-streptomycine (ThermoScientific) + 10% FBS (Saradigm, US) etensemencé sur des plaques de culture cellulaire (48 puits, Costar, Corning Incorporated, USA). La culture primaire a duré 4 jours (avec remplacement du milieu à jour 2), jusqu'à confluence adéquate pour la pratique de plaies mécaniques (voir ci-dessous).

Pratique de lésions épithéliales par plaies mécaniques et mesure des vitesses de réparation

Des plaies mécaniques ont été pratiquées sur une culture primaire confluyente de cellules ATII de souris. Brièvement, la monocouche de cellules alvéolaires a été lésée avec un embout de pipette (10 μ L), à raison de deux plaies par puits. Une marque préalablement dessinée sous la plaque a permis de photographier les plaies au même endroit (à temps 0 et temps 6 h). À temps 0, le milieu est changé avec du DMEM + 10% FBS afin de retirer toutes cellules ayant décroché suite à la lésion. La vitesse de réparation des plaies a été déterminée par la différence entre l'aire de la plaie initiale moins l'aire de la plaie après 6 h de réparation, analysée avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Analyse statistique

Les données sont représentées en graphique de style nuage de points avec une moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les graphiques et les analyses statistiques ont été produits avec le logiciel GraphPad Prism version 8 pour Windows ((GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Tout d'abord, la normalité des données a été analysée (Agostino-Pearson) avant de réaliser le test statistique approprié, tel que décrit pour chaque légende de figure. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$.

6.4 Résultats

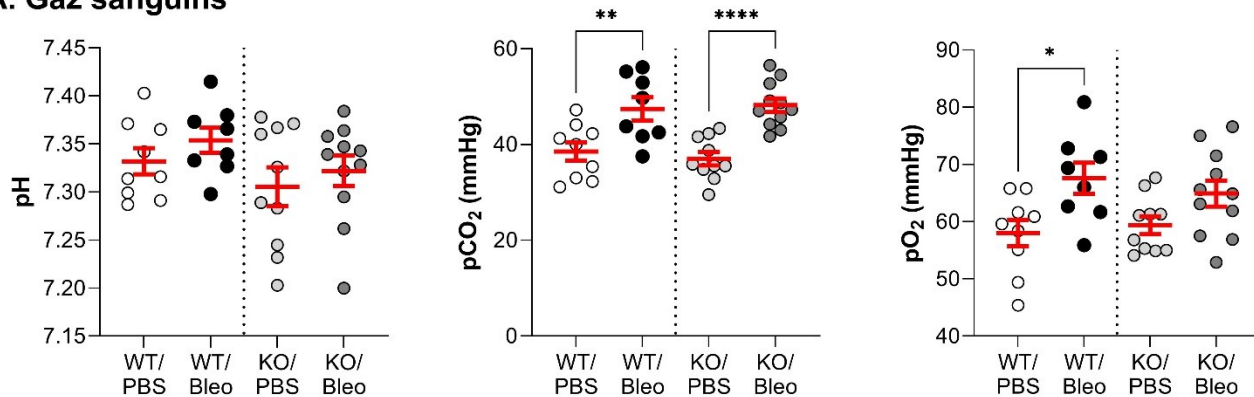
Évaluation *in vivo* des paramètres sanguins dans un modèle murin de dommages pulmonaires induit par la bléomycine

L'analyse sanguine par EPOC[®] (**Figure 17**) permet d'évaluer les niveaux de gaz sanguins (A), d'électrolytes (B) et de métabolites (C). En condition physiologique, aucun de ces paramètres n'est différent entre les souris WT et KvLQT1-KO, sauf pour les niveaux de lactate (C, centre).

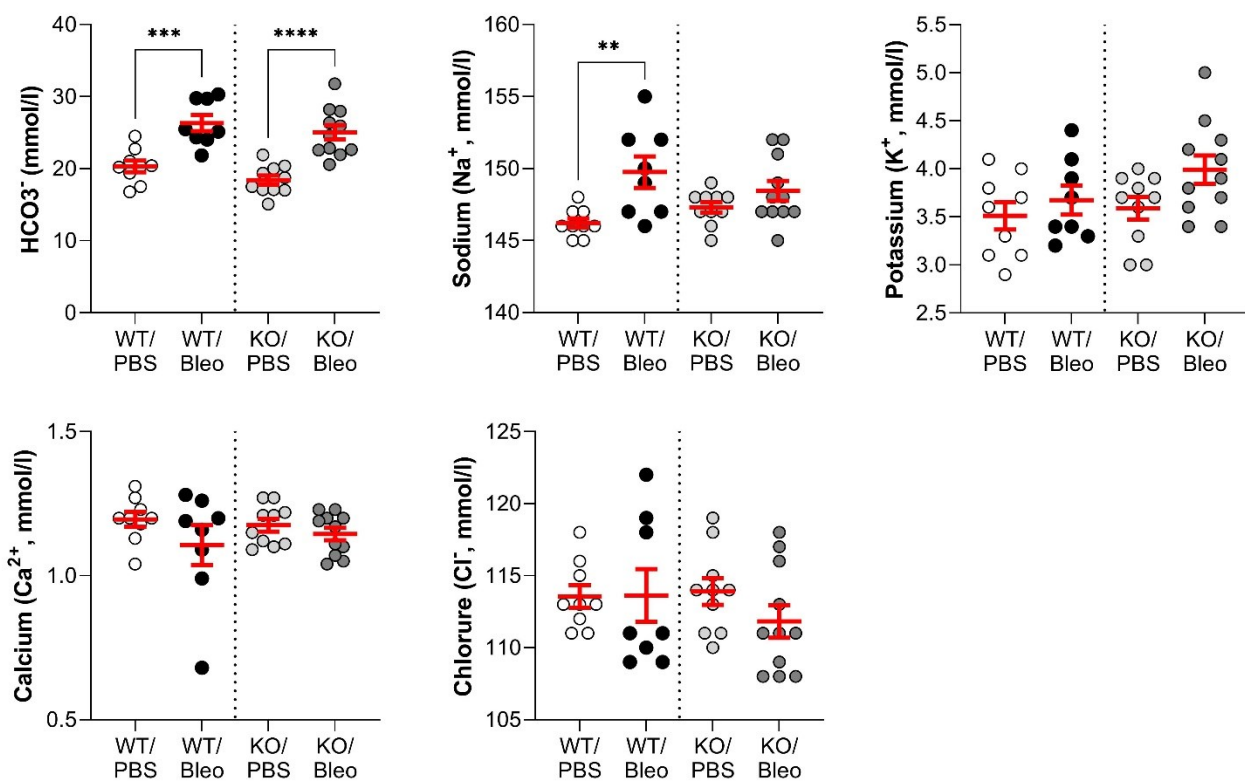
En conditions de lésions induites par la bléomycine, on observe une augmentation de la pression partielle de gaz carbonique (PCO_2 , A, centre) à un niveau similaire dans les souris WT et KvLQT1-KO. Les niveaux de bicarbonates (HCO_3^- , B, gauche), agissant probablement en tant que système tampon, ont également connu une hausse dans les groupes de souris WT et KvLQT1-KO exposées à la bléomycine. De ce fait, aucun changement n'est observé au niveau du pH sanguin (A, gauche). Une hausse de la pression partielle en oxygène (PO_2 , A, droite) est significative chez les souris WT

bléomycine, mais une tendance similaire est observable chez les souris KvLQT1-KO. Le sodium (Na^+) est le seul autre électrolyte ayant connu une fluctuation. En effet, son niveau est statistiquement plus élevé chez les souris WT bléomycine comparativement aux contrôles. En ce qui concerne les métabolites, le glucose sanguin (C, gauche) est diminué chez les souris WT bléomycine en comparaison aux WT contrôle. Dans les souris KvLQT1-KO exposées à la bléomycine, on observe plutôt une baisse des lactates sanguins, qui demeurent toutefois toujours statistiquement plus élevés que chez les souris WT bléomycine.

A. Gaz sanguins



B. Électrolytes



C. Métabolites

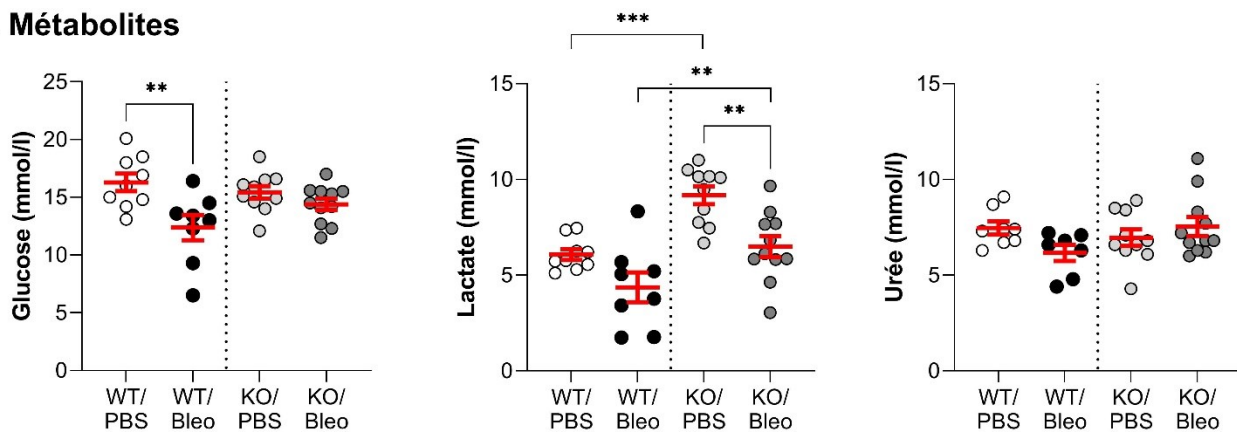


Figure 17. – Mesure de la dysfonction systémique par analyse sanguine *in vivo*

Les souris sauvages (WT, n=8-9, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (KO, n= 10-11, présenté à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n à jour 0). À jour 7, la concentration des gaz sanguins (A), les électrolytes (B) et les métabolites (C) ont été mesurés avec le système EPOC®. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, ****p < 0.001.

Mesure de la fonction pulmonaire chez des souris WT et KvLQT1-KO exposées à la bléomycine

Les paramètres de la fonction pulmonaire ont été mesurés grâce à plusieurs méthodes de ventilation permettant d'étudier la réponse mécanique du système respiratoire complet (R_{RS} , E_{RS} , C_{RS}), l'apport du tissu périphérique (G, H), et autres constantes calculées selon la courbe pression-volume (C_{st} , A, K, Aire, Travail respiratoire). Ces paramètres nous ont permis d'évaluer trois propriétés biophysiques déterminantes de la fonction pulmonaire soit la résistance, l'élastance et la compliance.

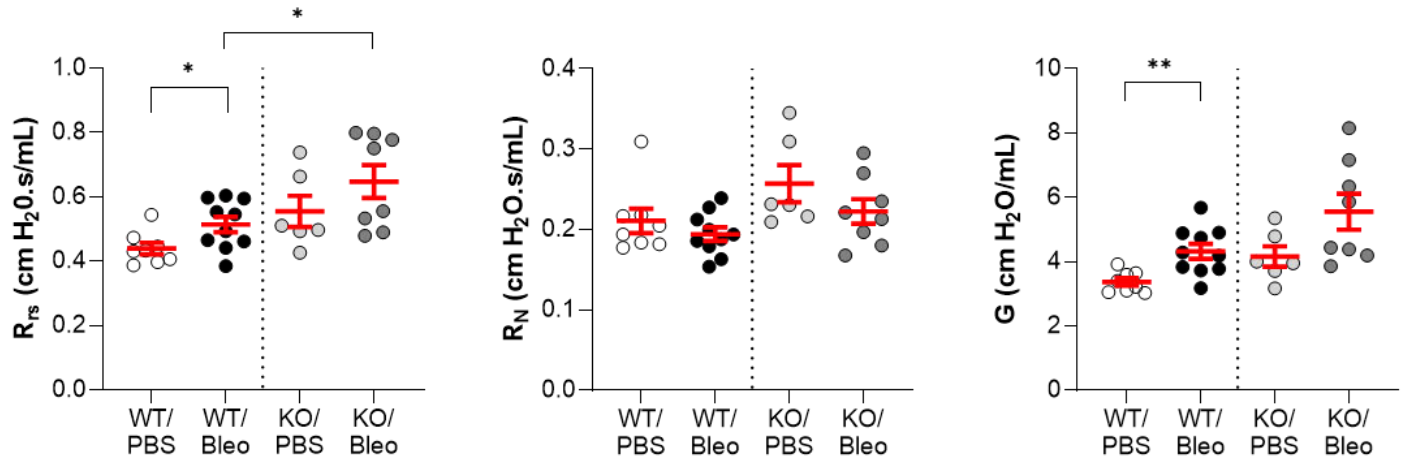
La résistance du système respiratoire (**Figure 18, panel A**) est directement liée au niveau de constriction des voies aériennes (20%) et respiratoires (80%). La résistance est dépendante du débit, de la densité et de la viscosité des gaz, toutefois puisque ces éléments sont contrôlés par la méthode de ventilation avec le système Flexivent, les changements au niveau de la résistance seraient plutôt d'ordre anatomique ou biologique.

Nos données montrent que la résistance du système respiratoire entier (R_{rs}) est légèrement plus élevée chez les souris KvLQT1-KO (KO), relativement aux souris WT en conditions physiologiques, mais il ne s'agit que d'une tendance non statistiquement significative. L'instillation de bléomycine a cependant provoqué une augmentation significative de la R_{rs} chez les souris WT (WT/PBS vs WT/Bleo), la même tendance est également observée chez les souris KO, mais une hétérogénéité dans leur réponse fait perdre en puissance statistique. Toutefois, la R_{rs} est significativement supérieure chez les souris KO, comparativement aux WT (KO/Bleo vs WT/Bleo).

La résistance issue des voies conductrices (R_N) ne semble pas avoir été modulée, ni par l'extinction du KvLQT1 ou ni par les lésions induites par la bléomycine. On peut donc postuler que les changements de résistance suite à la bléomycine seraient attribués aux voies respiratoires périphériques. Le coefficient G, qui reflète l'énergie dissipée en chaleur lors de la manœuvre ventilatoire, est étroitement lié à la résistance. En effet, on observe que G est également plus élevé suite au challenge induit par la bléomycine chez les souris WT. La valeur de G a une tendance à la hausse plus marquée dans les souris KO/Bléo, comparé aux WT/Bléo, mais la distribution hétérogène des réponses empêche d'atteindre la significativité.

L'élastance est la deuxième propriété pulmonaire mesurée par les paramètres Ers et H (**Figure 18, panel B**). L'élastance est définie comme la capacité du poumon à revenir à son état initial et correspond donc à l'inverse de la compliance. Le retour du poumon à sa forme initiale dépend du stockage d'énergie dans le tissu (raideur) et de son recul élastique. Tel qu'attendu, la bléomycine a induit une augmentation de l'Ers chez les souris WT que KO. Toutefois, l'impact de la bléo sur l'élastance des souris KO est plus prononcé que dans les souris WT. Le coefficient H, qui tient majoritairement en compte un apport des tissus périphériques, présente le même profil que l'Ers déterminé sur le système respiratoire complet. En résumé, la bléomycine détériore la résistance et l'élastance pulmonaire, de manière plus prononcée chez les souris KvLQT1-KO que chez les WT.

A. Résistance



B. Élastance

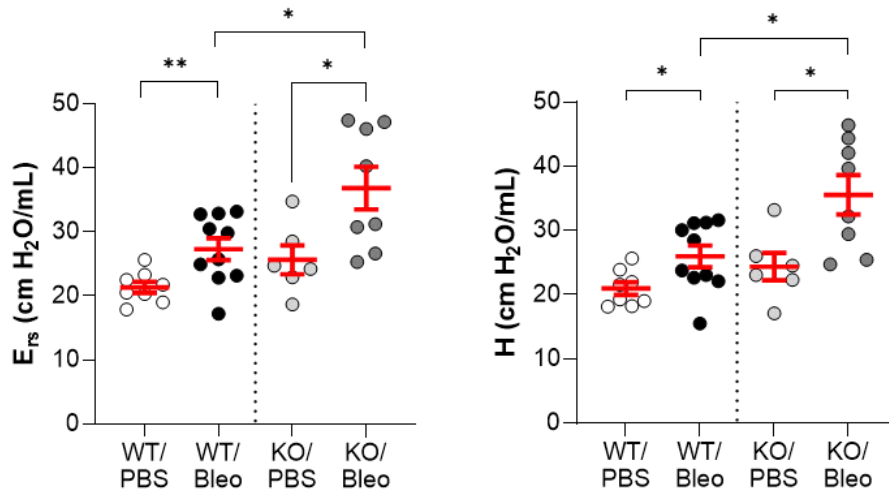


Figure 18. – Évaluation de la fonction pulmonaire *in vivo*

Les souris sauvages (WT, n= 8-10, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (KO, n=6-8, présentées à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 µl, i.n à jour 0). À jour 7, divers paramètres ventilatoires ont été mesurés grâce au système FlexiVent et ces données reflètent la résistance (A) et l'élastance (B) pulmonaire. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres ventilatoires. *p < 0.05, **p < 0.01.

La compliance pulmonaire, la troisième propriété biophysiques du poumon, est représentée par la courbe pression-volume (PV) (**Figure 19**). En condition physiologique, les souris KvLQT1-KO (KO) ont un léger décalage de la courbe PV, comparativement aux souris WT, mais l'amplitude entre la courbe inflation-déflation est similaire. Chez les souris WT, la bléomycine induit un léger décalage de la courbe PV vers le bas, mais ce décalage est toutefois plus important chez les souris KO/Bléo, en comparaison avec les souris contrôles (KO/PBS). La C_{rs} (méthode de fréquence unique) et C_{st} (calculée à partir de la courbe PV) sont deux mesures obtenues différemment de la compliance, mais elles dévoilent les mêmes résultats sur l'impact de l'extinction du KvLQT1 en bléomycine. En effet, chez les souris WT autant que KO, la bléo a altéré les valeurs de compliance. Toutefois, cette diminution est plus marquée chez les souris KO (KO/Bléo) que chez les WT (WT/Bléo). Comme attendu, ces données sont en sens opposé de l'élastance pulmonaire, confirmant une aggravation de l'atteinte dans les souris KO suite au challenge à la bléomycine.

C. Compliance

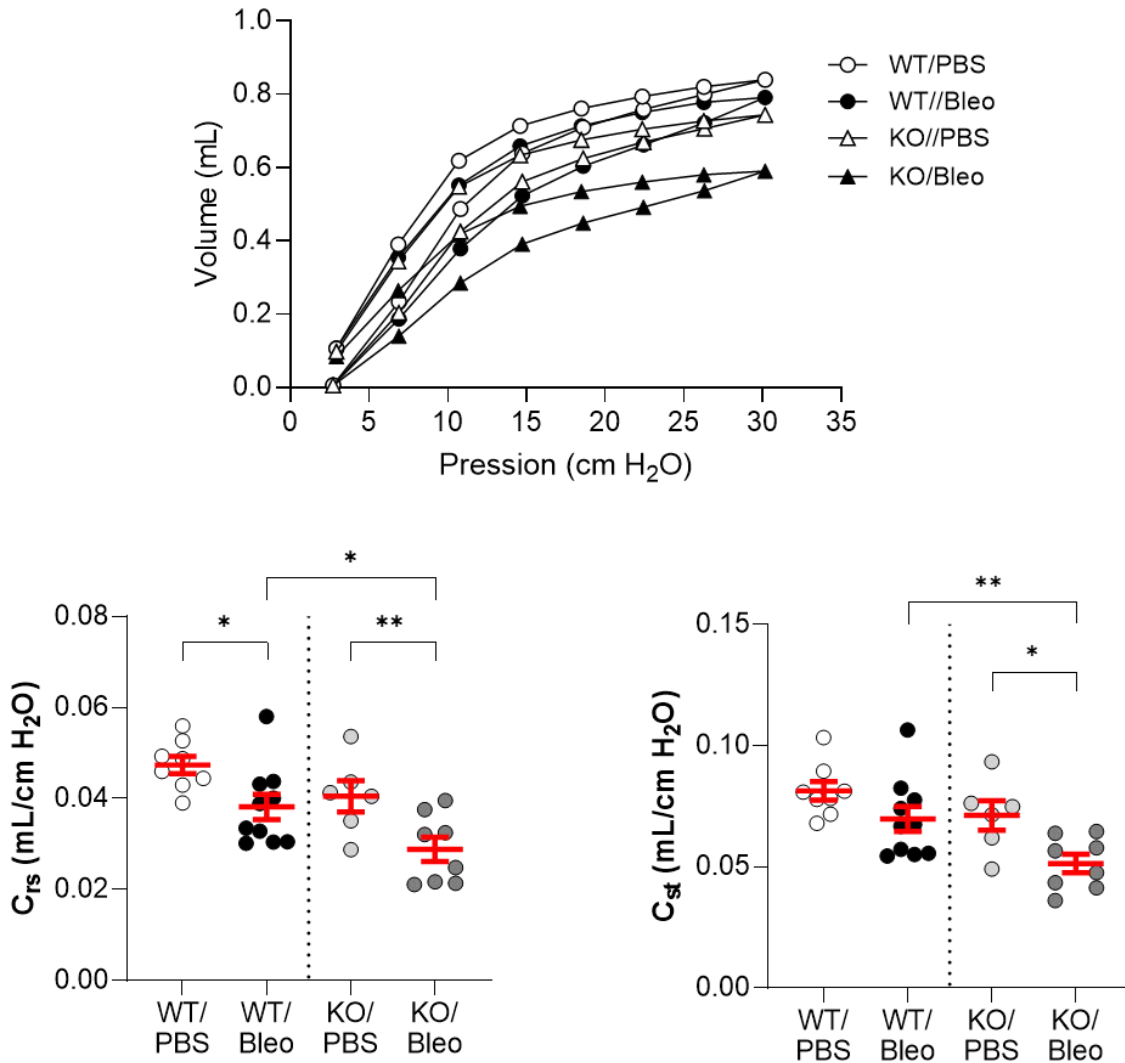


Figure 19. – Évaluation de la fonction pulmonaire *in vivo* (suite)

Les souris sauvages (WT, n= 8-10, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (n=6-8, présentées à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n à jour 0). À jour 7, divers paramètres ventilatoires ont été mesurés grâce au système FlexiVent. La compliance a été déterminée par la courbe pression-volume (PV), en mesurant la compliance dynamique (C_{rs}) et statique (C_{st}). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres ventilatoires. *p < 0.05, **p < 0.01.

Certains paramètres de mécanique respiratoire sont extraits de la courbe PV (Aire) et calculés selon l'équation de Salazar–Knowles (A et K) (**Figure 20**). La capacité inspiratoire (IC, méthode d'inflation profonde) et l'estimation faite à partir de la courbe PV (A) arborent le même profil (**Figure 20**). En effet, la bléomycine a significativement perturbé le volume d'air total inspiré dans les poumons des souris KO, en comparaison avec les souris contrôles (KO/PBS), mais n'a eu aucun impact chez les souris WT (WT/Bléo vs WT/PBS). De plus, la capacité inspiratoire des souris KO exposées à la bléomycine (KO/Bléo) est plus faible que celle des souris WT (WT/Bléo). L'inclinaison de la portion supérieure de la courbe de déflation (coefficient K) est similaire, en condition basale, entre les souris WT et KO et la bléomycine provoque une diminution semblable chez les souris WT (WT/Bléo) et KO (KO/Bléo). Plus l'inclinaison est faible (quasi-effet plateau), moins les volumes d'air ont changé malgré la forte pression et donc les échanges gazeux ne semblent pas avoir été efficaces. L'aire, entre les courbes d'inflation et expiration, représente une estimation de l'atélectasie présente avant la mise en manœuvre de la courbe PV et serait donc intrinsèquement liée aux dommages alvéolaires. Les souris contrôles (WT/PBS et KO/PBS) ne présentent pas de différence de cette aire. Ce facteur est toutefois plus élevé sept jours suivant l'insulte à la bléomycine, de façon significative chez les souris WT seulement (WT/Bléo). Le travail respiratoire (**Figure 20**) représente la dépense énergétique demandée à l'animal pour effectuer un cycle d'inspiration-expiration. Cette demande énergétique est d'autant plus élevée chez les souris WT et KO ayant reçu une instillation de bléomycine.

Finalement, la fonction respiratoire des souris WT et KvLQT1-KO est généralement similaire en condition physiologique. La bléomycine a bel et bien altéré la fonction respiratoire chez les souris WT et KO, toutefois les trois propriétés biophysiques des poumons soit la résistance, l'élastance et la compliance ont globalement été davantage détériorées chez les souris KO/Bleo, comparées aux WT/Bleo.

D. Paramètres PV loop

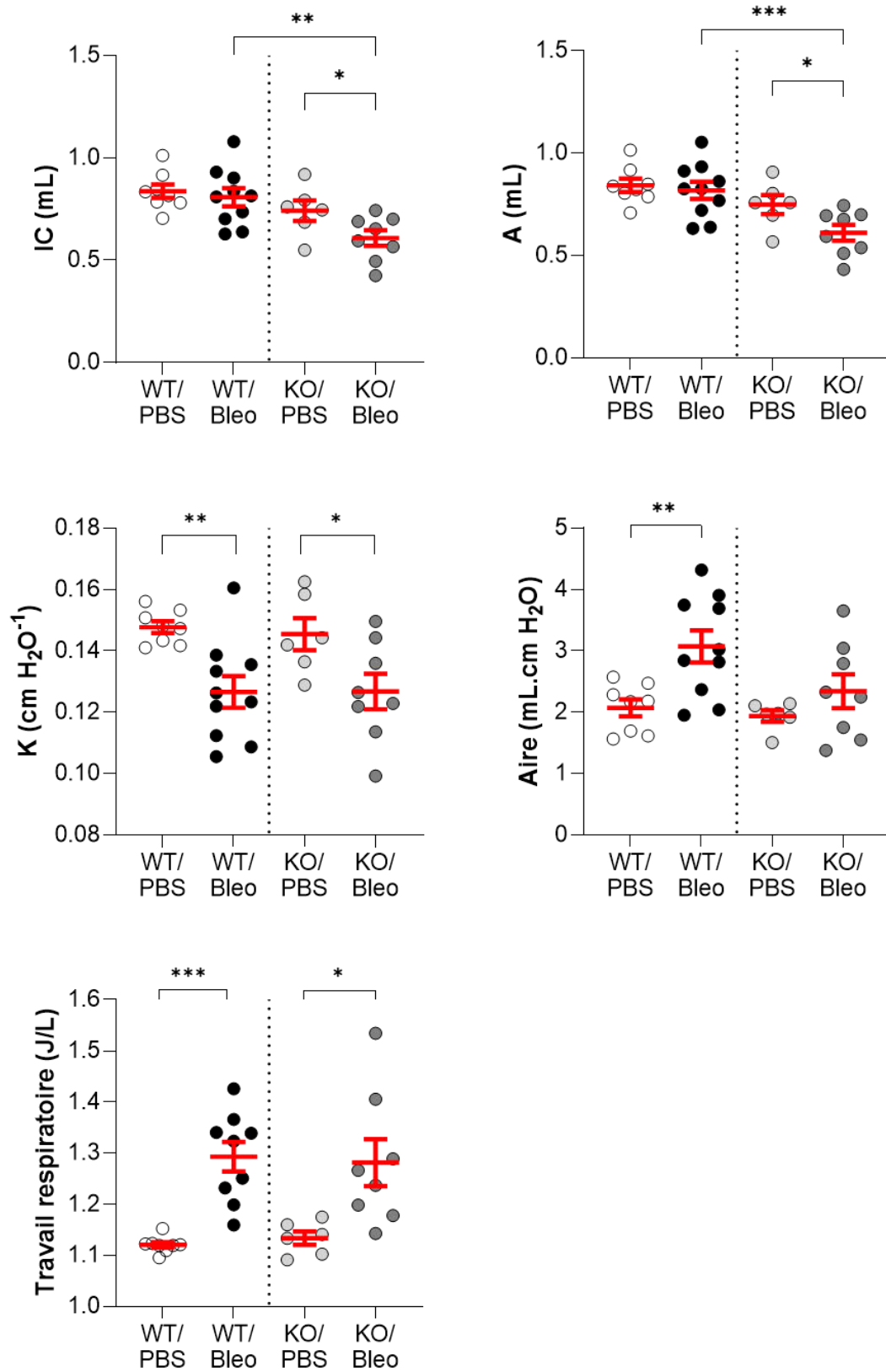


Figure 20. – Évaluation de la fonction pulmonaire *in vivo* (suite)

Les souris sauvages (WT, n= 8-10, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (n=6-8, présentées à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n à jour 0). À jour 7, une courbe pression-volume a été effectuée grâce au système FlexiVent et plusieurs paramètres ventilatoires ont alors été extraits de cette courbe. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres ventilatoires. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005.

Altérations de la barrière alvéolo-capillaire par la bléomycine

Le bon fonctionnement de la barrière alvéolo-capillaire est primordial pour la résolution de l'œdème pulmonaire et l'efficacité des échanges gazeux. Afin d'évaluer son état, nous avons procédé à des mesures de contenu liquidien pulmonaire (indice d'œdème pulmonaire), de la concentration protéique contenue dans les BALs et l'extravasation de la circulation sanguine vers le compartiment pulmonaire de Bleu Evans (interprété comme un indice de la perméabilité endothéliale).

Nos données montrent que le contenu liquidien pulmonaire (**Figure 21, panel A**) a doublé chez les souris WT ainsi que les KO ayant reçu de la bléomycine (WT/Bléo et KO/Bléo), comparativement à leurs contrôles respectifs. On observe également une forte augmentation de la concentration protéique (**Figure 21, panel B**) chez les souris exposées à la bléomycine, confirmant l'infiltration d'un œdème riche en protéines, dont les valeurs sont semblables entre les souris WT/Bléo et KO/Bléo.

En condition physiologique, les poumons des souris contrôles (WT/PBS et KO/PBS) présentent une concentration faible de Bleu Evans, témoignant de l'intégrité de la barrière endothéliale (**Figure 21, panel C**). Au contraire, les souris bléomycine arborent une concentration de bleu Evans élevée, dû à une perméabilité endothéliale altérée. Cependant, les souris KO/Bléo ont une concentration significativement plus faible que les souris WT/Bléo, indiquant que l'endothélium de ces souris est moins détérioré. Ces résultats portent à croire que le niveau de détérioration de la perméabilité endothéliale n'influence pas fortement le niveau d'œdème riche en protéines,

puisque les souris KO/Bléo ont tout de même présenté un œdème équivalent à celui des souris WT/Bléo.

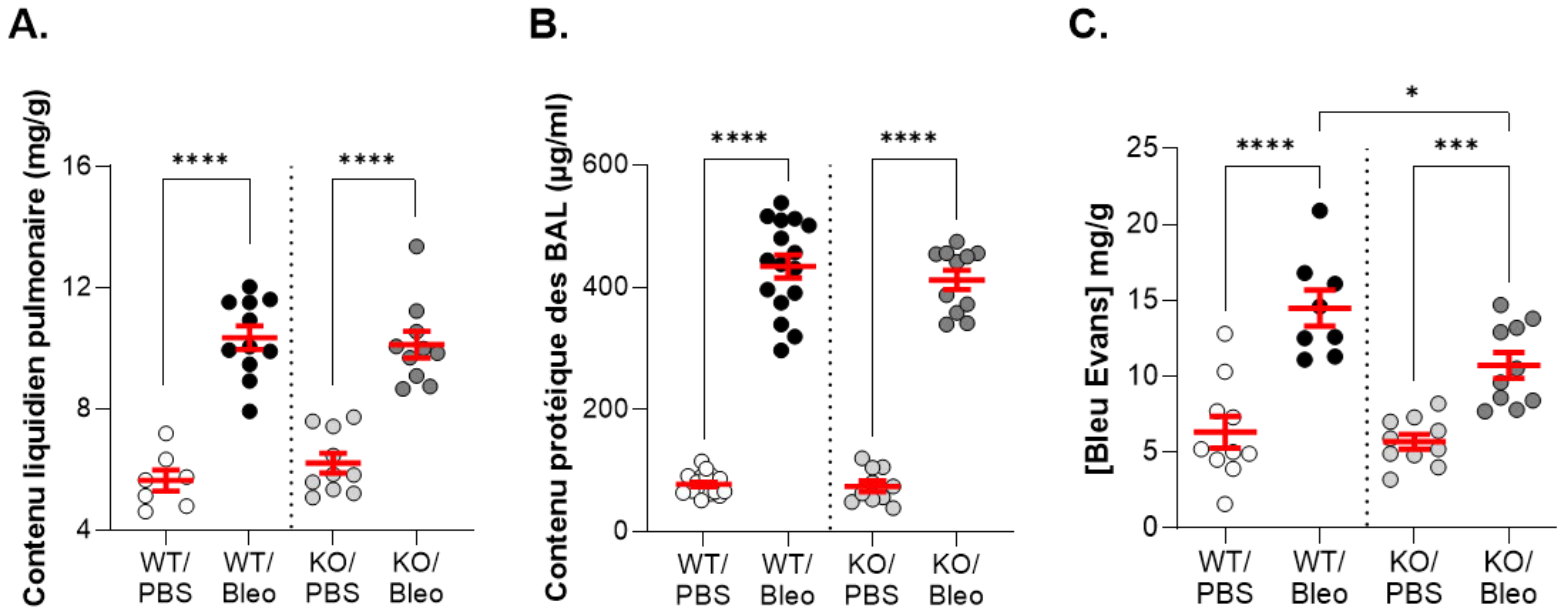


Figure 21. – Altérations de la barrière alvéolo-capillaire chez les souris exposées à la bléomycine.

Les souris sauvages (WT, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (KO, présenté à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non (PBS) avec la bléomycine (3U/kg, 50 µl, i.n à jour 0). À jour 7, nous avons procédé à la collecte des poumons (évaluation du contenu liquidien alvéolaire (A, n=7-11) ou la mesure de la concentration de Bleu Evans (C, n= 8-10)) ainsi qu'aux lavages broncho-alvéolaires (BAL, pour la mesure de la concentration protéique, B, n=10-20). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres (A, B, C). *p < 0.05, ***p < 0.005 et ****p < 0.001.

Modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire suite à l'extinction du canal KvLQT1 en contexte de bléomycine

La réponse inflammatoire est l'une des composantes importantes dans le développement d'un SDRA. Nous voulions donc savoir si la modulation génique du canal KvLQT1 pouvait avoir un impact sur la réponse inflammatoire induite par la bléomycine. Premièrement, nous avons évalué le nombre de cellules immunitaires totales retrouvées dans les BALs (**Figure 22, panel A**). Nos données montrent que les souris contrôles présentent très peu de cellules immunitaires, qui doivent normalement correspondre aux macrophages résidents, tandis qu'en condition bléomycine, les souris WT (WT/Bléo) et KO (KO/Bléo) présentent une augmentation du compte cellulaire immunitaire total qui est équivalent dans les deux groupes (WT/Bléo et KO/Bléo). De manière intéressante, c'est dans le compte différentiel que des disparités ont été observées. En effet, la proportion de neutrophiles dans les BALs (**Figure 22, panel B**) récoltés de souris WT et KO en condition bléomycine est plus élevée que chez leurs contrôles respectifs. Il s'agit d'un phénomène largement connu dans le développement du SDRA et confirme donc que le modèle expérimental de bléomycine réplique bien l'une des composantes clés du SDRA. Cependant, la proportion de neutrophiles chez les souris KO/Bléo est significativement plus faible que celle des souris WT/Bléo. Dans le décompte des macrophages, on aperçoit que les souris contrôles WT et KO (WT/PBS et KO/PBS) ont une proportion basale élevée de macrophages (**Figure 22, panel C**). Cette observation n'est pas surprenante dû à la forte présence de macrophages alvéolaires dans les BALs physiologique humains également. La proportion des macrophages est réduite chez les souris traitées à la bléomycine, due à la hausse des neutrophiles, mais la proportion de macrophages demeure plus haute dans les KO. Il est à noter qu'une proportion négligeable de lymphocytes (<10%) et d'éosinophiles (<4%) complètent le profil des cellules immunitaires présents dans les BALs. En résumé, les souris WT et KO en condition bléomycine développent bel et bien une réponse inflammatoire, mais avec un profil cellulaire distinct, avec un ratio macrophages/neutrophiles plus élevé chez les souris KO/Bléo.

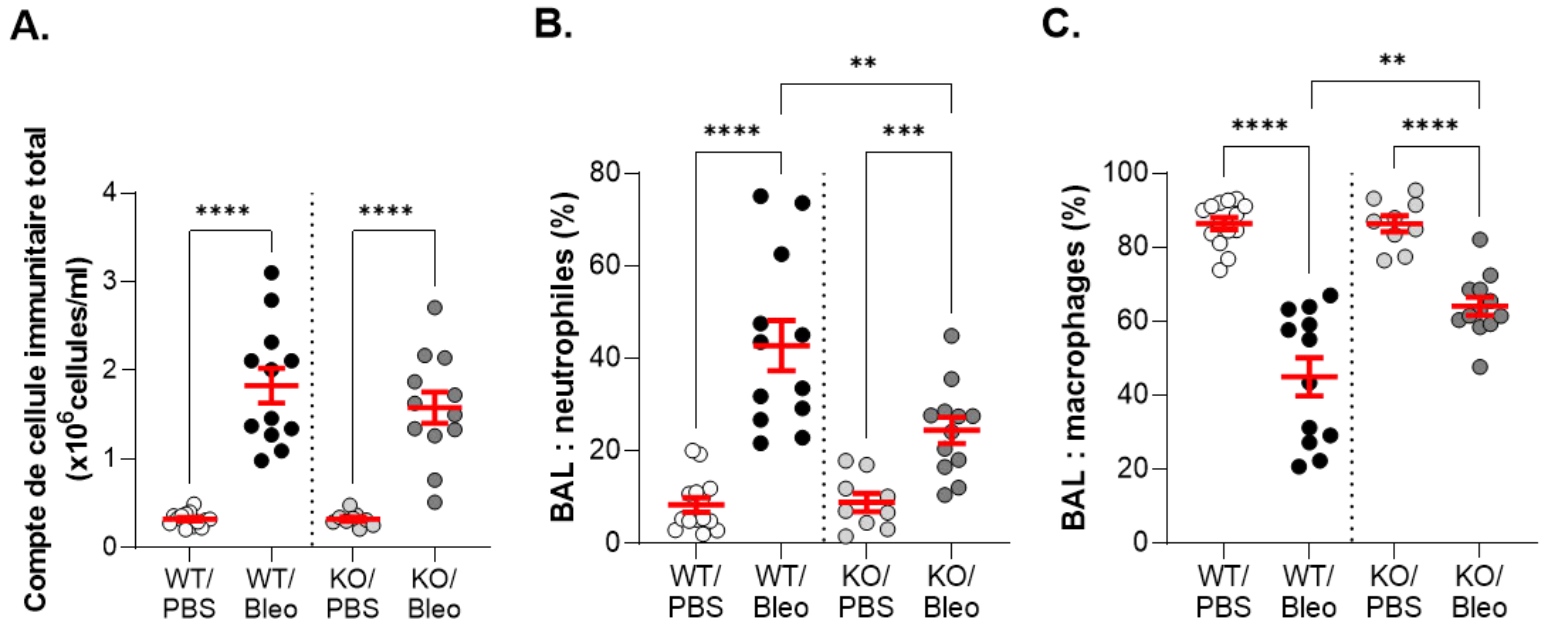


Figure 22. – Impact de la modulation du canal KvLQT1 sur la réponse inflammatoire cellulaire induite par la bléomycine

Les souris sauvages (WT, n=12-14, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (n=9-12, présentées à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non (PBS) avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n à jour 0). À jour 7, nous avons réalisé des lavages broncho-alvéolaires (BAL) à partir desquels un comptage de cellules immunitaires totales (A) a été effectué puis le culot cellulaire a été centrifugé et coloré par hématoxyline-éosine afin de procéder au comptage différentiel (représenté en %) de neutrophiles (B) et de macrophages (C). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres (A, B, C). **p < 0.01, ***p < 0.005 et ****p < 0.001.

Évidence de dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine sur coupes histologiques

L'observation des coupes histologiques des poumons de souris (**Figure 23, A**) démontre, qu'en condition physiologique, autant les souris WT que KvLQT1-KO présentent des structures alvéolaires saines, sans infiltrat ni congestion. Les poumons de souris WT/bléo sont quant à eux largement affectés. Les images de zones représentatives indiquent dans la zone 1 une forte congestion et une importante infiltration cellulaire. La zone 2 démontre un fort épaissement du septal et un changement structural des alvéoles tandis que la zone 3 montre que des dommages diffus, avec des zones alvéolaires plus saines à certains endroits, reflétant ainsi le caractère hétérogène des dommages pulmonaires.

Le ratio de l'aire du parenchyme endommagé / surface totale de la coupe histologique (**Figure 23, B**) regroupe l'ensemble des paramètres histologiques évalués, caractéristiques du dommage pulmonaire aigu, soit l'inflammation, l'épaisseur du septa et la présence de débris cellulaires. Plus le ratio se rapproche de 1 et plus la congestion des alvéoles est totale, rendant les échanges gazeux inefficaces. Seules les souris WT/bléo présentent des ratios statistiquement plus élevés que les souris WT/contrôle. De plus, la superficie pulmonaire lésée par la bléomycine (exprimée en % de la surface pulmonaire totale) est significativement supérieure dans le groupe de souris souris WT/ bléo (**Figure 23, C**) comparativement aux souris KvLQT1-KO/bléo. Le même profil est observé pour le score d'infiltrat inflammatoire, dont l'augmentation est statistiquement plus élevée chez les WT/bléo, que les souris KvLQT1-KO/bléo (**Figure 23, D**).

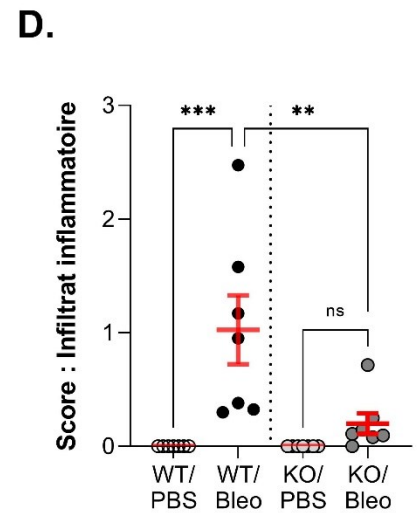
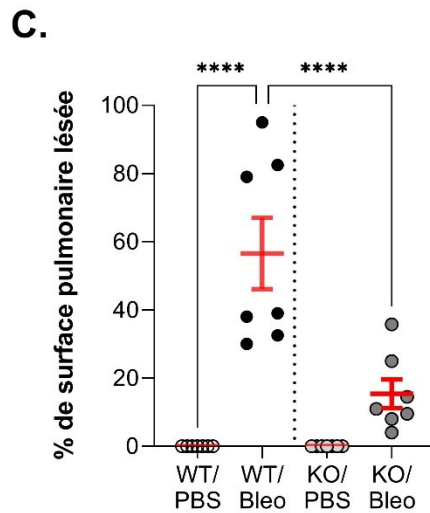
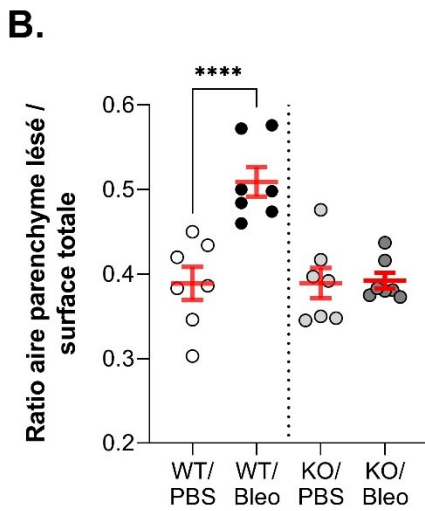
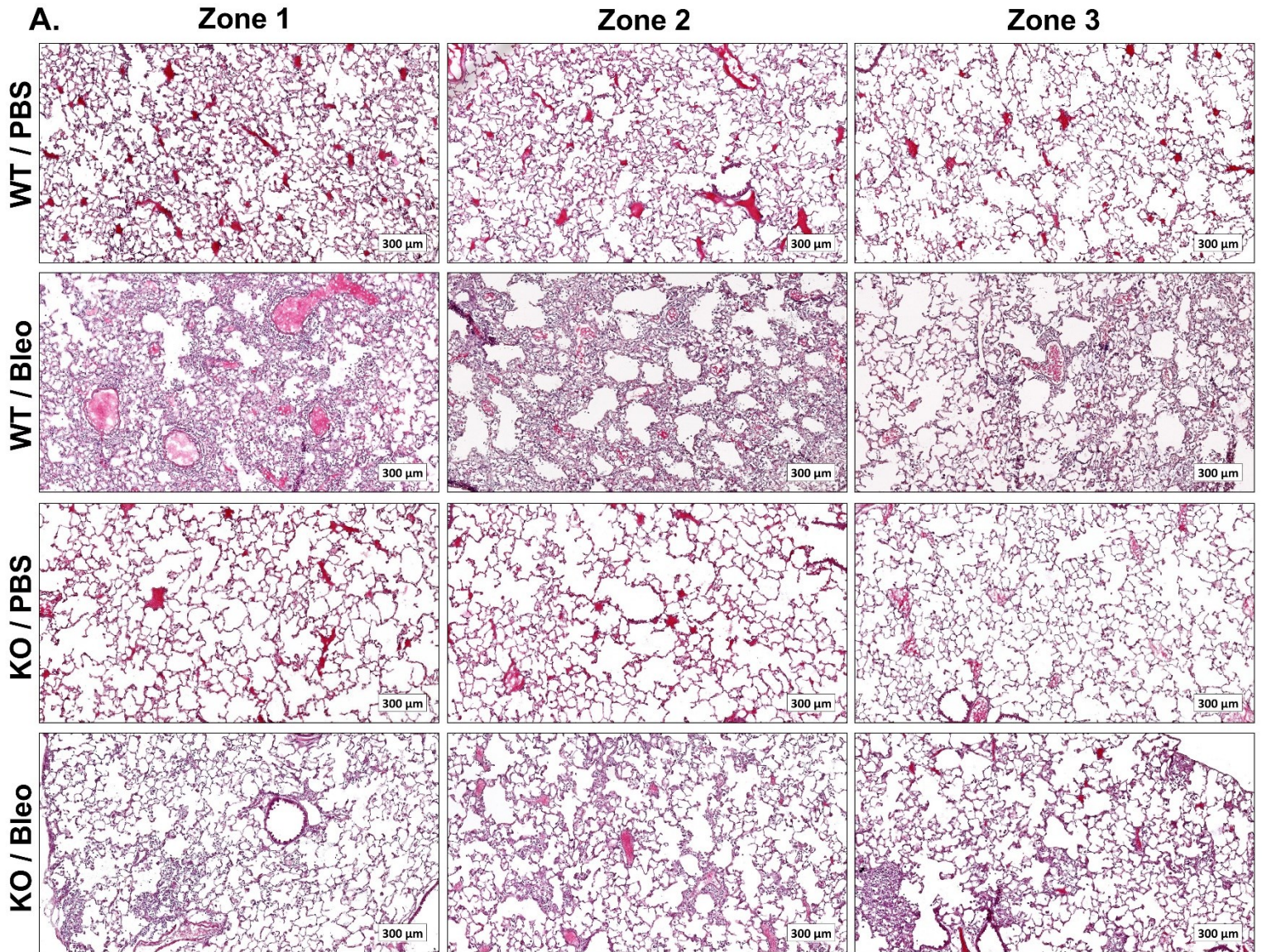


Figure 23. – Évidence de lésions tissulaires histologiques et analyse des paramètres des dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine

Les souris sauvages (WT, n=7, côté gauche de la ligne pointillée verticale) et les souris KvLQT1-KO (n=7, présenté à droite de la ligne pointillée verticale) ont été instillées ou non (PBS) avec la bléomycine (3U/kg, 50 µl, i.n à jour 0). À jour 7, les poumons ont été fixés et ultérieurement marqués à l'hématoxyline-éosine. Trois zones représentatives de chaque groupe expérimental sont présentées en (A). Nous avons mesuré le ratio de l'aire du parenchyme sur l'aire totale de la section du poumon (B) grâce au logiciel Visiomorph®. Ce ratio a été établi à partir des paramètres histologiques caractéristiques du dommage pulmonaire aigu, soit l'inflammation, l'épaisseur du septa et la présence de débris cellulaires. Le % zone lésée (C) sur l'ensemble de la coupe histologique a été évalué par observation des coupes histologiques totales scannées et représente la superficie présentant des dommages et foyers fibrotiques. Les pathologistes de la plateforme moléculaire du CRCUM ont également émis un score basé sur l'intensité d'infiltration inflammatoire (D). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres histologiques. **p < 0.01, ***p < 0.005 et ****p < 0.001.

Évaluation de l'intégrité épithéliale par l'analyse des marqueurs spécifiques des cellules ATI (AQP5) et ATII (pro-SPC)

L'analyse du marqueur spécifique (pro-SPC) des cellules ATII (**Figure 24, A**) démontre que les souris KvLQT1-KO présentent une plus forte expression de pro-SPC que les souris WT aussi bien en condition basale qu'après l'exposition à la bléomycine. La bléomycine n'a toutefois induit aucun changement d'expression chez nos deux groupes de souris. De façon similaire, on observe une plus forte expression de l'AQP5 (**Figure 24, B**), un marqueur spécifique des cellules ATI chez les souris KvLQT1-KO, comparé aux WT, en condition physiologique. Les cellules ATI étant plus sensibles aux dommages que les ATII, une réduction de l'expression d'AQP5 est observée suite au challenge à la bléomycine. Toutefois, le niveau d'expression de l'AQP5 demeure plus élevé chez les souris KvLQT1-KO/bléo que chez les souris WT/bléo.

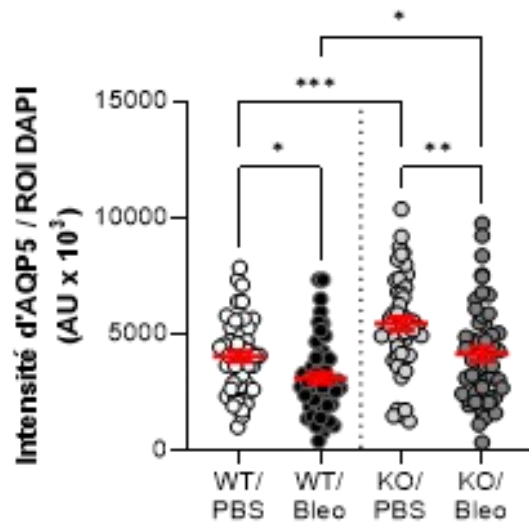
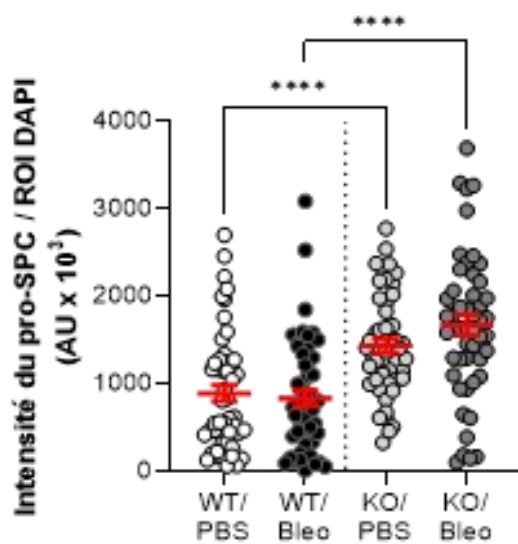
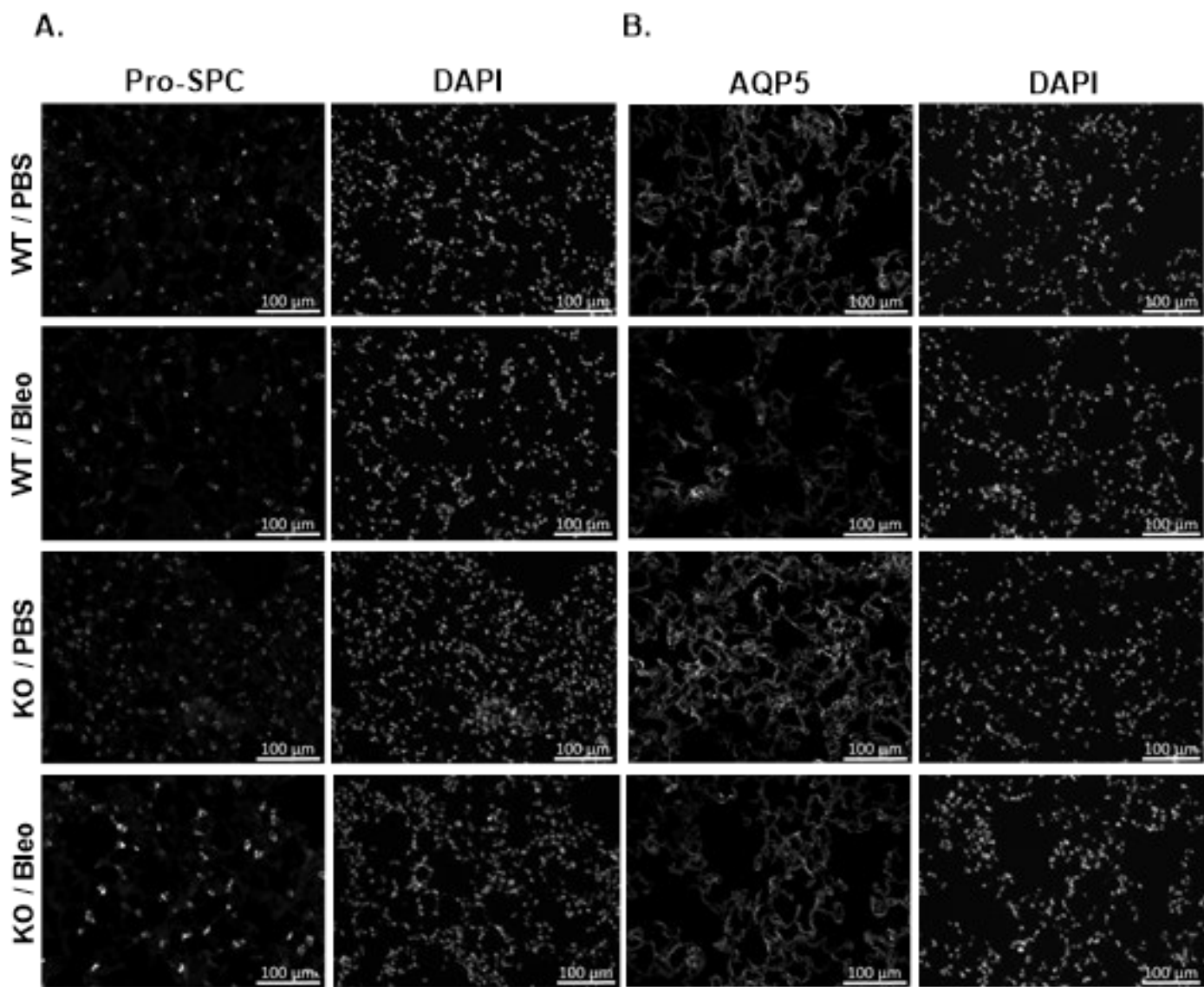


Figure 24. – Évaluation de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire par marquage des ATI et ATII sur coupes de tissus de poumons de souris

Images représentatives de l'immunomarquage de sections pulmonaires (5 μm , Scale : 100 μm) provenant de poumons de souris WT et KvLQT1-KO ayant reçu ou non (PBS) de la bléomycine à jour 0 (3U/kg, 50 μl , i.n). À jour 7, nous avons fixé et pratiqué un immunomarquage de pro-SPC (A, n=50, marqueur d'ATII) et de l'AQP5 (B, n=50, marqueur d'ATI). Les noyaux cellulaires sont marqués avec le DAPI. La quantification de l'intensité de marquage a été analysée par le logiciel ICY. Les valeurs sont représentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson : positif) ont été pratiqués pour A et B. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0005 et ****p < 0.0001.

Mesure de la vitesse de réparation épithéliale sur monocouche de cellules alvéolaires (ATII) issues de poumons de souris WT et KvLQT1-KO

La capacité de réparation épithéliale est primordiale dans la résolution des dommages induits par la bléomycine sur l'épithélium alvéolaire. Nous avons donc évalué la vitesse de réparation des monocouches épithéliales de cellules primaires ATII (Figure 25) issues de poumons de souris WT et KvLQT1-KO, en contexte physiologique seulement. Nos résultats démontrent que les monocouches d'ATII des souris KO se réparent plus lentement que celles de cellules ATII issues de souris WT. Cela démontre que la fonction du canal KvLQT1 est donc essentielle au processus de réparation épithéliale.

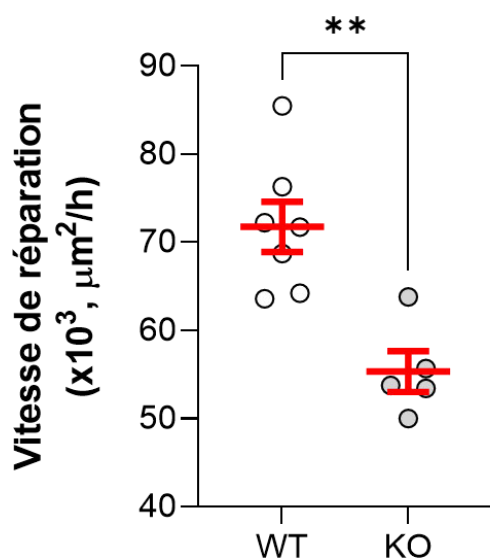


Figure 25. – Vitesse de réparation de monocouches de cellules alvéolaires de souris WT et KvLQT1-KO.

Les monocouches de cellules alvéolaires issues de poumons de souris WT (n=7) et KvLQT1-KO (n=5) contrôles ont été lésées par plaies mécaniques effectuées après 4 jours de culture cellulaire primaire. Les photos des monocouches ont été prises à t=0h et t=6h afin de mesurer l'aire de réparation et ainsi calculer la vitesse de réparation. Un point correspond à la moyenne de plusieurs plaies (4 plaies / puits minimum) tirées de la même expérience (total de n=5-7). Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. Un t-test non-pairé a été pratiqué. **p < 0.01 vs souris WT.

Ainsi, nos résultats suggèrent que le canal KvLQT1 est requis pour le maintien d'une fonction respiratoire adéquate suite à l'exposition à la bléomycine, plus spécifiquement sur la résistance, l'élastance et la compliance pulmonaire. De plus, nous avons démontré que la modulation de KvLQT1 altérait le profil cellulaire inflammatoire en présence de bléomycine. Finalement, il semble que le canal KvLQT1 soit également nécessaire aux processus de réparation épithéliale.

Chapitre 7 : Effets bénéfiques de l'activation du canal K⁺ KvLQT1 sur les dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine

7.1 Statut de l'article #5

Titre: **Beneficial effects of potassium channel KvLQT1 activation on lung damage induced by bleomycin**

Auteurs: Aubin Vega Mélissa, Girault Alban, Adam Damien, Meunier Émilie, Chebli Jasmine, Privé Anik, Robichaud Annette, Brochiero Emmanuelle

Statut: En préparation de publication

Contribution: J'ai participé à la grande majorité des expérimentations *in vivo* et je me suis chargée de l'extraction et la compilation des données, leur analyse et interprétation, ainsi que la production des figures.

7.2 Mise en contexte

Le rôle des canaux K⁺, notamment du canal KvLQT1, dans les mécanismes de réparation épithéliale et de clairance liquidienne a préalablement été établi au laboratoire avec des expérimentations *in vitro* (173,178). Puis, nous avons démontré que la modulation *in vivo* du canal KvLQT1 avait un impact sur l'homéostasie liquidienne, en contexte d'œdème pulmonaire (158). Dans le cadre de ces études, l'activation des canaux K⁺ fut le plus souvent associée à une amélioration de ces processus. Basés sur les résultats du précédent chapitre indiquant que la modulation génique du canal KvLQT1 *in vivo* influence le développement de certains paramètres déterminants du SDRA dans un modèle murin de bléomycine, nous avons alors voulu déterminer quel effet aurait une activation pharmacologique du canal KvLQT1.

Néanmoins, selon les données issues de la littérature, l'activation des canaux K⁺ n'est pas toujours synonyme de résolution, ou inversement, de dégradation des symptômes suite à leur modulation pharmacologique. De fait, une équipe brésilienne a démontré que l'inhibition non spécifique des

canaux potassiques dans un modèle indirect mimant une septicémie chez des rats (CLP) (288) a permis d'améliorer la survie des animaux et de diminuer la réponse inflammatoire (avec une baisse des niveaux de TNF- α et IL-1 β sanguin et de l'activité myéloperoxydase au niveau pulmonaire). Ces effets bénéfiques pourraient cependant, être attribués à la réduction partielle de l'expression pulmonaire de la synthase d'oxyde nitrique inductible (NOS-2).

L'équipe de Schwingshackl *et al.* a plutôt étudié l'impact de l'activation des canaux TREK-1 (K_{2P}2.1), dans la résolution de modèles *in vivo* complémentaires dans l'étude du SDRA. Dans un premier modèle d'exposition en chambre d'hyperoxie à court terme, l'activation pharmacologique de TREK-1 a permis de diminuer la concentration d'IL-6, le nombre de cellules totales et la concentration en protéines contenues dans les BALs, en plus d'améliorer la compliance pulmonaire et le score de dommages pulmonaires (289). Dans un second modèle d'exposition *in vivo* au virus d'influenza-A, cette même équipe a également démontré une protection des poumons, par la diminution de la signalisation de NF- κ B1 et RIG-1, secondaire à l'activation de TREK-1 (290). D'autre part, dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le lapin, la solution de conservation supplémentée avec un activateur du canal K_{ATP}, durant la période d'ischémie chaude, a assuré une protection aux poumons greffés par l'amélioration de la qualité des échanges gazeux, une préservation des structures alvéolaires ainsi qu'une tendance à la baisse de l'activité myéloperoxydase (291).

À la lumière de ces connaissances, nous pouvons porter l'hypothèse que l'activation du canal KvLQT1 pourrait moduler certains paramètres représentatifs d'un modèle complet de SDRA, induit par la bléomycine. Pour ce faire, nous avons utilisé un activateur pharmacologique du KvLQT1, le R-L3, que nous avons administré aux poumons par voie intranasale, de façon à stimuler directement les canaux KvLQT1 alvéolaires et étudier la réponse durant la phase aiguë du SDRA, induite par la bléomycine.

7.3 Matériel et méthodes

Animaux et déclaration éthique

Les souris et les rats ont été maintenus à l'animalerie du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Pour les souris, un rétrocroisement a été effectué avec des souris sauvages (WT, C57BL/6J acquises chez Jackson Laboratory) à toutes les 10 générations. Les souris et les rats ont été maintenus dans un environnement contrôlé avec accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture (2018 Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo, USA). Toutes les procédures impliquant l'utilisation d'animaux ont été préalablement approuvées par le Comité Institutionnel de la Protection des Animaux (CIPA) au CRCHUM en accord avec les recommandations du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux (CACC).

Conditions expérimentales *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* ont été pratiquées sur des souris de 6 à 10 semaines d'âge, réparties au hasard dans chacun de nos groupes expérimentaux décrits ci-dessous (répartition équilibrée selon le sexe et le poids). Les souris ont reçu une instillation intranasale (i.n.) de PBS (50 µl, 1/1000 DMSO (véhicule (veh)) ou de l'activateur pharmacologique du KvLQT1, le R-L3 (4 µM, 50 µl, dilués dans le DMSO (veh)) avant l'insulte par bléomycine puis de manière répétitive tous les deux jours. Ensuite, la bléomycine (Bleo, 3U/kg, Fresenius Kabi, Canada) a été instillée par voie intranasale (i.n., 50 µl) au jour 0, alors que le groupe contrôle a reçu la même quantité (i.n., 50 µl) de PBS au jour 0. Les souris ayant reçu des instillations de R-L3 sans exposition à la bléomycine (R-L3/PBS) nous ont servi de groupe expérimental contrôle pour lequel aucun changement dans les mesures de l'indice d'œdème pulmonaire ou sur l'atteinte histologique n'ont été observés et ne sont donc pas présentés dans nos section résultats.

Les groupes expérimentaux sont alors identifiés comme suit (i.n./i.n.) : PBS/PBS, PBS/Bleo et R-L3/Bleo tel qu'indiqués dans les légendes des figures.

À jour 7, les souris ont été anesthésiées pour la mesure des paramètres systémiques ou l'évaluation de la fonction pulmonaire ou bien euthanasiées par surdose de barbiturique (pentobarbital, injection intrapéritonéale, i.p.) avant la collecte des poumons. Ces échantillons ont alors été utilisés pour la mesure du contenu liquidien pulmonaire, les analyses histologiques et la pratique d'immunomarquage (voir ci-dessous).

Évaluation des paramètres systémiques (EPOC)

À jour 7, chaque souris a été anesthésiée avec un mélange d'isoflurane (3% mélangé à 21% d'oxygène dans le but de reproduire les conditions environnementales de base). Par la suite, nous avons procédé à l'ouverture de l'abdomen afin d'accéder à la veine cave inférieure. Le sang veineux a ensuite été récupéré avec une seringue de 1 mL préalablement conditionnée avec de l'héparine (Fresenius Kabi). Le sang collecté a été introduit dans le système d'analyse sanguin EPOC® (Siemens Healthineers Canada). Cet appareil permet de mesurer les gaz sanguins (pH, pCO₂, pO₂), les électrolytes (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻) et les métabolites (glucose, lactate et urée). Finalement, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les poumons ont été collectés pour en faire une analyse histologique.

Mesure de la fonction pulmonaire *in vivo* (FlexiVent)

Les propriétés mécaniques du système respiratoire ont été évaluées chez les souris WT contrôles (PBS) ou traitées avec le R-L3, ayant reçu ou non une instillation de bléomycine (i.n., 50ul, 3U/kg), grâce au système flexiVent FX (SCIREQ, Montréal, QC, Canada). La méthode d'exécution et les paramètres ventilatoires pour chacun des types de mesures effectuées ont préalablement été détaillés dans une de nos précédentes études (154).

Index d'œdème pulmonaire

Suivant l'euthanasie des souris à jour 7, la vena cava inférieure a été sectionnée, les poumons ont été retirés et pesés directement (poids mouillé). Les poumons ont été chauffés à 95 °C pendant 24 h pour finalement mesurer le poids sec (158). Nous avons alors calculé le contenu liquidien pulmonaire, en tant qu'index de l'œdème pulmonaire, en utilisant la formule ci-dessous (286) :

$$\text{WLC (mg/g)} = (\text{poids mouillé} - \text{poids sec}) / \text{poids souris}$$

Essai de l'extravasation du bleu d'Evans

L'essai d'extravasation du Bleu Evans est une technique communément utilisée qui permet d'évaluer la perméabilité pulmonaire consécutive aux dommages endothéliaux. Cette mesure a été réalisée chez des souris en condition contrôle (PBS) ou sept jours suivants l'insulte initiale par l'instillation de bléomycine (Bléo, 50ul, i.n., 3U/kg) et ayant reçu, ou non (PBS), un traitement au

R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n.). Une solution de bleu d'Evans (50 mg/kg, Sigma) a été injectée par voie intraveineuse via la veine de la queue et après trois heures de circulation sanguine, les souris ont été euthanasiées et les poumons perfusés avec du PBS-EDTA (5mM, 1 mL) via l'artère pulmonaire. Une fois les poumons prélevés, ceux-ci ont été rincés dans des bains successifs de PBS pour retirer l'excédant de sang. Les poumons ont été émincés avec des ciseaux et incubés avec de la formamide (Sigma) pendant 18 h à 37 °C. Par la suite, l'homogénat a été centrifugé et la luminescence du surnageant mesurée à 620 et 740 nm afin de déterminer la concentration de bleu d'Evans, selon une courbe standard. Une correction a été appliquée compte tenu de la possible contamination aux pigments d'hème grâce à la formule suivante :

$$E620 \text{ (EBD corrigé)} = E620 - (1.426 \times E740 + 0.030)$$

Analyse du fluide de lavage broncho-alvéolaire (BAL)

Une série d'animaux a été utilisée pour l'analyse du contenu du BAL, 7 jours suivant l'insulte initiale (bléo) ou non (PBS) et ayant été instillés ou non (PBS) avec l'activateur du KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n.). Après l'euthanasie, 1 mL de PBS a été injecté et délicatement aspiré par voie intratrachéale (i.t.). Le processus a été répété trois fois et les fractions regroupées. Le BAL a ensuite été centrifugé à 700 g pendant 8 minutes à 4 °C. Le surnageant a été récupéré, homogénéisé et utilisé pour la mesure du contenu protéique ou entreposé à -80 °C. La concentration en protéines dans le BAL a été mesurée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON, Canada).

En parallèle, le culot cellulaire a été resuspendu dans du PBS (400 μ l) afin de procéder au comptage des cellules immunitaires totales à l'hémacymètre. Ensuite, cette suspension a été diluée pour atteindre une densité d'environ 80 000 cellules (par 200 μ l/lame) avant la cyto centrifugation (850 rpm, 6 min, Thermo Scientific Cytospin 4 Cyto centrifuge, Block Scientific, NY, USA) sur lames de verre. Les lames ont été marquées avec Hema 3TM Stat Pack (Fisher Healthcare, USA) afin de pratiquer le comptage différentiel des cellules immunitaires. Les résultats sont rapportés en tant que pourcentage de neutrophiles et de macrophages sur 400 leucocytes totaux dénombrés par lames.

Analyse histologique

Dans le but de maintenir les espaces alvéolaires ouverts, une solution de fixation de paraformaldéhyde 4% (500 µL, Electron microscopy sciences, USA) a été délicatement introduite par voie i.t. avant la collecte des poumons. Ces tissus ont ensuite été incubés dans des bains successifs de gradient de sucrose (5%, 10% et 20%, dilué dans une solution de paraformaldéhyde 0,4%, 24 h par bain), soit une méthode permettant de préserver l'intégrité structurale des tissus, et ont finalement été inclus dans la résine (Shandon Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific). Ces inclusions ont été coupées au cryostat (Leica Microsystems, modèle CM1950110111) puis les cryosections (5 µm) ont été marquées avec l'hématoxyline-éosine (Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit, ThermoScientific, USA), scannées grâce au Versa stand, avec objectif de 20x, sur microscope à lumière blanche Leica® avant l'analyse histologique.

Une équipe de pathologistes (Dr Feryel Azzi et Dr Guillaume St-Jean de la plateforme de pathologie moléculaire du CRCHUM) ont produit une analyse à l'aveugle des lames histologiques des poumons de souris WT instillées avec le R-L3 ou non (PBS), avec ou sans insulte par la bléomycine (Bléo, 50ul, i.n., 3U/kg). Le pourcentage total représentant les zones lésées a été rapporté sur la surface totale de la coupe histologique. Le caractère inflammatoire, l'épaisseur des septa et la présence de débris ont été représentés par un score approfondi (de 0 (absence) à 3 (très sévère)) sur les zones lésées examinées.

Nous avons également complété l'analyse grâce à un protocole automatisé par le logiciel Visiomorph™ (Visiopharm) qui nous a permis d'obtenir la surface du septa, incluant les zones lésées et non lésées, sur la surface totale de notre coupe de tissus. Cette évaluation prend en compte l'épaississement du septa, la présence de foyers fibrotiques et l'infiltration de cellules immunitaires. Ainsi, plus les coupes histologiques présentent des lésions, plus le ratio se rapproche de 1.

Immunomarquage de pro-SPC et AQP5 sur des sections de tissus pulmonaires inclus dans la résine

Les sections pulmonaires (5 µm) ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 0,4%, les membranes ont été perméabilisées par 0,1% de Triton X-100 (étape spécifique au marquage de pro-SPC) et

bloquées pour 1 h avec une solution de PBS + 10% FBS (Saradigm, USA) + 10% BSA (Sigma-Aldrich). Ensuite, les lames ont été incubées à 4 °C, toute la nuit, avec des anticorps de lapin polyclonaux anti-pro-SPC (1:100, #AB3786 Millipore, USA) ou anti-AQP5 (1:100, AQP005, Alomone Labs, Israël). Le jour suivant, les sections ont été incubées à nouveau avec la solution de blocage puis avec un anticorps secondaire d'âne dirigé vers le lapin Alexa Fluor™ 568 (1:200, Life Technologies, USA) pendant 1 h. Le marquage des noyaux cellulaires au DAPI (1:1000, Sigma) a été effectué avant le montage avec le Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Les photos ont été prises avec la caméra Exiqua (QImaging, Canada) sous un microscope inversé à fluorescence (Olympus, Canada) à 200x (NA =0.75) et analysées avec le logiciel ICY. Notre protocole d'analyse préalablement détaillé (156) permet la mesure d'intensité (en pixels), de chaque région spécifique au signal (ROI) et normalisée par le nombre de cellules positives au DAPI (plus de 20 000 cellules par marquage). Ce protocole permet d'ajuster les paramètres de ROI afin de réduire tout signal de bruit de fond.

Isolation des cellules alvéolaires de rats (AII) et culture primaire

Les cellules alvéolaires (AII) ont été isolées à partir de poumons de rats mâles Sprague-Dawley (6-7 semaines). Après la collecte des poumons, ceux-ci sont rincés avec une solution physiologique pour retirer l'excédent de cellules sanguines et de macrophages alvéolaires. Les poumons ont ensuite été digérés avec une solution d'élastase (150U/rat, Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. USA, 30-45 minutes), émincés aux ciseaux et la suspension cellulaire a ensuite été filtrée. La suspension cellulaire a ensuite été enrichie en cellules alvéolaires (à ~86%) grâce à une technique d'adhésion différentielle (287), qui permet d'éliminer les macrophages alvéolaires (77). Après centrifugation, le culot cellulaire a été resuspendu dans un milieu MEM (Gibco, USA) supplémenté avec 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Ontario, Canada), 50U/mL pénicilline-streptomycine (ThermoScientific), 0,08 mg/L gentamycine, 0,2% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, CA), 10mM HEPES (Hyclone, Fisher Scientific) et 10% FBS (Saradigm, US) puis ensemencé sur des pétris de culture cellulaire (36 mm, Corning Incorporated, USA). Le milieu de culture a été remplacé au jour 3 et gardé jusqu'à confluence adéquate pour la pratique de plaies mécaniques (voir ci-dessous).

Pratique de lésions par plaies mécaniques et mesure de la vitesse de réparation

À jour 3, les monocouches confluentes de cultures primaires d'ATII ont été prétraitées pendant 24 h avec le R-L3 (4uM) ou avec du PBS (+veh) puis le jour suivant, des plaies mécaniques ont été pratiquées. Brièvement, les monocouches de cellules alvéolaires ont été lésées avec un embout de pipette (10 µL), à raison de deux plaies par puit. Après la pratique des plaies, le milieu a été remplacé par un milieu contenant de la bléomycine (25mU ou 50mU) ou non (PBS) en présence de R-L3 (4uM) ou de PBS (contrôle). Une marque préalablement dessinée sous la plaque a permis de photographier les plaies au même endroit (à temps 0 et temps 24 h). À temps 0, le milieu est changé par du DMEM + 10% FBS afin de retirer toutes cellules ayant décroché suite aux lésions. La vitesse de réparation des plaies a été déterminée à partir de la différence entre les aires de la plaie initiale et de la plaie après 24 h de réparation et analysée avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Analyse statistique

Les données sont représentées en graphique de style nuage de points avec une moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les graphiques et les analyses statistiques ont été produits avec le logiciel GraphPad Prism version 8 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Tout d'abord, la normalité des données a été analysée (Agostino-Pearson) avant de réaliser le test statistique approprié, tel que décrit pour chaque légende de figure. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$.

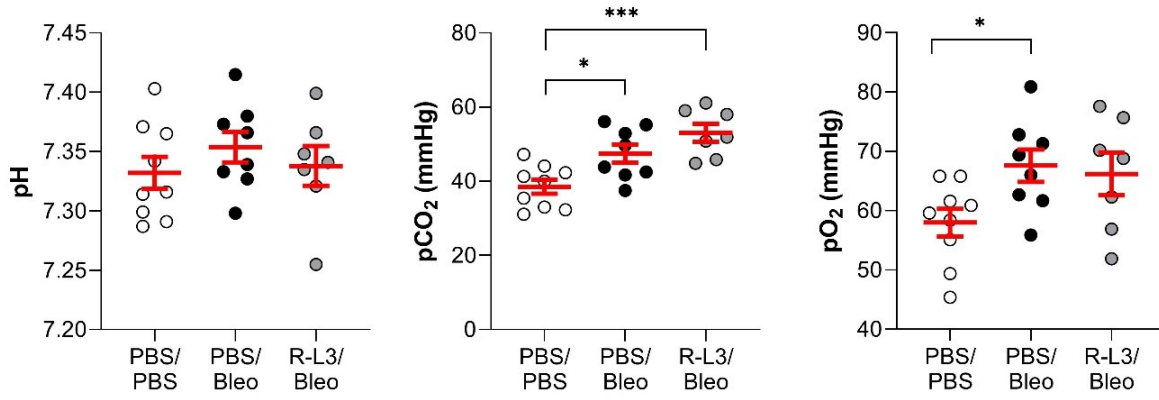
7.4 Résultats

Évaluation *in vivo* des paramètres sanguins dans un modèle murin de dommages pulmonaires induits par la bléomycine

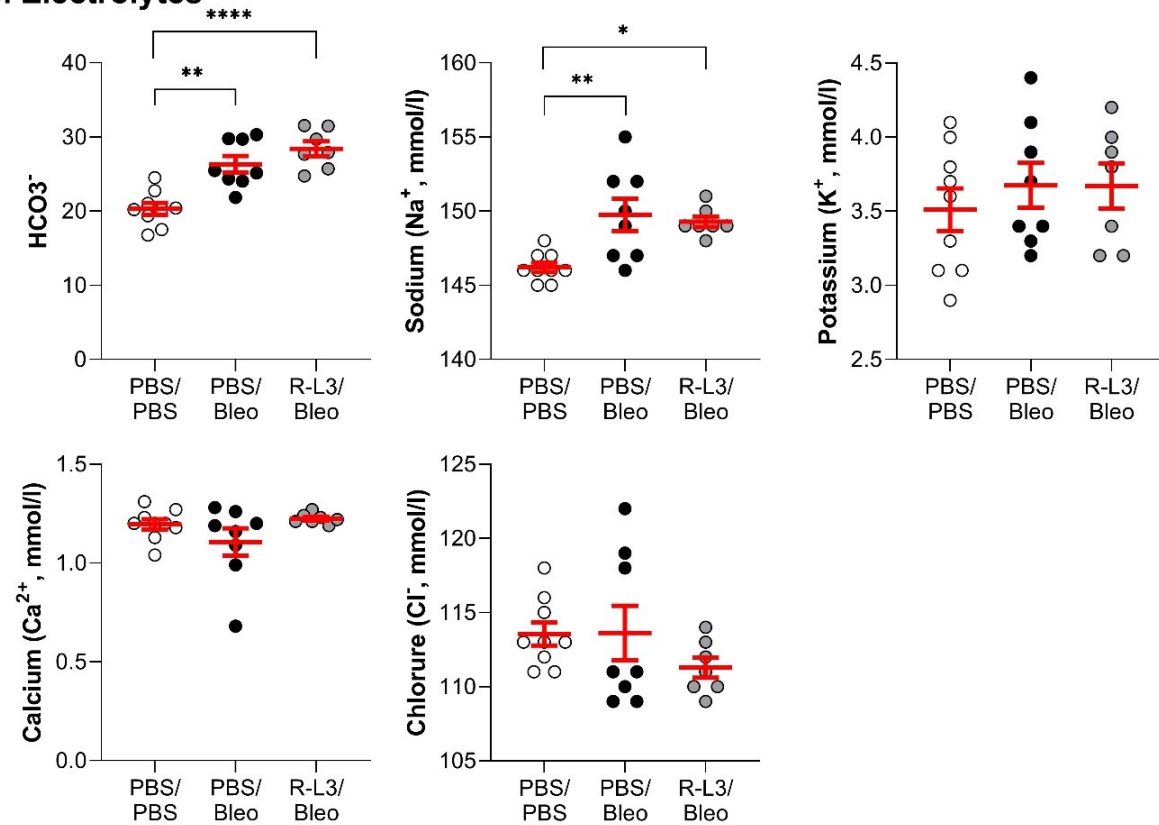
L'analyse sanguine par EPOC® permet d'évaluer les niveaux des gaz sanguins (**Figure 26, panel A**), d'électrolytes (**panel B**) et des métabolites (**panel C**). Nos données montrent que l'exposition à la bléomycine a induit une augmentation de la PCO₂ sanguine, en parallèle à une hausse de la PO₂. On n'observe toutefois aucun changement du pH sanguin, probablement dû à l'augmentation des bicarbonates qui jouent un rôle tampon. Au niveau des électrolytes, seule la concentration de

sodium est augmentée lorsque les souris sont exposées à la bléomycine. En revanche, tous les niveaux de métabolites (**C**), soit le glucose, le lactate et l'urée sont statistiquement diminués. En aucun cas, l'activation du KvLQT1 n'a été bénéfique dans le rétablissement de ces légers déséquilibres métaboliques.

A. Gaz sanguins



B. Électrolytes



C. Métabolites

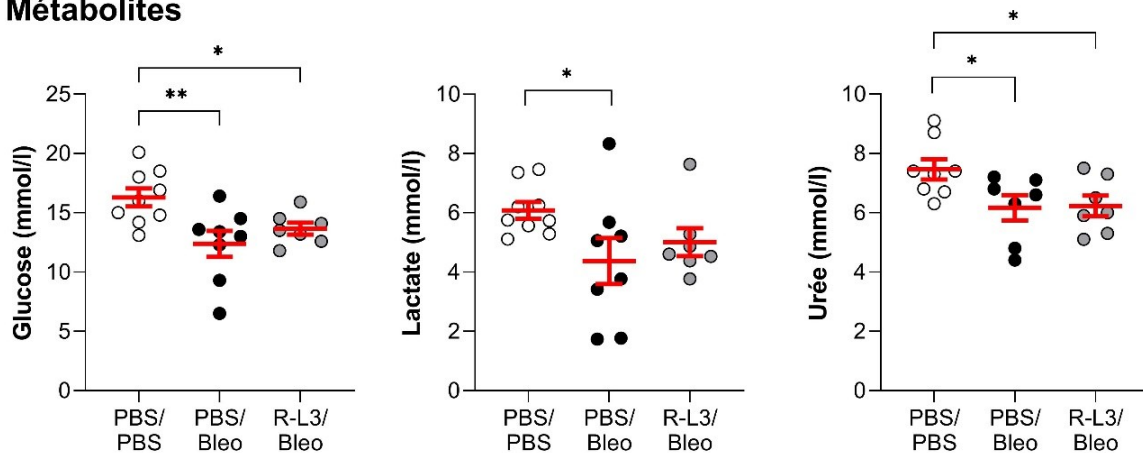


Figure 26. – Mesure de la dysfonction systémique par analyse sanguine *in vivo*

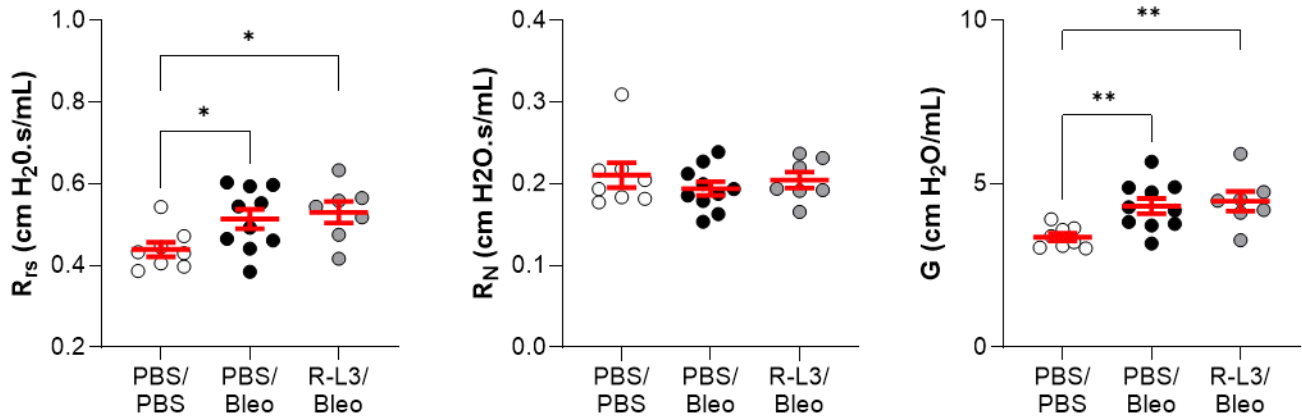
Les souris sauvages (WT, n=7-9) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, la concentration des gaz sanguins (A), les électrolytes (B) et les métabolites (C) ont été mesurés avec le système EPOC®. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins (A, B et C). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, ****p < 0.001.

Effet de l'activation du canal KvLQT1 sur la fonction pulmonaire *in vivo*

La fonction pulmonaire a été évaluée grâce au système Flexivent en suivant les changements de la résistance, élastance et compliance pulmonaire. La résistance du système respiratoire (R_{rs}) et le coefficient G (**Figure 27, A**) démontrent que la résistance semble altérée en condition bléomycine chez les souris ayant reçu ou non (PBS/Bléo) du R-L3 (R-L3/Bléo). Puisque la résistance des voies conductrices (R_N) n'a subi aucun changement malgré la présence de bléo ou de l'activation par le R-L3, le changement observé de résistance provient donc des régions périphériques.

L' E_{rs} et le coefficient H (**Figure 27, B**) qui représentent la propriété d'élastance pulmonaire ont subi les mêmes variations, c'est-à-dire que les deux paramètres augmentent en présence de bléomycine (PBS/Bléo) et que le R-L3 (R-L3/Bléo) ne permet pas de corriger ces indices.

A. Résistance



B. Élastance

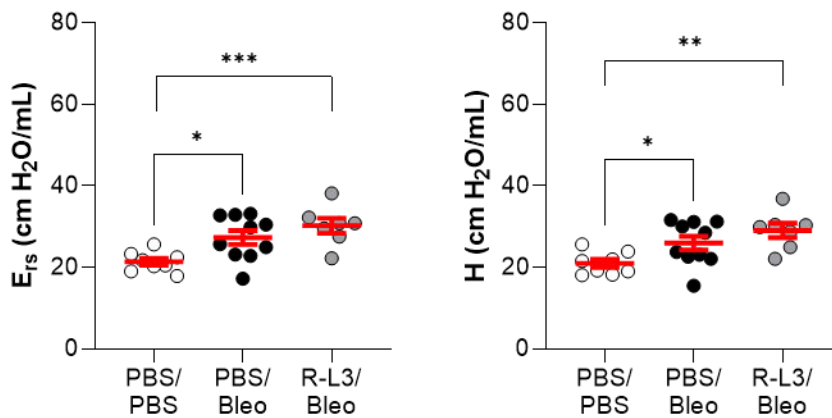


Figure 27. – Évaluation de la fonction pulmonaire *in vivo*

Les souris sauvages (WT, n=7-10) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, plusieurs paramètres ventilatoires ont été mesurés grâce au système FlexiVent dont la résistance (A) et l'élastance (B) pulmonaire. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins (A, B et C). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005

Au niveau de la compliance, la courbe PV (**Figure 28**) des souris bléomycine (PBS/Bléo) est très légèrement décalé par rapport à celle des souris contrôles (PBS/PBS), cependant l'aire entre les deux courbes semble plus prononcée. On remarque également que la courbe PV des souris instillées avec le R-L3 en condition bléomycine (R-L3/Bléo) est plus amplement décalée vers le bas par rapport à celle des souris bléomycine (PBS/Bléo) n'ayant reçu aucun traitement. Ces observations sont représentées par les mesures de compliance dynamique (C_{rs}) et statique (C_{st}) où l'on voit que les souris R-L3/Bléo présentent la plus faible compliance des trois groupes expérimentaux (**Figure 28**).

C. Compliance

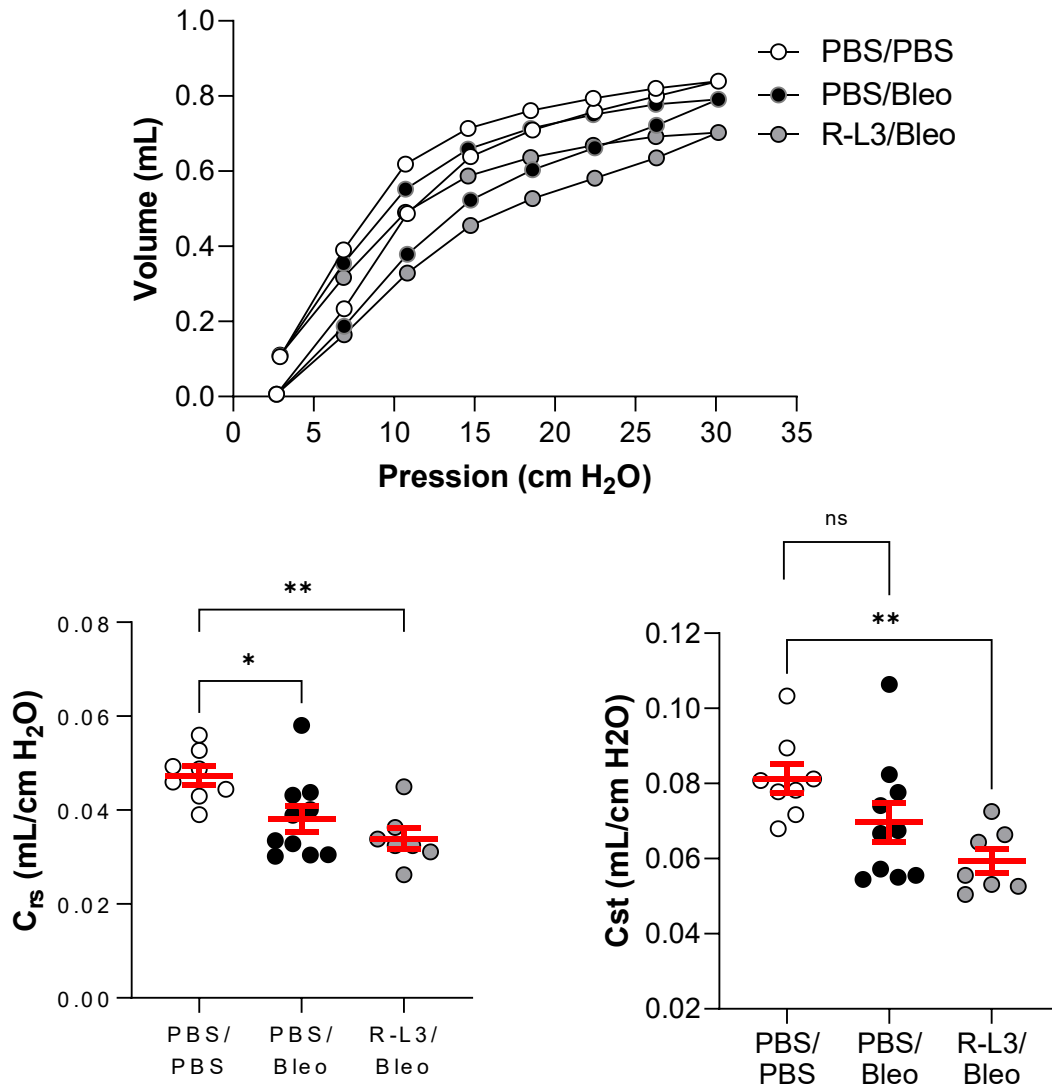


Figure 28. – Évaluation de la fonction pulmonaire *in vivo* (suite)

Les souris sauvages (WT, n=7-10) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, plusieurs paramètres ventilatoires ont été mesurés grâce au système FlexiVent. La compliance a été déterminée par la courbe pression-volume (PV), en mesurant la compliance dynamique (C_{rs}) et statique (C_{st}). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins. *p < 0.05, **p < 0.01

La capacité respiratoire (IC) et le coefficient A, calculé à partir de la courbe PV montrent une légère tendance à la diminution chez les souris bléomycine (PBS/Bléo), mais les volumes d'air pulmonaires sont les plus faibles chez les souris traitées avec le R-L3 en condition bléomycine (R-L3/Bléo). Pour ce qui est du coefficient K (défini à partir de l'inclinaison de la portion supérieure de la courbe de déflation), l'aire entre la courbe d'inflation-déflation et le travail respiratoire, les traitements avec l'activateur du KvLQT1 n'ont pas pu renverser les altérations produites par la bléomycine (**Figure 29**).

En résumé, la fonction pulmonaire est bel et bien altérée avec la bléomycine, mais les traitements avec le R-L3 n'ont permis d'améliorer aucune des propriétés biophysiques du poumon.

D. Paramètres PV loop

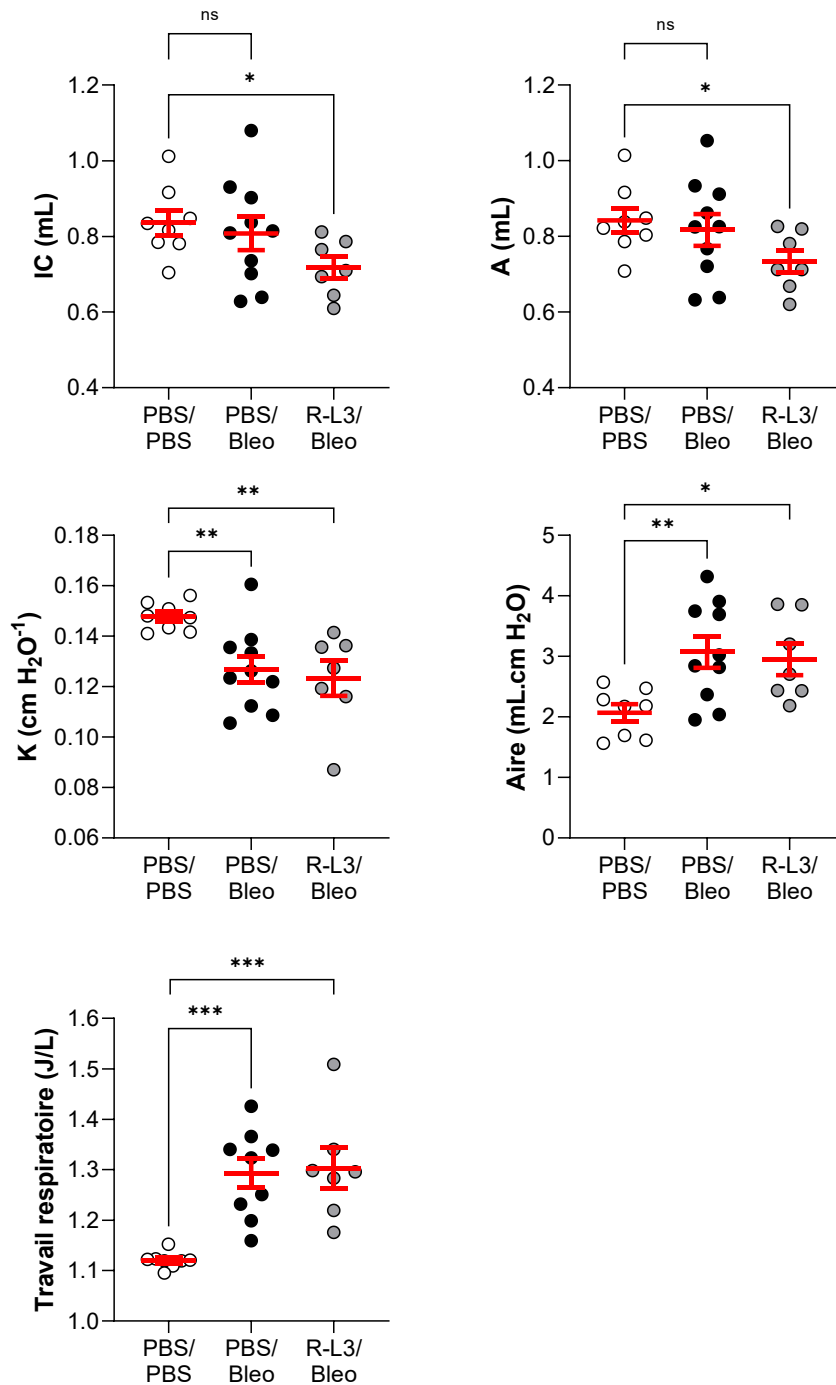


Figure 29. – Évaluation de la fonction pulmonaire *in vivo* (suite)

Les souris sauvages (WT, n=7-10) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, une courbe pression-volume a été effectuée grâce au système FlexiVent et

plusieurs paramètres ventilatoires ont alors été extraits de cette courbe. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins. *p < 0.05, **p < 0.01

Altération de la barrière alvéolo-capillaire par la bléomycine

La fonction de la barrière alvéolo-capillaire a également été examinée par la mesure du contenu liquidien pulmonaire (**Figure 30, A**), la concentration protéique dans les BALs (**Figure 30, B**) et l'indice de perméabilité endothéliale par la concentration pulmonaire de Bleu Evans (**Figure 30, C**). Nos données montrent que la bléomycine a provoqué une hausse marquée de l'indice d'œdème pulmonaire, de la concentration en protéines dans les BALs et de Bleu Evans ayant transvasé vers le compartiment pulmonaire à partir du sang. Nos animaux présentent donc une perméabilité endothéliale, qui a peut-être favorisé l'apparition d'un œdème pulmonaire riche en protéines. Malheureusement, aucune amélioration de ces paramètres n'a pu être observée chez les animaux traités avec le R-L3 (R-L3/Bléo), comparativement aux souris bléomycine (PBS/Bléo).

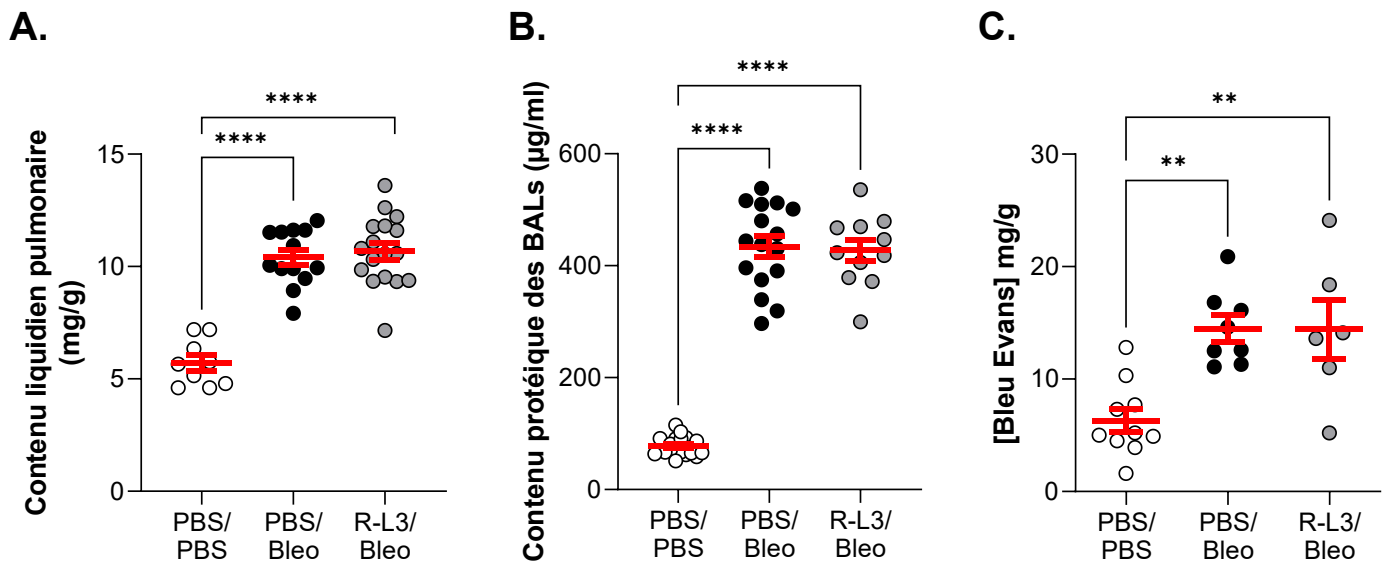


Figure 30. – Impact de l'activation de KvLQT1 sur l'altération de la barrière alvéolo-capillaire chez les souris exposées à la bléomycine

Les souris sauvages (WT, n=7-10) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, nous avons procédé à la collecte des poumons (évaluation du contenu liquidien alvéolaire (**A**, n=7-17) ou la mesure de la concentration de Bleu Evans (**C**, n= 6-10)) ainsi qu'aux lavages broncho-alvéolaires (BAL, pour la mesure de la concentration protéique, **B**, n=10-20). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins (A, B et C). **p < 0.01, ****p < 0.0001

Modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire suite à l'activation du canal KvLQT1 en contexte de bléomycine

La réponse inflammatoire a été déterminée par l'analyse du contenu des BALs au niveau du tissu pulmonaire. Premièrement, la moyenne du comptage des cellules immunitaires totales dans les BALs (**Figure 31, A**) prélevés chez des souris exposées à la bléomycine (PBS/Bléo) est environ 10x plus élevée que chez les souris contrôles (PBS/PBS). De façon intéressante, les souris traitées avec l'activateur du KvLQT1, le R-L3 (R-L3/Bléo), présentent une réduction significative du compte des cellules immunitaires totales en comparaison avec les souris bléomycine (PBS/Bléo). Par la suite, le comptage différentiel a permis de préciser la proportion des deux types de cellules immunitaires majoritaires, soit les neutrophiles et les macrophages. La bléomycine (PBS/Bléo) a induit une infiltration des neutrophiles dans la lumière alvéolaire, mais l'activation du KvLQT1 avec le R-L3 (R-L3/Bléo) a permis de contrecarrer en partie cette hausse. En effet, la proportion de neutrophiles dans les BALs (**Figure 31, B**) de souris R-L3/Bléo est significativement réduite en comparaison avec la condition bléomycine contrôle (PBS/Bléo), mais elle est restée tout de même plus élevée que les niveaux retrouvés à l'état physiologique (souris contrôles PBS/PBS). La proportion des macrophages (**Figure 31, C**) est, quant à elle, fortement diminuée en présence de bléomycine (PBS/Bléo) tandis que suite aux instillations de R-L3 (R-L3/Bléo), cette diminution est moins prononcée, se rapprochant du niveau basal (PBS/PBS). Ces résultats semblent indiquer que l'activation du canal KvLQT1 a un impact sur le profil de la réponse inflammatoire cellulaire induite suite à un challenge à la bléomycine.

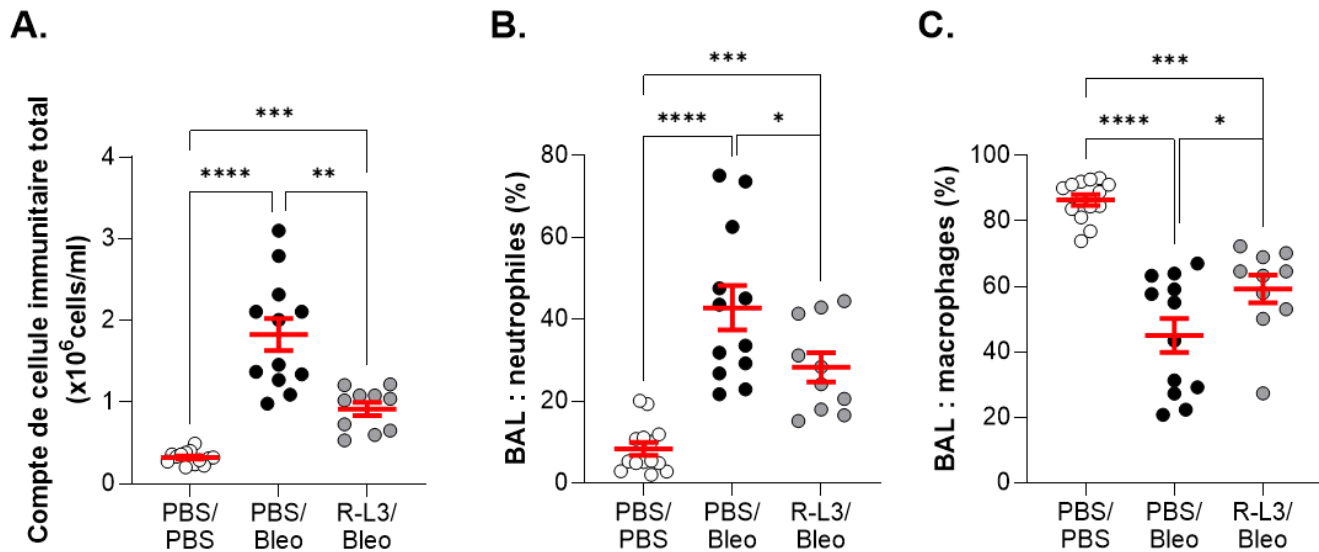


Figure 31. – Impact de l’activation du canal KvLQT1 sur la réponse inflammatoire cellulaire induite par la bléomycine

Les souris sauvages (WT, n=11-13) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, nous avons réalisé des lavages broncho-alvéolaires (BAL) à partir desquels un comptage de cellules immunitaires totales (A) a été effectué puis le culot cellulaire a été centrifugé et coloré par hématoxyline-éosine afin de procéder au comptage différentiel (représenté en %) de neutrophiles (B) et de macrophages (C). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins (A, B et C). **p < 0.01, ****p < 0.0001

Évidence de dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine sur coupes histologiques

Les souris contrôles (PBS/PBS) présentent dans l’ensemble des coupes histologiques (Figure 32, A), des alvéoles bien structurées, avec un mince septa et aucune infiltration cellulaire apparente. Les poumons de souris exposés à la bléomycine (PBS/Bléo) présentent des zones hétérogènes avec des alvéoles saines et des dommages diffus à proximité (zone 1). La zone 2 montre bien l’épaississement septal qui tend à déformer la structure alvéolaire. De plus, on remarque une

forte congestion et une importante infiltration cellulaire près des vaisseaux sanguins en zone 3. Dans les zones représentatives des poumons de souris ayant reçu, en parallèle à la bléomycine, l'activateur du canal KvLQT1, les foyers fibrotiques sont retrouvés en moins grand nombre, la congestion est atténuée et l'on observe moins d'infiltrat cellulaire dans la lumière des alvéoles. La structure alvéolaire est mieux maintenue et l'épaisseur des septa est réduite grâce à l'activateur du KvLQT1. En somme, les dommages semblent moins intenses et concentrés que chez les poumons de souris PBS/bléo.

Ces observations sont confirmées par le ratio l'aire du parenchyme / surface totale de la coupe histologique qui représente l'ensemble des paramètres histologiques, caractéristiques du dommage pulmonaire aigu, que nous avons évalués, soit l'inflammation, l'épaisseur du septa et la présence de débris cellulaires. Les ratios indiquent en effet que l'activateur R-L3 a permis de renverser significativement les dommages induits par la bléomycine (**Figure 32, B**). De façon similaire, l'activation du KvLQT1 a permis de réduire significativement la superficie du poumon lésé due à l'exposition à la bléomycine (**Figure 32, C**).

Une tendance à la baisse, non significative du score global d'infiltrat inflammatoire est observé dans les poumons des souris bléo ayant reçu le R-L3, comparé aux souris PBS/bléo. Toutefois, ce score est très hétérogène à l'intérieur du même groupe expérimental (**Figure 32, D**). L'activation du KvLQT1 a également permis de renverser significativement l'épaississement septal (**Figure 32, E**) provoqué par la bléomycine et a réduit partiellement la présence de débris cellulaires (**Figure 32, F**).

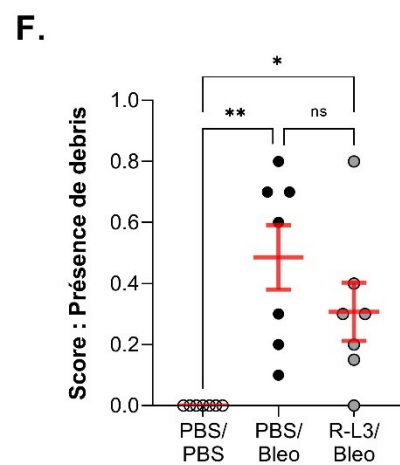
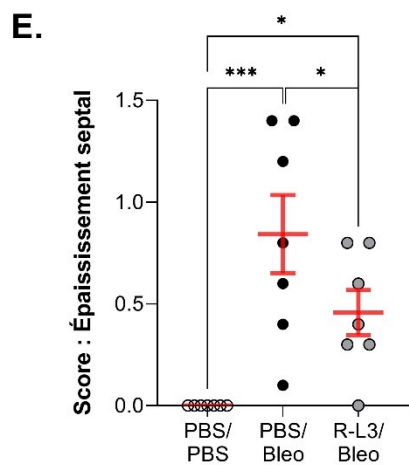
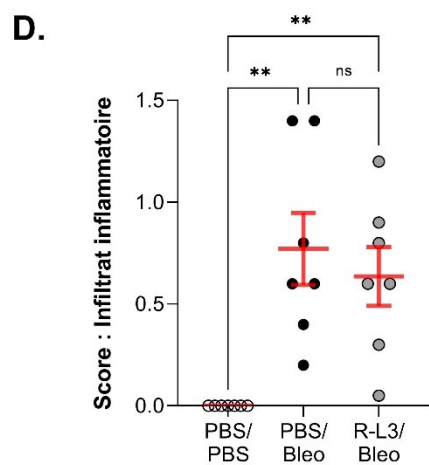
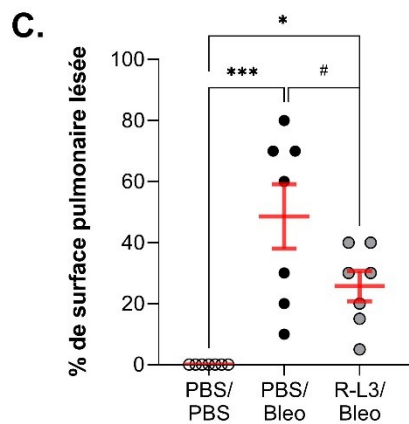
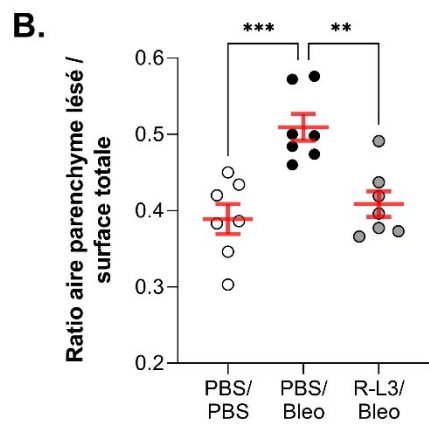
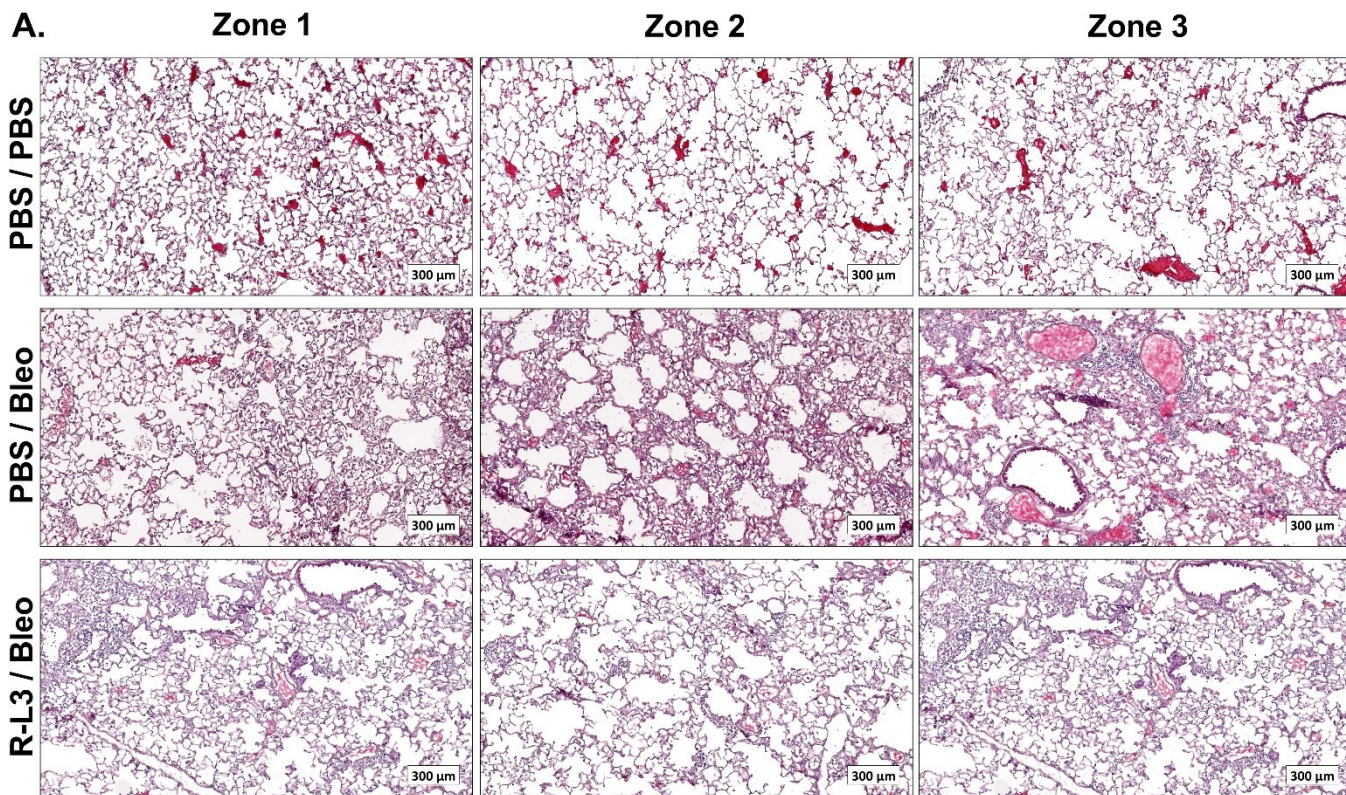


Figure 32. – Impact de l’activation du canal KvLQT1 sur les paramètres de dommages pulmonaires aigus induits par la bléomycine

Les souris sauvages (WT, n=7) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 µl, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 µM, 50 µl, i.n aux 2 jours). À jour 7, les poumons ont été fixés et ultérieurement marqués à l’hématoxyline-éosine. Trois zones représentatives de chaque groupe expérimental sont présentées en (A). Nous avons mesuré le ratio de l’aire du parenchyme endommagé sur l’aire totale de la section du poumon analysée (B) grâce au logiciel Visiomorph®. Le % de zone lésée (C), sur l’ensemble de la coupe histologique, a été évalué par observation des coupes histologiques totales scannées et représente la superficie des dommages et de foyers fibrotiques. Les pathologistes de la plateforme moléculaire du CRCUM ont également émis un score basé sur l’infiltration inflammatoire (D), l’épaississement septal (E) et la présence de débris (F). Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne ± SEM. Des tests One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) ont été pratiqués pour tous les paramètres sanguins (A, B et C). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, ****p < 0.001.

Évaluation de l’intégrité épithéliale par l’analyse des marqueurs spécifiques des cellules ATI (AQP5) et ATII (pro-SPC)

La quantification de l’intensité des marquages montre que l’exposition à la bléomycine n’a pas eu d’impact sur l’expression de pro-SPC (marqueur d’ATII, **Figure 33, A**), mais a contribué à diminuer significativement l’intensité d’expression de l’AQP5 (**Figure 33, B**), marqueur des cellules ATI qui plus sensibles aux dommages. De façon intéressante, l’activation du KvLQT1 par le R-L3, en parallèle à l’exposition à la bléomycine, a induit une augmentation significative de l’expression des marqueurs pro-SPC et d’AQP5.

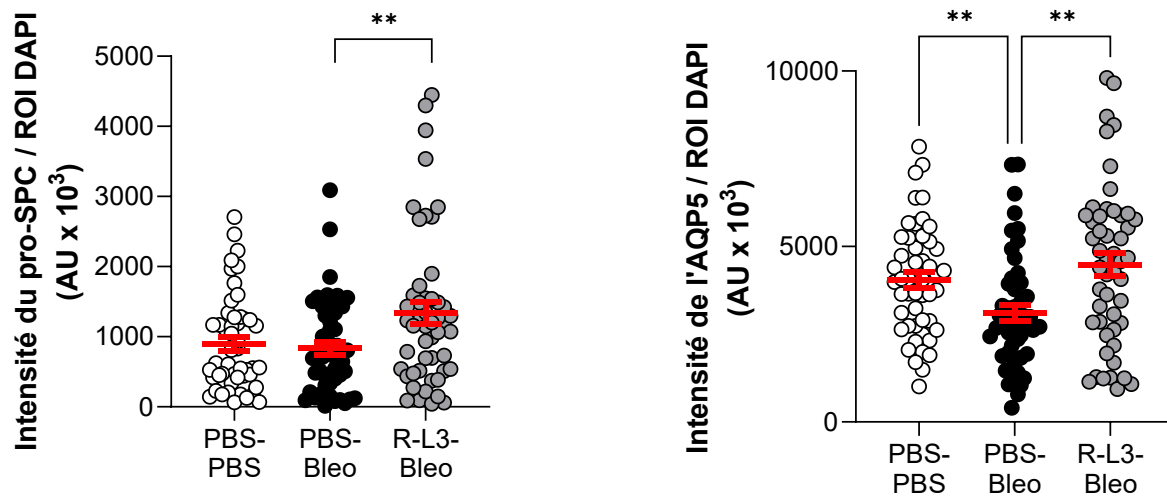
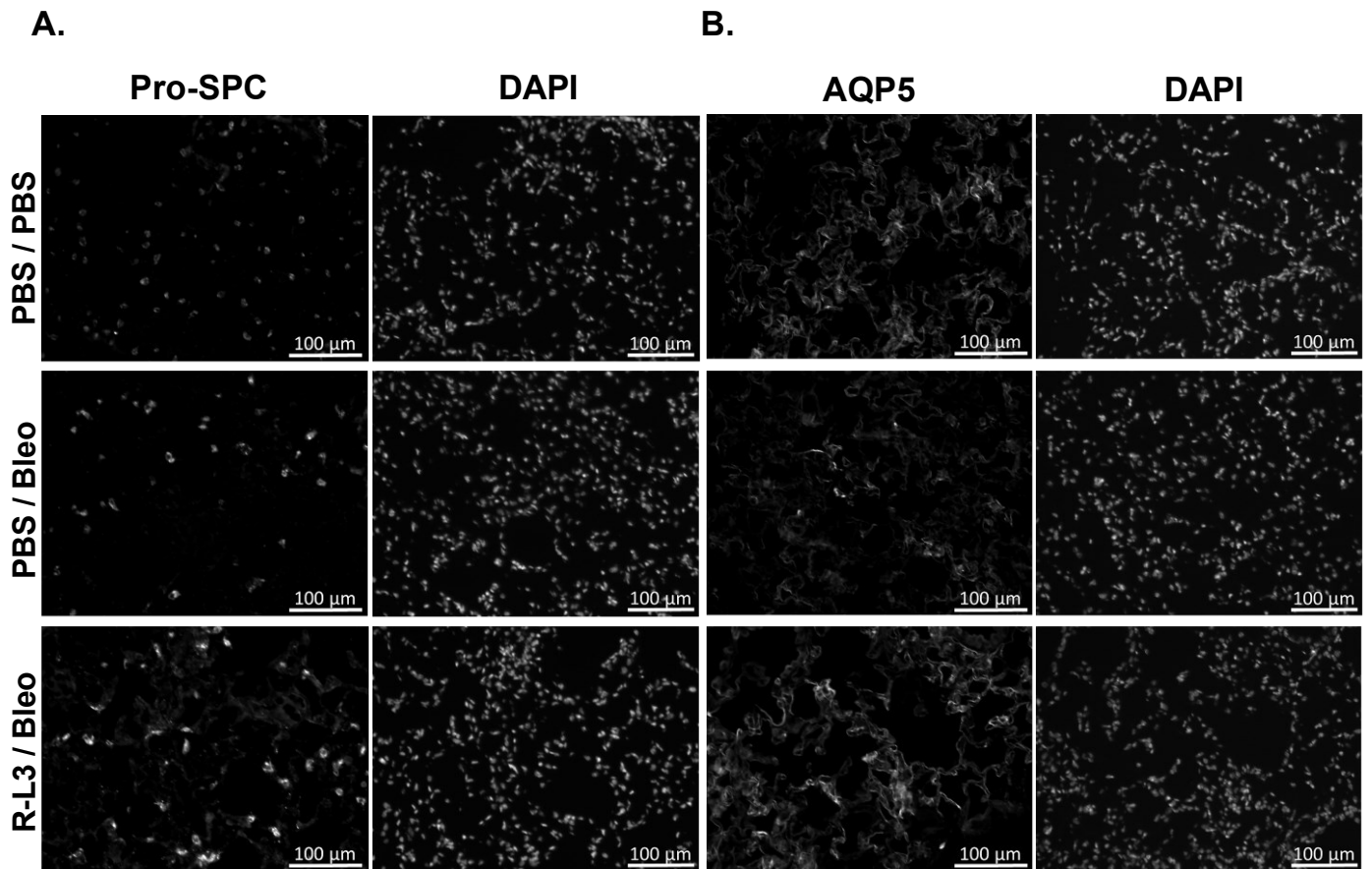


Figure 33. – Impact de l'activation de KvLQT1 sur l'intégrité de l'épithélium alvéolaire observée par marquage des ATI et ATII sur coupes de tissus de poumons de souris

Les souris sauvages (WT, n=7-9) ont été instillées ou non avec la bléomycine (3U/kg, 50 μ l, i.n) au jour initial puis un groupe expérimental a été traité avec un activateur du canal KvLQT1, le R-L3 (4 μ M, 50 μ l, i.n aux 2 jours). À jour 7, nous avons fixé les tissus et pratiqués un immunomarquage de pro-SPC (A, n=50, marqueur d'ATII) et de l'AQP5 (B, n=50, marqueur d'ATI). Les noyaux cellulaires sont marqués avec le DAPI. La quantification de l'intensité de marquage a été analysée par le logiciel ICY. Chaque point représente une souris et les valeurs sont présentées par moyenne \pm SEM. Des tests Kruskal-Wallis (test de normalité Agostino/Pearson normality : négatif) a été pratiqué pour A et One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) a été pratiqué pour B. **p < 0.01

Impact de l'activation du KvLQT1 sur la mesure de la vitesse de réparation épithéliale sur monocouches de cellules alvéolaires (ATII) issues de poumons de rats

La réparation épithéliale sur monocouche de cellules alvéolaires (ATII) (**Figure 34**) a été évaluée en présence de doses croissantes de bléomycine (25mU et 50mU) et exposées ou non (veh) de R-L3 (4 μ M). Nos résultats montrent que la bléomycine induit un effet délétère sur la vitesse de réparation, et ce, de manière dose-dépendante. De façon intéressante, l'activation du KvLQT1, par le R-L3, a permis de renverser cet effet néfaste et même d'améliorer, dans le cas de la condition R-L3/Bléo 25mU, la vitesse de réparation a un niveau légèrement supérieur au contrôle (veh).

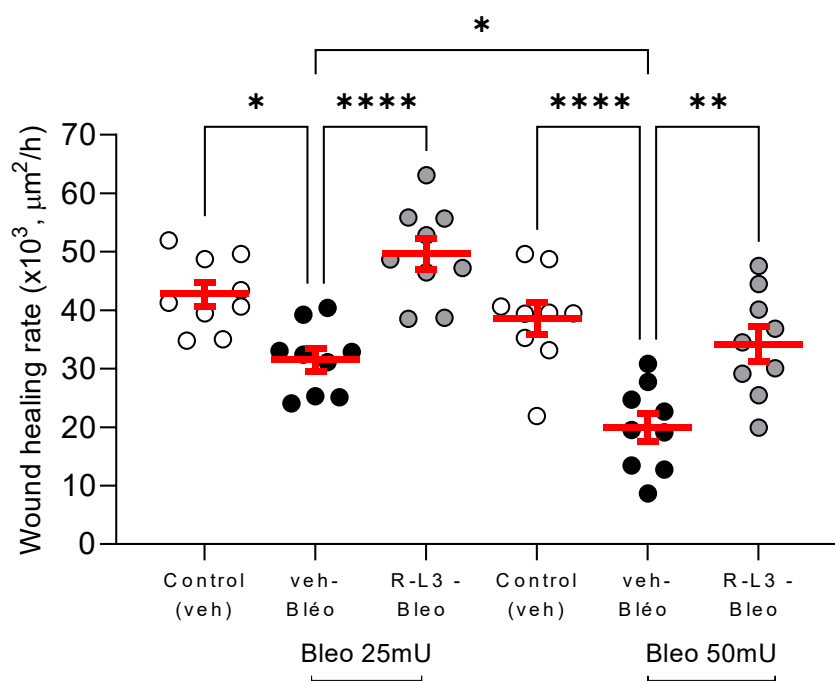


Figure 34. – Vitesse de réparation de monocouches de cellules alvéolaires de rats traités avec l'activateur de KvLQT1 en présence de bléomycine.

Les monocouches de cellules alvéolaires issues de poumons de rats (n=9) ont été lésées par plaies mécaniques effectuées à jour 4 de culture cellulaire primaire. Les photos des monocouches ont été prises à t=0h et t=24h afin de mesurer l'aire de réparation et ainsi calculer la vitesse de réparation. Un point correspond à la moyenne de plusieurs plaies (4 plaies / puits minimum) tirées de la même expérience. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM. Un test One-way anova (test de normalité Agostino/Pearson normality : positif) a été pratiqué. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001

Chapitre 8 – Discussion

Les travaux effectués dans le cadre de mon projet de doctorat ont permis de mieux comprendre les processus impliqués dans la résolution du SDRA grâce à des modèles complémentaires de lésions pulmonaires aiguës et diverses approches à visée thérapeutique. Dans un premier temps, nous avons montré que le glucocorticoïde, dexaméthasone, est incapable de résoudre les paramètres de la phase aiguë exsudative du SDRA dans le modèle *in vivo* de dommages induits par la bléomycine, probablement dû à son effet néfaste sur la réparation épithéliale. Dans un second temps, nous avons mis en évidence que le niveau d'expression d'ENaC n'influence pas la gravité des paramètres associés au SDRA dans le modèle de bléomycine. Ces études nous ont permis de réaliser que cibler un seul des paramètres n'est pas suffisant pour permettre la résolution du SDRA, qui dépend de trois mécanismes complémentaires soit : la diminution de la réaction inflammatoire, la réabsorption de l'œdème pulmonaire et la capacité de régénérer un épithélium alvéolaire intègre et fonctionnel.

Considérant les études antérieures du laboratoire sur l'implication des canaux K^+ dans les mécanismes cellulaires de clairance liquidienne et de réparation épithéliale *in vitro*, nous avons alors considéré le canal KvLQT1, comme une cible potentielle pour la résolution des paramètres du SDRA. De ce fait, nous avons observé que l'activation du KvLQT1, par un agent pharmacologique nommé R-L3, favorisait la résolution de l'œdème pulmonaire induit par la thiourée, par l'augmentation secondaire de l'expression alvéolaire protéique d'AQP5, de la pompe Na^+/K^+ -ATPase et d'ENaC, soit des protéines clefs de la résorption liquidienne. Basé sur la fonction du canal KvLQT1 dans les processus de clairance liquidienne et de réparation alvéolaire, nous avons émis l'hypothèse que l'extinction du canal KvLQT1 pourrait aggraver les symptômes associés aux lésions pulmonaires induites et qu'inversement son activation pourrait améliorer la résolution de la phase aiguë du SDRA. Nos données ont en effet confirmé une aggravation de certains paramètres, principalement la fonction pulmonaire telle que la compliance, suite à la perte du KvLQT1. De façon surprenante, son activation a permis de diminuer significativement la réponse inflammatoire et favoriser les processus de réparation dans le modèle de bléomycine, sans toutefois améliorer la fonction respiratoire.

En résumé, ces évidences ont permis de répondre à notre hypothèse de recherche en montrant que cibler un seul paramètre du SDRA n'est pas suffisant pour permettre sa résolution et que des approches complémentaires permettant de favoriser la restauration de l'intégrité fonctionnelle alvéolaire sont nécessaires.

8.1 Stratégies de résolution du SDRA et défis rencontrés

8.1.1 Résolution du SDRA par l'atténuation de la réponse inflammatoire grâce au dexaméthasone (DEX)

La réponse inflammatoire est l'un des déterminants critiques de la phase aiguë du SDRA et son atténuation par l'usage de différentes stratégies anti-inflammatoires, dont les corticostéroïdes, a été considérée auparavant. Nous avons observé que l'injection intrapéritonéale (i.p.) quotidienne de DEX chez des souris challengées à la bléomycine a bel et bien produit un effet anti-inflammatoire en diminuant les niveaux de TNF- α mesurés dans les BALs. Cet effet est significatif durant la période d'initiation de la réponse inflammatoire à J3, bien que cette tendance soit toujours notable à J7. De plus, il semble que la diminution en TNF- α n'ait pas eu d'influence sur la migration des neutrophiles et la population des macrophages alvéolaires. Une étude a révélé que malgré des doses croissantes de DEX chez les souris LPS (avec atteinte pulmonaire directe par nébulisation), le comptage de neutrophiles et les niveaux de MIP-2 dans les BALs étaient demeurés constants (292). Il est intéressant de noter que les souris ayant reçu les plus fortes doses de dexaméthasone ont présenté une augmentation de l'expression *in vivo* de NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression de diverses protéines, incluant les protéines de l'inflammation. Il semble donc que le potentiel anti-inflammatoire soit dépendant de la dose administrée (292). Il a également été démontré que le DEX agirait comme un potentiel inhibiteur de l'apoptose des neutrophiles (293). Ces deux constats pourraient expliquer pourquoi le DEX n'a pas réussi à réduire la population de neutrophiles dans les poumons des souris bléomycine dans nos expérimentations.

Une seconde étude (294) a permis de clarifier le potentiel d'efficacité du DEX dans un modèle d'atteinte directe par le LPS. La DEX encapsulée en nanoparticules, une méthode favorisant sa distribution au site localement enflammé, a complètement aboli les niveaux pulmonaires d'IL-6,

réduit le recrutement leucocytaire et l'épaississement au niveau péribronchique en comparaison à la même dose de DEX administrée en libre format. Dans ce même ordre d'idée, il est intéressant de constater que seule l'injection intratrachéale, et non l'injection i.p. de DEX, dans un modèle de dommages induits à l'acide oléique, a permis de diminuer le nombre de cellules immunitaires totales et de leucocytes dans les BALs (295). Le fait que la DEX soit en contact direct avec l'épithélium alvéolaire, en plus de ne pas subir de métabolisation par l'organisme, augmente peut-être l'efficacité de ce corticostéroïde. Ces études nous portent à croire que notre administration par voie i.p. n'a pas permis d'obtenir l'activité anti-inflammatoire optimale du DEX.

Les autres paramètres associés au SDRA, tels que la présence d'un œdème pulmonaire et des protéines contenues dans les BALs, n'ont pas connu d'amélioration à la suite des traitements au DEX chez nos souris bléomycine. Cela laisse entendre que les dommages à la barrière alvéolo-capillaire étaient trop importants et/ou que la fonction de l'épithélium était gravement altérée. Dagenais *et al.* ont préalablement décrit que le DEX avait la capacité de renverser l'effet néfaste du TNF- α sur l'expression d'ENaC *in vitro* en augmentant son expression et sa fonction, et secondairement en augmentant la capacité d'absorption liquidienne de l'épithélium alvéolaire en culture primaire (296). Ces observations n'ont malheureusement pas pu se transposer au modèle *in vivo* de bléomycine. Étant donné la diminution du TNF- α suite au traitement au DEX, nous aurions pu croire que le canal ENaC aurait pu récupérer son niveau d'activité fonctionnelle et favoriser la résorption de l'œdème. Toutefois, les souris traitées au DEX, dans notre modèle expérimental de lésions pulmonaires induites par la bléomycine, ne présentaient pas de diminution de l'indice d'œdème pulmonaire. Nous avons également exclu que la bléomycine exerce une influence directe sur la fonction d'ENaC puisque le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires exposées à la bléomycine était inchangé. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette absence d'effet bénéfique était probablement due aux dommages cellulaires persistants dans le modèle bléomycine, contrairement au modèle *in vitro*.

Nous avons en effet observé une aggravation du score de dommages pulmonaires chez les souris bléomycine ayant reçu le DEX. Nous nous sommes aperçus que ce glucocorticoïde avait un effet

délétère sur la capacité de réparation épithéliale *in vitro* et entraînait une diminution de l'expression des intégrines $\beta 3$ et $\beta 6$, protéines clefs des processus de réparation. Dans un autre modèle murin, il a été montré qu'en dépit de l'effet bénéfique du DEX sur la réponse inflammatoire de rats soumis à une injection d'acide oléique (295), l'examen histologique démontrait des dommages pulmonaires persistants avec des régions de congestion vasculaire et d'hémorragies et la présence d'œdème, semblable à nos observations. Nous pourrions penser que des doses élevées et répétitives de DEX soient responsables de l'effet néfaste sur le processus de réparation épithéliale, toutefois, dans cette dernière étude ainsi que la nôtre, une très faible concentration de DEX a été administrée. Ces observations supportent l'hypothèse que la DEX puisse avoir une implication cellulaire ou moléculaire directe sur les processus de réparation épithéliale tel que nous l'avons observé. Bien sûr, plusieurs aspects de la méthode expérimentale (modèle SDRA 24 h vs 7 jours, insulte directe vs indirecte, voie d'administration du DEX) pourraient être en cause dans la disparité entre ces observations et certaines données de la littérature.

L'étude de Headley *et al.* (297) et la nôtre ont plusieurs similitudes au niveau de la méthodologie, à l'exception de l'usage d'une souche génétique (C57BL/6J) présentant une sensibilité accrue à la bléomycine et l'application à raison de deux fois par semaine de la bléomycine pour soutenir un modèle de développement de fibrose dans l'étude de Headley. Plusieurs divergences dans les réponses ont été observées, comparées aux nôtres. Effectivement, la réponse inflammatoire (niveaux de neutrophiles, de cytokine TNF- α , MCP-1 TGF- $\beta 1$ et d'activité myéloperoxydase), l'apoptose, l'activité LDH (lié aux dommages cellulaires) et la sévérité de l'alvéolite observée sur les coupes histologiques à J7 y sont améliorées par l'administration de DEX, contrairement à nos observations.

Dans la foulée sur la recherche de nouvelles stratégies anti-inflammatoires contre l'infection à COVID-19, j'ai également participé à la conception et la réalisation d'expériences dont l'objectif était de tester de nouveaux peptides antagonistes des récepteurs IL-1 et IL-6 dans le modèle murin de bléomycine (article en préparation pour soumission au cours de l'automne 2023). À la différence de leurs homologues commerciaux à large spectre ciblant les récepteurs IL-6 et IL-1 β , ces composés ont la capacité de préserver l'immunovigilance par les voies de signalisation NF-kB

et Akt (protéine kinase B). De plus, ces peptides avaient préalablement démontré des effets cytoprotecteurs avec une préservation de l'intégrité alvéolaire dans un modèle de nouveau-nés prématurés soumis à un stimulus inflammatoire, établi par nos collaborateurs (298). Malheureusement, tant les composés commerciaux que les nouveaux peptides anti-récepteurs IL-6 et IL-1 β administrés par voie intrapéritonéale n'ont réussi à améliorer aucun des paramètres du SDRA dans le modèle de bléomycine (**Figure 35**).

Ainsi, ces deux stratégies anti-inflammatoires, soit ciblée (sur les récepteurs) ou à large spectre (avec le corticostéroïde DEX), ont échoué à favoriser la résolution des paramètres de SDRA dans un modèle de lésions aiguës.

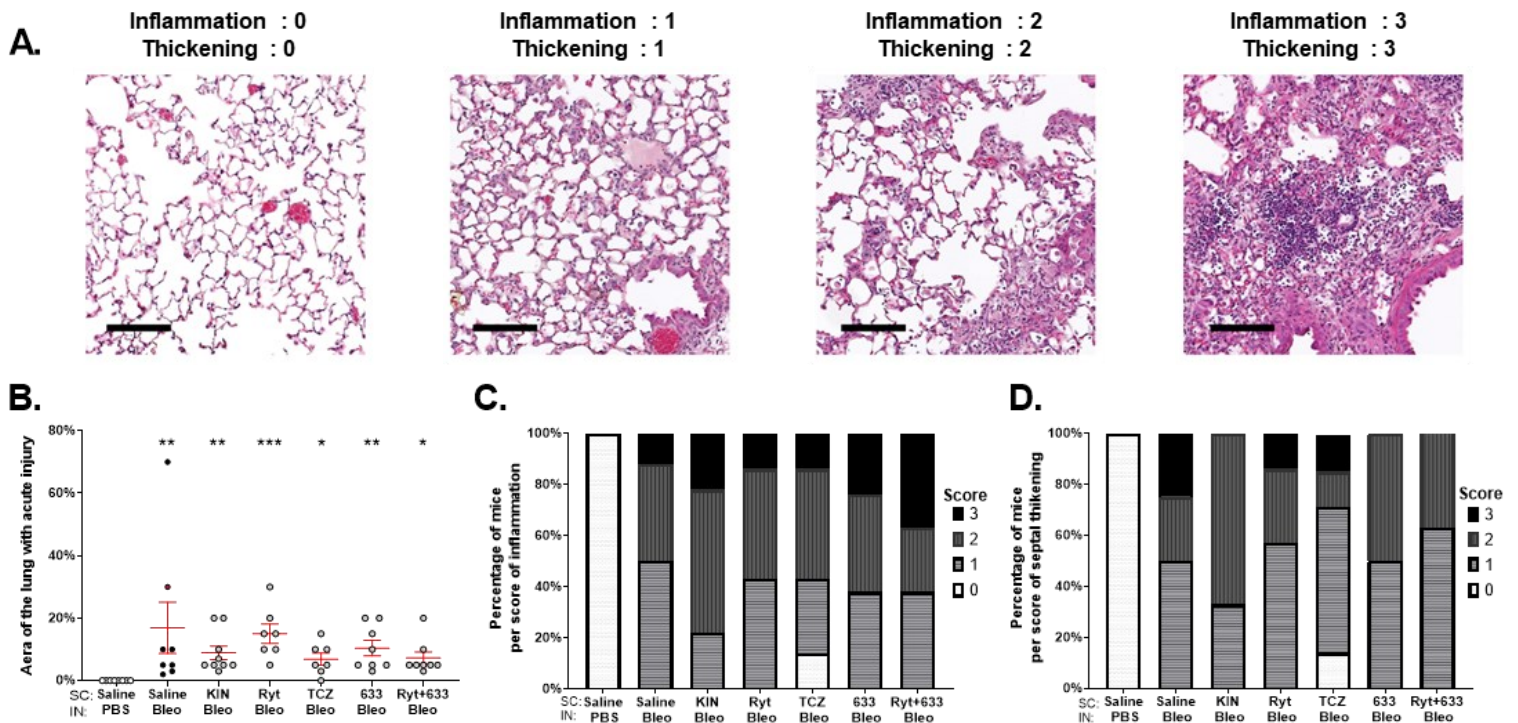


Figure 35. – Évaluation des dommages épithéliaux, de la sévérité de l'inflammation et de l'épaississement septal sur coupes histologiques de poumons de souris challengées à la bléomycine (J7) et ayant été traitées avec les composés anti-récepteurs IL-6 et IL-1 β .

Limitations et perspectives sur la modulation du SDRA par la modulation de la réponse inflammatoire

Il semble que la plus grande limitation de nos études réside dans la voie d'administration des traitements anti-inflammatoires qui auraient possiblement produit des effets différents si administrés aux poumons pour agir directement sur l'épithélium alvéolaire. D'autre part, nous aurions pu tester d'autres doses du DEX puisque cela semble être un facteur de discordances autant sur les résultats *in vivo* que dans les études de phase clinique. Nos tentatives par la modulation avec un corticoïde à large spectre d'action ou avec des anti-récepteurs d'IL-6 et IL-1 β spécifique n'ont pas permis de résoudre les paramètres du SDRA dans notre modèle de bléomycine. Il est alors nécessaire de mieux comprendre les mécanismes initiateurs, et de résolution, de la réaction inflammatoire afin de trouver une cible clefs qui pourrait en plus, préserver l'intégrité et la fonction de l'épithélium alvéolaire, puisqu'il s'agit d'une limitation critique dans la résolution du SDRA.

8.1.2 Résolution du SDRA par l'amélioration de la clairance liquidienne grâce à la fonction d'ENaC

Notre deuxième étude nous a permis de mettre en évidence qu'un niveau d'expression réduit d'ENaC, comparé à une expression normal de ce canal, ne modifie pas la gravité des dommages induits par la bléomycine. Les souris transgéniques α ENaC(-/-)Tg+, en condition bléomycine, présentaient initialement (J3) une augmentation des niveaux de TNF- α et des protéines contenues dans les BALs, comparés aux souris sauvages (WT). Cependant, la réponse inflammatoire, les dommages et l'œdème pulmonaire se rééquilibrent à J7 et l'ensemble des paramètres étaient similaires entre les souris Tg et WT. Ces résultats indiquent qu'une pleine expression d'ENaC n'est pas suffisante pour contrecarrer l'effet des dommages sévères induits dans un modèle de bléomycine. Par contre, lorsque les souris sont soumises à une exposition à la thiourée, modèle de développement exclusif de l'œdème pulmonaire (en absence de dommage alvéolaire), on s'aperçoit que les souris WT, au contraire des souris α ENaC(-/-)Tg+ avec expression réduite d'ENaC, présentent une meilleure résolution de l'œdème.

Les résultats que nous avons obtenus en contexte de thiourée sont concordants avec l'étude d'Egli *et al.* (299) rapportant qu'en condition thiourée ou d'hypoxie, l'œdème pulmonaire des souris $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}^+$ était aggravée, et ce même au pic de l'atteinte. Il a été ainsi proposé que le ralentissement de la résolution soit probablement dû à une clairance liquidienne affectée. Ainsi, l'activité partielle du transport Na^+ par ENaC n'affecterait pas la physiologie respiratoire en condition basale, mais affecterait la capacité à résorber l'œdème dans le modèle de thiourée.

L'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique (amiloride) a aussi fait partie des stratégies permettant d'évaluer l'implication du canal ENaC dans les processus de clairance liquidienne. Une étude de Chen *et al.* (300) a démontré que le virus influenza A diminuait l'expression d'ENaC *in vitro* (A11) ainsi que le flux ionique, sans toutefois entraîner de détérioration de la perméabilité épithéliale. Contrairement à l'influenza, nos résultats montraient que la bléomycine ne semblait pas avoir d'impact direct sur la fonction du canal ENaC. Dans un modèle *in vivo* d'infection par l'influenza A combinée au développement d'un œdème par instillation répétée de salin, l'inhibition d'ENaC par l'amiloride n'a pas aggravé l'œdème pulmonaire ou réduit la capacité de clairance liquidienne (300). Au contraire, un modèle direct d'ALI par instillation intratrachéale de LPS, a démontré que la progression de son œdème pulmonaire est parallèle à la réduction de l'expression de toutes les sous-unités du canal ENaC (301). Finalement, il est important de noter que le canal ENaC est directement régulé par plusieurs facteurs de son environnement (stress oxydatif, perturbations mécaniques, médiateurs inflammatoires) et donc ces modèles *in vitro* et *in vivo* ne reflètent pas la complexité d'un poumon en condition de SDRA.

Limitations et perspective sur la modulation d'ENaC dans le cadre de la résolution du SDRA

La nécropsie pulmonaire des patients décédés à la suite d'un SDRA dévoile une diminution de l'expression d'ENaC (280). De façon pertinente, des résultats préliminaires du laboratoire ont démontré une diminution de l'expression d'ENaC chez des biopsies de patients donneurs développant une dysfonction primaire du greffon à la suite d'une transplantation pulmonaire, un état avec une ressemblance étroite au SDRA. Généralement, les patients subissent donc une combinaison de lésions épithéliales sévères et d'une diminution de l'expression d'ENaC ce qui ne semble pas être le cas des souris bléomycine. Il faudrait donc se demander si le modèle

expérimental de bléomycine est le plus optimal dans le cas de l'étude du rôle d'ENaC, car il ne permet pas de mimer toutes les observations issues des patients SDRA. Mise à part l'amélioration de la clairance liquidienne (telle qu'observée dans le modèle thio), une plus haute expression d'ENaC ne semble pas aider pour la résolution des autres paramètres du SDRA. Seule la thérapie génique par transfection de combinée de $\alpha 1\text{Na/K-ATPse-ENaC}$ a permis de démontrer des améliorations de l'état général des cochons infectés avec le LPS (302), mais le rôle spécifique d'ENaC dans ces expérimentations restait discutable.

Nous présumons que la capacité du canal ENaC à faciliter la résorption de l'œdème pulmonaire en condition de SDRA est limitée en raison des lésions épithéliales persistantes, altérant l'intégrité et la fonction de l'épithélium alvéolaire. Le phénomène d'apoptose et autres signaux pro-inflammatoires sont responsables de la dégradation des jonctions cellulaires. Cette perte de l'intégrité et de la polarité cellulaire affecte la fonction des cellules saines résiduelles. Si aucune réparation épithéliale n'a lieu, l'infiltration de liquide vers la lumière alvéolaire persiste et nous pouvons postuler que la présence de canaux ENaC fonctionnels ne sera pas suffisante pour résorber l'œdème pulmonaire. Des stratégies combinant des effets bénéfiques sur la clairance liquidienne et proréparatrice constitueraient donc une voie intéressante.

8.1.3 Nouvelle approche de la résolution du SDRA par la modulation des canaux K^+

8.1.3.1 Impact de la modulation des canaux K^+ sur le bilan métabolique sanguin, le phénotype pulmonaire et la mécanique respiratoire en condition physiologique

Nous savons que le canal KvLQT1 est impliqué dans plusieurs fonctions essentielles de divers types d'épithelia (voir section 1.2.2.3). Il a été établi qu'en condition basale, les souris KO-KvLQT1 présentent des défauts métaboliques tels qu'une anémie macrocytaire, un défaut d'absorption intestinale, la perte fécale de Na^+ et K^+ et une sensibilité accrue à l'insuline (303,304). Nous avons donc jugé d'intérêt l'analyse des paramètres sanguins des souris déficientes pour KvLQT1. Nos données ne démontrent aucune modification importante des gaz, électrolytes et métabolites sanguins. Comme nous, le groupe du Dr. Pfeifer (qui nous a gracieusement fourni les couples reproducteurs initiaux) avait également rapporté une absence de changement de concentrations

en K^+ et Na^+ plasmique avec une diète contrôlée (303). Toutefois, il a observé un poids similaire entre les souris KO-KvLQT1 et WT bien que la prise de nourriture des souris KO-KvLQT1 était plus élevée que chez les WT (303). Nous avons plutôt remarqué qu'au cours de leur développement (semaines 3 à 6), la croissance des souris KO-KvLQT1 est retardée par rapport aux WT. Lors de nos expérimentations, les souris KO-KvLQT1 adultes présentent habituellement un poids moyen inférieur à celui des souris WT. Ce phénomène pourrait s'expliquer par leur dépense énergétique accrue causée par leur hyperactivité (phénotype de Shaker-Waltzer).

Nos études ont pour la première fois décrit le phénotype pulmonaire des souris déficientes pour le canal KvLQT1. Ces dernières ne montrent, à l'âge adulte du moins, aucun défaut au niveau de la structure alvéolaire et pas d'atteinte notable au niveau de la fonction respiratoire mise à part une légère diminution de la compliance pulmonaire parallèle à une faible hausse de la résistance et de l'élastance pulmonaire. Contrairement aux souris KO KvLQT1, un modèle de souris mutantes KO-*Kcnj13* (codant pour le canal K^+ Kir7.1) (305) présentent des défauts à l'état basal. En effet, durant l'embryogenèse, ces souriceaux ont une croissance ralentie, par rapport aux souris WT et un poids statistiquement plus faible à la naissance. Lors du passage du stade canaliculaire à sacculaire, les poumons des souris KO-*Kcnj13* affichent, sur les coupes histologiques, un espace alvéolaire plus restreint et des septas plus épais. Malgré cela, leur mortalité dans les 12 premières heures est due à une malformation crâniofaciale et non à une détresse respiratoire. Bien que nous n'ayons pas étudié avec précision la période d'embryogenèse des souris KO-KvLQT1, il ne semble pas y avoir d'implication du KvLQT1 dans le développement embryonnaire et dans la fonction respiratoire puisqu'aucun de ces défauts n'est remarquable à l'âge adulte.

Ces phénotypes pourraient s'expliquer, en partie, par l'implication distincte des canaux KvLQT1 et *Kcnj13* dans le métabolisme du surfactant. Aucun changement dans l'expression du pro-SPC à la naissance entre les souris KO-*Kcnj13* et WT n'a été constaté. Pour notre part, une augmentation de l'expression de pro-SPC est notable à l'âge adulte chez les souris KO-KvLQT1. De façon similaire, une hausse de pro-SPC a été observée chez des souris triples-mutantes pour les canaux K^+ Trek-1/Trek-2/TRAAK (TTT) (306). Le pro-SPC est considéré comme un marqueur des cellules ATII et donc sa variation d'expression pourrait représenter un changement au niveau de la proportion d'ATII dans l'épithélium. Mis à part le processus de réparation épithéliale qui nécessite

la différenciation des ATII (et qui n'est au demeurant pas amélioré dans le cas des cellules KO-KvLQT1), le phénomène adaptatif nécessitant davantage d'ATII n'est pas évident. De plus, aucune modification de l'expression de ZO-1 n'a été observée entre les poumons de souris WT et triples mutantes TTT ce qui sous-entend que l'épithélium est bel et bien intègre et ne nécessite pas de réparation épithéliale en condition physiologique (306). En outre, l'augmentation de l'expression du pro-SPC observée dans notre étude aurait pu conduire à une amélioration de la compliance pulmonaire, ce qui n'est pas le cas. Le pro-SPC correspond à la forme précurseur du surfactant de type C et il pourrait y avoir une altération dans son processus de maturation ou de sécrétion vers la lumière alvéolaire, qui expliquerait son inefficacité. De façon pertinente, l'équipe de Dr Schwingshackl a constaté une diminution du marqueur de la protéine transmembranaire ABCA3, une protéine de transport spécifique aux SP-C et SP-B, au niveau des corps lamellaires des poumons de souris mutantes TTT (306). Ceci supporterait notre hypothèse d'un défaut du métabolisme du surfactant, qui serait à l'origine de la compartimentation ou de l'accumulation du pro-SPC au niveau interstitiel. Il faudra cependant effectuer des études plus poussées afin de comprendre comment les canaux K^+ (KvLQT1 ou K_2P) pourraient être impliqués dans le métabolisme du surfactant.

Nos données montrent que les cellules issues des poumons de souris KO-KvLQT1 présentent une diminution d'environ 50% du courant total potassique, démontrant l'implication majeure de ce canal dans la conductance K^+ , bien que d'autres canaux contribuent également à la portion restante du courant basal. La perte de fonction de KvLQT1 pourrait donc être compensée par la fonction d'autres canaux K^+ . Il a notamment été démontré que les souris déficientes pour Kv1.3 présentent une compensation par les canaux KCa3.1 au niveau des lymphocytes T (307). Ainsi, le phénotype et la fonction pulmonaire auraient pu être largement plus affectés si l'inhibition de plusieurs canaux K^+ avait été combinée. Compte tenu de la contribution significative des canaux K^+ K_{ATP} au courant potassique alvéolaire (177), l'étude de leur fonction *in vivo*, en complément de celle des canaux KvLQT1 serait intéressante. Malheureusement, les souriceaux KO pour la sous unité Kir6.1 des canaux K^+ K_{ATP} ne sont pas viables. Nous avons donc initié des expériences préliminaires avec administration de siRNA, ciblant un ou plusieurs canaux K^+ (KvLQT1, K_{ATP}). Il

aurait également été pertinent de faire un criblage sur l'expression génique des autres canaux K^+ recensés au niveau alvéolaire pour savoir si l'un d'eux joue un rôle compensatoire.

8.1.3.2 Modulation des canaux K^+ sur le bilan métabolique sanguin, le phénotype pulmonaire et la mécanique respiratoire en condition pathologique

La mortalité chez les patients SDRA est le plus souvent causée par une défaillance multiorgane progressive plutôt que par une défaillance respiratoire (308). La prévalence d'une dysfonction de nature cardiovasculaire, hématologique, rénale ou hépatique est associée à la sévérité du SDRA et à son étiologie. Le risque de mortalité est quant à lui corrélé avec la sévérité du SDRA, mais également à la dysfonction rénale, hépatique et à un état d'acidose (308). Nous avons donc jugé pertinent de procéder à l'analyse sanguine des animaux exposés à la bléomycine afin de savoir si des dommages extrapulmonaires auraient pu s'y développer.

Nos résultats de mesures au EPOC montrent que le bilan métabolique est similaire entre les souris KO-KvLQT1 et WT, sept jours suivant l'exposition à la bléomycine, sauf pour les niveaux de lactate qui sont plus élevés chez les souris KO-KvLQT1. Une hausse de lactate sanguin est généralement associée à une hypoxie tissulaire, qui corrèle avec la dysfonction respiratoire plus prononcée des souris KO-KvLQT1. Le niveau de glucose sanguin des souris bléomycine (WT ou KO-KvLQT1) est diminué comparativement aux souris contrôles respectives (WT/PBS et KO/PBS), mais cela pourrait être dû à la réduction de la prise en nourriture. Nous avons aussi noté que les souris WT bléomycine perdaient une masse plus importante comparativement aux souris KO bléomycine. La bléomycine s'attaque à la décomposition des graisses et de la masse musculaire (309). Les souris KO étant plus maigres que les souris WT en condition basale, leur masse musculaire et graisseuse disponible est donc beaucoup plus faible, ce qui pourrait expliquer leur variation de poids relative moins drastique en condition bléomycine que chez les souris WT.

Au niveau pulmonaire, autant chez les animaux WT que KO-KvLQT1, la bléomycine a entraîné une augmentation du pCO_2 , qui relate un mauvais échange gazeux et une atteinte de la fonction respiratoire. Les bicarbonates sont également augmentés, probablement dans le but de tamponner cet effet. Finalement, le PO_2 est demeuré élevé chez les souris soumises à la bléomycine. Nos observations sur la hausse de la pCO_2 sont similaires à celle recueillie dans la

littérature dans des modèles de bléomycine chez le rat (310) ou la souris (311). Dans les deux cas, il y a eu toutefois, en parallèle, une diminution des niveaux de pO_2 , ce que nous n'avons pas observé dans nos expériences. Chez les rats bléomycine, une étude a démontré une diminution du pH sanguin, ce que nous n'avons pas observé sur notre cohorte puisque nous avons plutôt observé une compensation par l'augmentation des bicarbonates sanguins afin de rétablir le pH, tel que démontré par l'étude chez la souris (311). Nos valeurs de PO_2 qui ne correspondent pas aux changements rapportés dans la littérature pourraient être dues au compartiment dans laquelle nous avons prélevé le sang. En effet, nos mesures ont été effectuées à partir du sang veineux tandis que les autres équipes ont analysé du sang artériel (310,311). Le sang artériel est riche en oxygène et seulement une infime partie a été distribuée vers les tissus. Au contraire, le sang veineux est pauvre en O_2 , car sa distribution tissulaire est complétée. Notre hypothèse est donc que l'oxygène n'a pas été adéquatement distribué aux tissus et que la saturation de l'hémoglobine en oxygène demeure élevée ou que la perte de masse engendrée par la bléomycine a diminué la taille du compartiment tissulaire ayant pu recevoir cette charge d' O_2 . Aucune autre mesure des composantes sanguines n'a été modifiée par l'exposition à la bléomycine et donc nous ne soupçonnons pas d'autres défauts que celui de l'atteinte pulmonaire chez les souris bléomycine au jour 7. L'activation des canaux KvLQT1 par des traitements chroniques avec le R-L3, n'a pas eu d'impact sur l'état métabolique des souris.

Au niveau de la fonction pulmonaire, la bléomycine a provoqué une diminution de la compliance pulmonaire et une augmentation de l'élastance et de la résistance chez les souris WT bléomycine. Nos résultats sont en accord avec ceux de deux études se servant également d'un modèle murin de bléomycine ainsi que de l'appareil FlexiVent pour la collecte des données (312,313). Chez les souris KO-KvLQT1 bléomycine, nous observons un décalage de la courbe PV, de façon plus marquée chez les KO-KvLQT1 que WT. Une observation semblable fut décrite chez les souris KO-Trek-1 (284) ou triples mutantes TTT (306) pour lesquelles l'exposition à l'hyperoxie+ventilation mécanique a engendré une réduction du niveau de compliance statique. À l'inverse, l'activation de TREK-1 a permis de renverser l'effet délétère de l'hyperoxie sur la compliance pulmonaire (290). Au contraire, nos traitements avec le R-L3 n'ont pas permis d'améliorer la capacité respiratoire chez nos souris WT bléomycine. Le fait que le canal TREK-1 soit considéré comme un

canal mécanoréceptif, ce qui n'est pas le cas du KvLQT1, pourrait expliquer que son activité soit davantage liée à la modulation de la capacité élastique du poumon.

Limitations de notre étude et perspectives émergentes sur la compréhension de la défaillance respiratoire et multisystémique

Notre modèle de bléomycine consiste en une atteinte pulmonaire directe, et nous savons que l'origine de la cause primaire peut donner lieu à des divergences au niveau des lésions comparativement à celles secondaires à une atteinte extrapulmonaire (voir section 1.4.6). Il a bel et bien été décrit, à l'aide de plusieurs modèles expérimentaux, qu'une atteinte indirecte peut engendrer des dommages pulmonaires. En revanche, nous n'avons pas été en mesure d'évaluer si des signaux pro-inflammatoires ou issus des dommages cellulaires engendrés par l'administration pulmonaire de bléomycine précisément, sont capables de rejoindre la circulation sanguine et affecter ultérieurement d'autres tissus ou si les lésions sont circonscrites au niveau du poumon seulement. Il se pourrait donc que la bléomycine ne soit pas un modèle expérimental approprié pour étudier l'atteinte multiorgane.

De plus, une trop courte durée d'expérimentation (J7) pourrait limiter l'observation de changements métaboliques ou respiratoires suite à la modulation du canal KvLQT1. En effet, des changements sur la mécanique respiratoire nécessitent des changements cellulaires/tissulaires encore plus importants. Malgré certaines améliorations apportées suite à l'activation du canal KvLQT1 par le R-L3 (sur la réponse inflammatoire et les dommages alvéolaires), le bénéfice observé semble trop faible pour changer la fonction pulmonaire. Nos observations auraient pu être différentes à J14 ou J21 lorsqu'un état de fibrose pourrait avoir davantage de répercussions sur les propriétés biophysiques du poumon, telles qu'énoncées dans l'étude de Shi *et al* (311).

8.1.3.3 Modulation des canaux K⁺ sur l'œdème pulmonaire

Dans le cadre du projet thiourée, les souris contrôles KO-KvLQT1 ont présenté un indice d'accumulation de liquide pulmonaire plus élevé que chez les souris WT à la suite d'une seule instillation de salin (volume total de 50 µl). La clairance liquidienne est une réponse cellulaire initiée rapidement et donc il aurait été intéressant de comprendre si les souris KO-KvLQT1 présentent un décalage physiologique de ce phénomène qui expliquerait cette observation. Cette

légère accumulation pourrait aussi être causée par une régulation à la baisse des protéines impliquées dans la résorption liquidienne. Pour ce faire, nous avons comparé l'expression d'ENaC dans des poumons de souris KO-KvLQT1 ou ayant reçu des modulateurs de KvLQT1 en condition basale. Nos données préliminaires démontrent que les souris KO-KvLQT1 ou ayant reçu un traitement de 24 h avec l'inhibiteur de KvLQT1 présentent une plus faible expression d' α -ENaC. À l'inverse, l'activation par le R-L3 semble augmenter son expression comparativement aux contrôles (**Figure 36**). Malgré ces changements au niveau cellulaire, la modulation pharmacologique des canaux K^+ n'a apporté aucun changement à l'indice du contenu liquidien en condition physiologique, contrairement au KO total de KvLQT1.

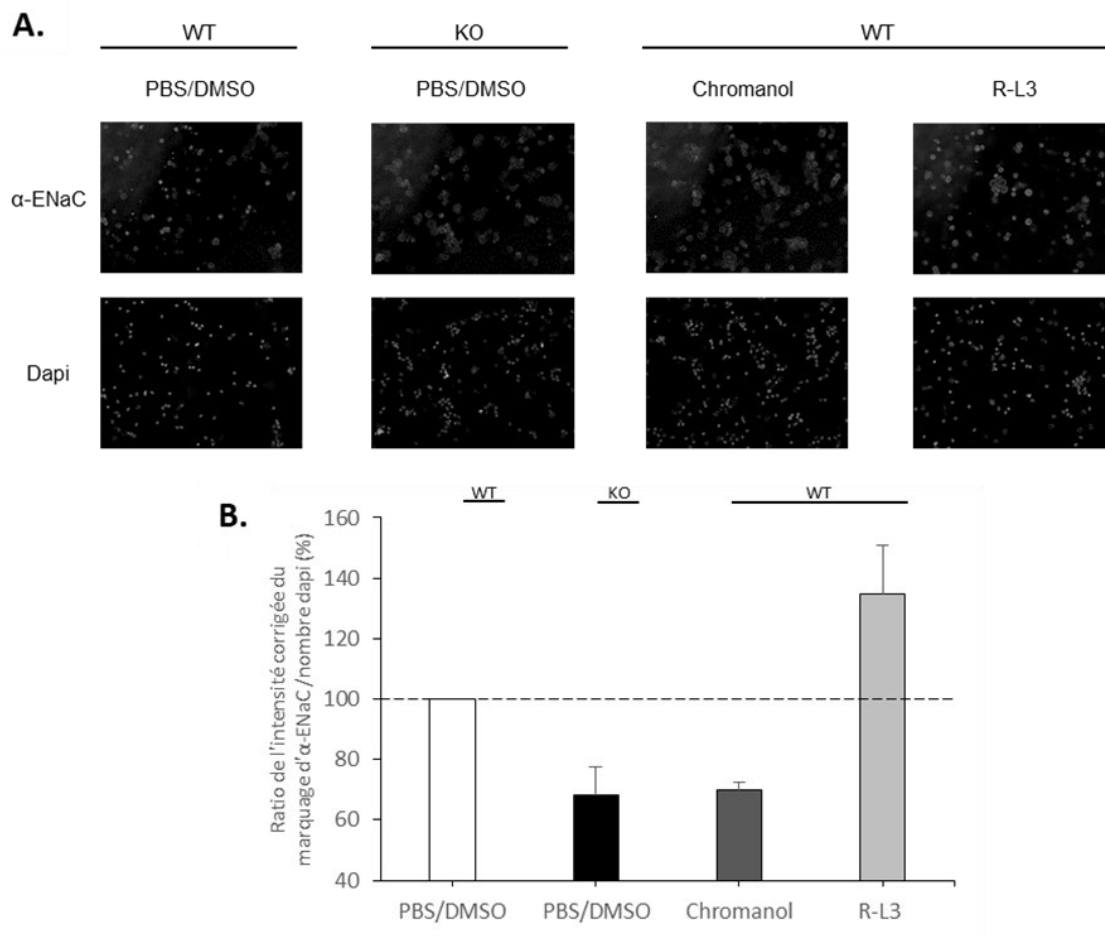


Figure 36. – Impact sur l'expression d' α -ENaC dans des cellules isolées de poumons de souris traités par des modulateurs pharmacologiques du canal KvLQT1, 24 h avant le prélèvement, en condition basale.

Or, dans le cadre du projet bléomycine, les animaux contrôles ont tous reçu une instillation de PBS (afin de mimer le protocole d'administration répétée du R-L3) aux deux jours sur une plus longue période (pour un volume total cumulé de 200 μ l). Malgré le volume instillé plus important, les niveaux du contenu liquidien pulmonaire sont demeurés similaires à ceux des souris contrôles de la série thiourée. De plus, il n'y a pas de différence entre les souris WT et KO-KvLQT1 contrôles. Cela nous laisse donc présumer que les souris WT et KO-KvLQT1 ont la même capacité de clairance liquidienne, qui pourrait s'expliquer par la mise en place d'un mécanisme compensatoire.

Dans un contexte de thiourée ou de bléomycine, les souris KO-KvLQT1 et WT développent un œdème pulmonaire de même ordre et indépendant de l'origine des altérations sur la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire. L'activation du KvLQT1 par le R-L3 a permis de diminuer l'indice d'œdème pulmonaire des souris thiourée en favorisant l'expression des canaux ENaC, Na⁺/K⁺-ATPase et AQP5. Toutefois, l'activation répétée de KvLQT1 dans le modèle bléomycine n'a pas eu d'impact sur la résolution de l'œdème pulmonaire. La disparité entre ces réponses pourrait être expliquée par le fait qu'aucune lésion épithéliale n'est induite dans le modèle de thiourée. Ainsi l'épithélium alvéolaire serait majoritairement fonctionnel et réceptif au R-L3 tandis que les poumons des souris bléomycine présentent des dommages épithéliaux sévères. Ces résultats ajoutent de l'emphase sur la nécessité de régénérer un épithélium intègre et fonctionnel afin d'optimiser le phénomène de clairance liquidienne.

En plus du canal KvLQT1, le laboratoire avait préalablement décrit que le canal K_{ATP} jouait un rôle dans le mécanisme de clairance liquidienne *in vitro*, secondaire à la régulation à la hausse de l'expression (via l'activation du promoteur du canal ENaC) et de sa fonction (178). Malheureusement, un effet combiné des activateurs de KvLQT1 et K_{ATP} n'a pas permis d'obtenir d'effets bénéfiques additifs (178). Une étude de Han *et al.* (314) a rapporté un effet sur la clairance liquidienne *in vivo* grâce à l'activation pharmacologique de KCa3.1 et K_{ATP} à la suite d'une dysfonction induite par le vérapamil, toutefois aucune combinaison n'a été testée. Il a aussi été montré que l'activation du canal K_{ATP} a non seulement protégé les poumons des dommages produits à la suite d'une ischémie-reperfusion (I/R), mais a aussi réduit l'œdème pulmonaire (315). Dans cette dernière étude, on confirme que cette réponse est spécifique à la fonction de K_{ATP} puisque son inhibition pharmacologique a renversé son effet bénéfique. Il serait tout de même

intéressant de poursuivre avec des traitements combinés d'activateurs pharmacologiques des canaux K^+ . Ces études seraient facilitées par la disponibilité de drogues approuvées pour d'autres indications et qui pourraient être testées afin d'améliorer la clairance liquidienne.

Limitations sur l'étude du développement et de la résolution de l'œdème pulmonaire

L'œdème pulmonaire constitue l'un des paramètres du SDRA les plus difficiles à évaluer, car les techniques *in situ* sont limitées. La mesure de l'absorption liquidienne au cours du temps sur le même individu est relativement complexe expérimentalement et pour le bien-être de l'animal. Une évaluation à un temps défini, comme la mesure du contenu liquidien pulmonaire nécessite un nombre considérable d'animaux pour étudier la phase de développement et de résolution de l'œdème. Le suivi de la formation et de la résorption de l'œdème peut s'effectuer par technique de tomодensitométrie (CTscan). L'interprétation d'un scan nécessite toutefois une certaine expertise, mais une méthode quantitative automatisée pourrait être développée dans cette perspective. Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires soient décortiqués *in vitro*, les avenues prometteuses sont difficilement répliquables et vérifiables dans un modèle complet de SDRA *in vivo*.

8.1.3.4 Modulation des canaux K^+ sur la réponse inflammatoire

En condition physiologique, les souris WT et KO-KvLQT1 présentent le même profil inflammatoire. Nous y avons recensé >90% de macrophages résidents alvéolaires dans les BALs, soit un dénombrement similaire à celui retrouvé dans la littérature (5). La faible portion restante du BALs est constituée essentiellement de neutrophiles. De manière similaire, la quantification des neutro/macro chez les souris déficientes pour *Kcnn4* (KCa3.1) sont inchangés comparativement aux souris WT (316). Pourtant, d'après la littérature, l'inhibition des canaux K^+ ne provoque pas toujours le même impact sur les proportions basales de cellules inflammatoires. Par exemple, on rapporte une hausse des leucocytes totaux et des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α retrouvés dans les BALs de souris déficientes pour la sous-unité régulatrice KCNE2 du KvLQT1 (285). Cette réponse inflammatoire est probablement secondaire à l'augmentation des dommages pulmonaires recensés chez ces souris. Il est tout de même troublant de constater que la déficience d'un canal K^+ puisse contribuer au développement d'une réponse inflammatoire et

lésionnelle en condition saine. À l'inverse, il est étonnant de remarquer que des rats contrôles ayant subi une intervention chirurgicale placebo, procédure qui induit tout compte fait un stress pro-inflammatoire, ne produisent aucun changement sur les niveaux de TNF et IL-1 β sanguin à la suite de modulation pharmacologique du canal K_{ATP} (288). Malheureusement, cette étude ne rapporte pas le profil inflammatoire des poumons.

Les souris WT bléomycine présentent une forte hausse du nombre de cellules totales dans les BALs, notamment lié à l'infiltration majeure des neutrophiles. Ce type d'inflammation neutrophilique est bel et bien décrit dans les cas de SDRA. Elle est accompagnée d'une diminution marquée des macrophages, comme nous l'avons également observé avec le modèle bleomycine chez les souris WT. Les souris KO-KvLQT1 présentent un profil inverse, soit une augmentation moins prononcée de neutrophiles et une diminution beaucoup moins marquée des macrophages dans les BALs, comparé aux WT. Il faut prendre en considération que le KO constitutif de KvLQT1 a probablement provoqué des changements sur la fonction des cellules immunitaires n'exprimant plus de canal KvLQT1 à leur surface. Immler *et al.* (209) ont démontré que le courant K⁺ du canal Kv1.3 des neutrophiles est nécessaire à leur mécanisme d'adhésion et transmigration vers la lumière alvéolaire. Un rôle potentiellement similaire du canal KvLQT1 pourrait expliquer nos observations. Nos résultats sont discordants avec ceux des souris KO-KCa3.1 (317), chez qui la dysfonction de ce canal a plutôt permis de renverser la quantité de neutrophiles infiltrés suite à une ventilation mécanique délétère. Ces données nous portent à croire que les différents types de canaux K⁺ n'ont pas nécessairement la même implication ou relation avec les précurseurs de l'inflammation. La diminution de la proportion de macrophages observée dans nos modèles pourrait être secondaire à leur apoptose suivant leur intervention dans la résolution de l'inflammation. Il a été démontré que l'influx potassique par les canaux Twik-2 (318) et Thik-1 (319) est essentiel à l'initiation du mécanisme d'inflammasome NLRP3 par les macrophages. Dans le cadre de notre projet, nous pourrions évaluer les relations physiques ou fonctionnelles possibles entre le canal KvLQT1 et les macrophages en lien avec les protéines de l'inflammasome dans le cadre d'une atteinte directe pulmonaire telle que la bléomycine. De plus, il serait intéressant de décortiquer le potentiel thérapeutique du canal K_{ATP} sur les processus impliqués par l'inflammasome puisque l'ATP est primordiale à l'activation du complexe NLRP3.

De nombreuses évidences prouvent une relation bidirectionnelle fonctionnelle entre les canaux K^+ et la réponse inflammatoire. Pour notre part, l'activation du KvLQT1 par le R-L3 chez les souris WT soumises à la bléomycine a diminué la concentration de cellules totales infiltrées dans le BAL, ainsi que sa proportion en neutrophiles. La réponse que nous avons observée est similaire à celle de l'étude menée par l'équipe de Schwingshalk (290) montrant que l'activation pharmacologique de TREK-1 diminue le compte cellulaire total du BAL des souris soumises à une période courte d'hyperoxie. Dans cette même étude, la sécrétion d'IP-10 (CXCL10) a été diminuée dans les BALs tandis que le CCL-2 (MCP-1) a été réduit dans le milieu cellulaire suivant une période d'hyperoxie. Ce profil nous porte à croire que les médiateurs sécrétés sont probablement distincts entre les cellules épithéliales et immunitaires. Cette étude ne rapporte toutefois pas de précisions sur les proportions des populations de cellules immunitaires présentes dans les BALs (290). Le renversement de la réponse inflammatoire par l'administration en prophylaxie d'un activateur pharmacologique du K_{ATP} dans un modèle d'atteinte pulmonaire directe par le LPS a été démontré dans une étude de He *et al* (320). Celle-ci a aussi expliqué, à l'aide d'un modèle *in vitro*, que ce phénomène faisait suite à une réduction de l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1/VCAM-1) et en conséquence une réduction du nombre de monocytes adhérents (320). Cela nous procure une nouvelle voie exploratoire dans la compréhension du rôle des canaux K^+ dans l'établissement de la réponse inflammatoire. À l'opposé, le laboratoire a préalablement révélé que le TNF stimulait l'expression protéique des canaux KvLQT1 dans des cellules bronchiques et il serait intéressant de connaître quel est l'impact des médiateurs inflammatoires sur l'expression ou la fonction du canal KvLQT1 alvéolaire dans un contexte de bléomycine.

Limitations de notre étude et perspectives émergentes sur la compréhension de la réponse inflammatoire

En premier lieu, nos études se limitent à la quantification proportionnelle des cellules immunitaires dans les BALs de souris. Les BALs ne représentent que la portion cellulaire présente à la lumière alvéolaire ou aux médiateurs sécrétés. L'état inflammatoire peut également prendre place au niveau interstitiel et il aurait été intéressant de comparer ces deux compartiments. L'inflammation interstitielle pourrait être étudiée par immunohistochimie de marqueur de cellules immunitaires et permettrait de vérifier leur localisation. Le comptage différentiel par une

distinction basée sur l'aspect physique du noyau ou de la taille cellulaire est propre à chaque expérimentateur. Puisqu'il s'agit d'un échantillon fixé dans le temps, la progression au niveau du cycle cellulaire de chacune des cellules se trouve à différents stades et donc leur aspect physique en est également modifié. Ces potentielles sources d'erreurs pourraient être réduites avec une technique plus reproductible telle que la cytométrie en flux. De plus, le comptage différentiel est effectué à partir d'un faible échantillonnage tandis que la cytométrie en flux procure une évaluation sur l'entièreté de l'échantillon. Nous pourrions également clarifier l'activité de ces cellules immunitaires. Par exemple, en définissant quel type de macrophages, M1 ou M2, est plus actif dans ce contexte inflammatoire induit par la bléomycine ou par la mesure de la myéloperoxidase. De plus, il serait intéressant de décortiquer si le R-L3 joue un rôle dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales ou immunitaires. Nous pourrions aussi confirmer si le R-L3 diminue le pouvoir de certains chemoattractants dans un essai de migration des neutrophiles en chambres Boyden.

En second lieu, une limitation de notre étude est qu'il est impossible de bien comprendre le rôle du KvLQT1 dans le développement de la réponse inflammatoire puisque les résultats obtenus chez les souris KO-KvLQT1 ne sont pas comparables à celles obtenues par activation pharmacologique. En effet, la délétion constitutive de KvLQT1 sur potentiellement tous les types cellulaires immunitaires ne permet pas une comparaison équitable, car plusieurs mécanismes pourraient être dépendants de ce canal tel que le pouvoir de migration des neutrophiles. Il aurait été plus juste d'utiliser un inhibiteur pharmacologique et d'en faire la compétition avec le R-L3 afin de vérifier que ce bénéfice est bel et bien dépendant de KvLQT1 et de sa fonction.

8.1.3.5 Implication des canaux K⁺ sur les mécanismes de la phase de réparation épithéliale

La phase de réparation est critique dans la résolution du SDRA. Il existe de nombreux facteurs qui influencent la dérégulation entre la régénération d'un épithélium alvéolaire sain et la phase fibroproliférative. Nous nous sommes justement intéressés à la phase aiguë du SDRA afin d'avoir l'opportunité de prévenir l'établissement d'une fibrose, une phase difficilement réversible.

Nous avons débuté par évaluer les dommages provoqués par la bléomycine sur les poumons de souris KO-KvLQT1 et WT. Nous avons observé des lésions moins sévères et d'apparences plus disséminées ainsi qu'une diminution du nombre de foyers fibrotiques chez les souris KO-KvLQT1 comparativement aux souris WT suite au challenge à la bléomycine. Nous croyons que ces observations sont en corrélation avec la diminution de l'infiltration de neutrophiles et la préservation de l'intégrité de la barrière endothéliale. Le marquage des cellules alvéolaires (ATII) par le pro-SPC est conservé malgré les lésions induites par la bléomycine autant chez les poumons de souris WT que KO-KvLQT1. Les ATII étant plus résistantes aux lésions que les ATI étant donné leur morphologie, leur proportion n'a été affectée. Le blocage pharmacologique de KCa3.1 a aussi permis de diminuer le score de dommages pulmonaires aigus (ALI) suite à une ventilation mécanique non protectrice (317). Toutefois, la délétion de *Kcne2* (285) ou les souris mutantes TTT (306) a eu l'effet inverse suite à une insulte pulmonaire directe. En plus des scores d'ALI qui ont été aggravés, des phénomènes d'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire a également été observé. De plus, l'aggravation des lésions épithéliales a induit une diminution du marquage pro-SPC dans les tissus de poumons de souris soumises à une période d'hyperoxie.

Par la suite, nous avons démontré que l'activation de KvLQT1 par le R-L3 chez les souris WT a permis de diminuer la surface de zones lésées en plus d'améliorer les scores des différents paramètres caractéristiques de l'ALI (inflammation, épaisseur du septa et présence de débris). Bien que le R-L3 semble avoir contribué aux mécanismes de réparation épithéliale, les améliorations ne semblent pas avoir été suffisantes afin d'améliorer la fonction respiratoire ou la fonction de la barrière alvéolo-capillaire (œdème et perméabilité). Il se trouve que le R-L3 a également induit une hausse de l'expression de pro-SPC en condition bléomycine. Nous pourrions supposer que cela est dû à la phase de réparation épithéliale qui est enclenchée ou une activité croissance du métabolisme du surfactant afin de contrer la perte de compliance des souris bléomycine. Bien que ce résultat soit intéressant, plus d'expérimentations sont nécessaires afin d'expliquer ce phénomène.

Excluant les études du laboratoire concernant l'implication des canaux KvLQT1, K_{ATP} et KCa3.1 dans les mécanismes de réparation alvéolaire et bronchique, peu d'études se sont concentrées sur l'épithélium respiratoire. Toutefois, il existe de nombreuses études sur l'implication des

canaux K⁺ dans la réparation d'autres types d'épithélia (321–323). Par exemple, il semblerait que la réparation et la régénération de la peau soient médiées par KCNH2 et KCNJ8. Chacun de ces canaux K⁺ semble avoir une fonction particulière puisqu'au sein du même épithélium, l'activation du K_{ATP} (KCNJ8) favorise la réparation, et à l'inverse l'inhibition de KCNH2 est bénéfique (322). Sinon, la plupart des évidences de la littérature portent sur l'implication des canaux K⁺ dans le développement de cancer (323,324). Le microenvironnement inflammatoire et les processus de migration (invasion) et prolifération cellulaire sont de cruciaux déterminants dans l'agressivité du cancer. Le laboratoire a préalablement identifié le canal KvLQT1 comme une cible potentielle thérapeutique dans le développement des adénocarcinomes pulmonaires (ADCP). De manière similaire, une nouvelle cible dans la même famille des canaux K⁺ dépendants au voltage (KCNJ4) a été étudiée par Wu *et al* (324). En effet, KCNJ4 est fortement exprimé dans les tissus d'ADCP et son inhibition génétique diminue les phénomènes de migration, évation et prolifération cellulaire par les voies de signalisation MERK-ERK.

Nous avons également confirmé que les cellules alvéolaires isolées des poumons de souris déficientes pour KvLQT1 ont une vitesse de réparation plus lente que celles de souris WT. Puis, nous avons démontré que l'activation du KvLQT1 renverse l'effet délétère de la bléomycine sur la réparation épithéliale alvéolaire *in vitro*. Tel que démontré par les études antérieures du laboratoire, les canaux K⁺ ont la capacité de réguler chacune des étapes de la réparation épithéliale. Premièrement, la dynamique de changements structurels par la modulation des composants du cytosquelette est importante pour conférer une certaine motilité aux cellules. Une étude pertinente (325) a démontré que les cellules déficientes pour TREK-1, un canal K⁺ K₂P mécanosensible, expriment plus faiblement les fibres de stress F-actine et ce qui favorisait son habileté à se déformer. Ceci lui permet donc de résister aux dommages induits par l'étirement en réduisant le détachement des cellules envers leur matrice. L'application d'un étirement aux cellules déficientes à TREK-1 a également diminué la localisation de la vinculine aux sites d'adhésion focaux et la phosphorylation de FAK-397. Une deuxième étude (233) a démontré la formation d'un complexe protéique Kv1.2-FAK qui est modulé par la présence de fibronectine et par l'activité du dit canal. L'activité de Kv1.2 est primordiale pour assurer la directionnalité des cellules en migration et favoriser la réparation épithéliale. Aux vues de ces évidences,

l'exploration de l'interaction du canal KvLQT1 avec les diverses composantes du cytosquelette ou les signaux intracellulaires serait intéressante.

La migration cellulaire peut également être régulée par les canaux K⁺ en collaboration avec les intégrines tel que démontré précédemment au laboratoire (173,234). Il a aussi été démontré que l'inhibition de Kir4.2 diminue la migration cellulaire médiée par $\alpha 9\beta 1$ -intégrine (326). Ces protéines sont localisées au front des cellules en migration et leur fonction a un impact sur leur direction et la formation des lamellipodes. Il existe également une variété de signaux cellulaires qui ont un impact sur la réparation épithéliale. Par exemple, la protéine nucléaire HMGB1 qui est sécrétée lors de dommages épithéliaux a la capacité de réguler la synthèse de matrice extracellulaire et ainsi favoriser la réparation de cellules épithéliales bronchiques (327). Des médiateurs inflammatoires tels qu'IL-1 β ou TGF- β ont également été étudiés pour leur implication dans la réparation épithéliale. Ces expérimentations n'ont toutefois qu'une portée cellulaire et n'ont pas été étudiées dans un contexte où plusieurs mécanismes lésionnels sont présents.

Limitations de notre étude et perspectives émergentes sur la compréhension des mécanismes régulant la phase de réparation

Nos limitations concernent le manque de détails sur le mode d'action du R-L3 sur les mécanismes de réparation *in vivo*. Notre méthode expérimentale ne nous permet pas de savoir si les traitements de R-L3 administrés en parallèle au développement du SDRA ont permis de réparer les dommages déjà présents ou s'il a plutôt empêché le développement de dommages pulmonaires subséquents. Les observations histologiques ne sont possibles qu'à un certain moment défini, mais la dynamique de résolution est propre à chaque sujet et pourrait varier dans le temps. De plus, la phase de réparation se déroule simultanément avec l'initiation de la phase fibroproliférative et il serait impératif de faire la distinction entre les deux phases lors de l'étude des dommages épithéliaux. Il est difficile de suivre l'état de réparation d'un sujet sur le cours total de l'expérience. De plus, les dommages épithéliaux produits par la bléomycine sont hétérogènes d'un sujet à l'autre et la dynamique temporelle de la phase de réparation pourrait être adaptée aux besoins spécifiques à chacun.

Les voies à explorer dans la compréhension de l'amélioration de la réparation épithéliale par l'activation de KvLQT1 sont multiples. Tout d'abord, le rôle connu du canal KvLQT1 dans la régulation du volume cellulaire et de l'implantation d'un champ électrochimique pourrait servir au front cellulaire dans l'établissement de la polarité et la directionnalité des cellules en migration. L'amélioration de la migration cellulaire pourrait également s'expliquer par l'interaction physique et fonctionnelle du KvLQT1 avec les intégrines. Puisque la réparation épithéliale *in vitro* est améliorée par le R-L3, il serait intéressant d'effectuer des analyses de vidéomicroscopie afin de décortiquer si l'activation du KvLQT1 permet d'améliorer l'angle, la distance parcourue ou changer la morphologie des cellules en migration ce qui pourrait apporter des indications sur l'influence des canaux K⁺ sur la formation de structures telles que les lamellipodes. L'impact de l'inhibition pharmacologique de KvLQT1 sur le cycle cellulaire a également été préalablement établi au laboratoire (149), mais l'effet de son activation n'avait pas été étudié faute d'activateur disponible commercialement à cette époque. De plus, le canal KvLQT1 ayant une activité constitutive, il se pourrait que l'ajout d'un activateur n'engendre pas davantage de prolifération cellulaire.

Dans la perspective d'approfondir la compréhension des mécanismes de réparation épithéliale dans un modèle expérimental se rapprochant de la réalité clinique, j'ai participé à la mise en place d'un protocole d'isolation de cellules alvéolaires humaines. Les cellules sont isolées à partir de parenchyme de donneurs sains (sans maladie pulmonaire) ou de parenchyme pathologique (collectés chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, emphysème ou fibrose kystique). En parallèle, j'ai également participé à l'élaboration de la procédure opérationnelle pour la collecte de BALs de patients SDRA (selon les critères d'admissibilité inspirés de la définition de Berlin) ou sains (patients dont la suspicion d'une infection pulmonaire nécessite la pratique d'un BAL) à l'USI. Ces échantillons humains nous permettront d'étudier la réponse d'un épithélium alvéolaire sain ou pathologique en réaction à l'exposition de BALs de patients sains ou SDRA (soupe inflammatoire). L'exploration de la modulation des canaux K⁺ sur l'épithélium alvéolaire pourra alors être décortiquée *in vitro*. Premièrement, nous nous sommes assurés que l'épithélium alvéolaire généré par notre technique d'isolation exprime toutes nos cibles d'explorations, soit le canal ENaC, la pompe Na⁺/K⁺-ATPase et les canaux K⁺. Deuxièmement, nous

avons confirmé que la modulation des canaux K^+ a un impact sur la réparation épithéliale en condition physiologique. Finalement, grâce à ces échantillons, nous avons mesuré l'implication des canaux K^+ sur la vitesse de réparation épithéliale d'une monocouche de cellules alvéolaires humaines exposés à un BAL-SDRA (**Figure 37**). Nos résultats préliminaires suggèrent que l'activation pharmacologique des canaux $KvLQT1$ et K_{ATP} a permis de renverser l'effet délétère produit par la soupe inflammatoire retrouvée dans le BAL-ARDS.

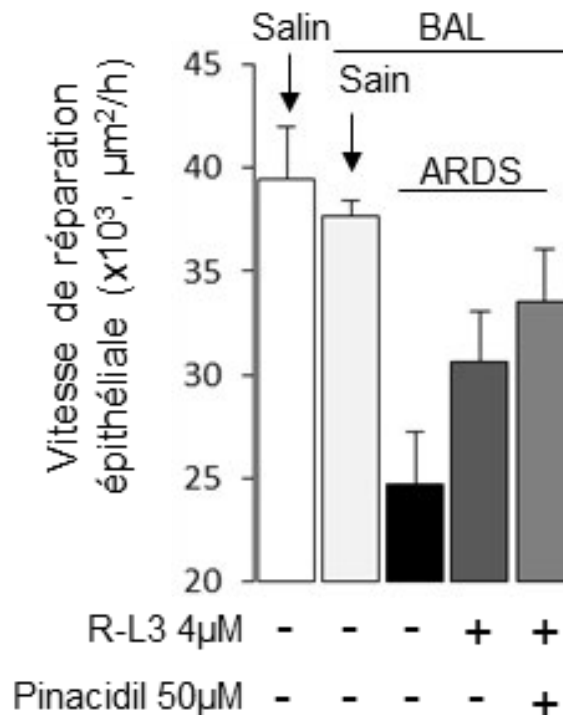


Figure 37. – Réparation épithéliale sur culture cellulaire d'ATII humaine exposée à un BAL-sain ou BAL-ARDS en combinaison avec des activateurs des canaux $KvLQT1$ (R-L3) et K_{ATP} (pinacidil).

Pour résumer, la résolution du SDRA par la modulation des canaux K^+ constitue une nouvelle approche thérapeutique encourageante. Nos études ont principalement exploré l'implication du canal $KvLQT1$, cependant le poumon présente une variété de canaux K^+ parmi lesquels certains pourraient représenter des cibles potentiellement intéressantes, en fonction de leur rôle dans divers mécanismes cellulaires essentiels à la résolution du SDRA (présenté au **Tableau 8**). Des

stratégies combinatoires par la modulation simultanée de plusieurs canaux K⁺ pourraient donc avoir des effets bénéfiques synergiques.

| Classe de canaux K ⁺ | Nom du canal K ⁺ | Niveau d'expression | Rôles associés au niveau pulmonaire |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| Canaux K ⁺ à deux pores (K ₂ P) | Trek-1/ Trek-2/ TRAAK | Alvéolaire | Métabolisme du surfactant |
| | Trek-1 | Lignée A549 | Réarrangement du cytosquelette |
| | Twik-2 | Macrophage alvéolaire | Initiation de l'inflammasome |
| Canaux dépendants du calcium (KCa) | BKCa | Lignée A549 | Sensible à l'oxygène |
| | KCa3.1 | Nasal / Bronchial / Alvéolaire | Contrôle du transport de Cl ⁻ (CFTR) et Na ⁺ (CaCC) |
| | | Bronchial / Alvéolaire | Régulation de la migration, prolifération cellulaire et réparation épithéliale |
| | | Neutrophiles | Recrutement / Migration en intra-alvéolaire |
| Canaux K ⁺ à rectification entrante (Kir) | Kir2.1 | Alvéolaire fœtale | Transport ionique et liquidien |
| | K _{ATP} | Bronchial / Alvéolaire | Régulation de la migration, prolifération cellulaire et réparation épithéliale |
| | | Alvéolaire | Contrôle du transport de Cl ⁻ (CFTR) et Na ⁺ (ENaC) |
| | | Alvéolaire / Parenchyme | Mécanisme de clairance liquidienne alvéolaire |
| Canaux dépendants du voltage (Kv) | Kir7.1 | Tissu pulmonaire | Embryogénèse pulmonaire |
| | Kv1.3 | Neutrophiles | Recrutement / Migration en intra-alvéolaire |
| | KvLQT1 | Nasal / Bronchial | Contrôle du transport de Cl ⁻ (CFTR) et Na ⁺ (CaCC) |
| | | Alvéolaire | Contrôle du transport de Cl ⁻ (CFTR) et Na ⁺ (ENaC) |
| | | Alvéolaire | Mécanisme de clairance liquidienne alvéolaire |
| | | Bronchial / Alvéolaire | Régulation de la migration, prolifération cellulaire et réparation épithéliale |
| Lignée A549 | Régulation du cycle cellulaire | | |

Tableau 8. – Tableau synthèse des canaux K⁺ impliqués au niveau pulmonaire

8.2 Limitations générales rencontrées lors de mon projet de doctorat

Au départ, nous avons cru que la comparaison de la réponse des souris KO-KvLQT1, qui présentent une abolition systémique de KvLQT1, avec les souris dont l'activation de KvLQT1 est effectuée par modulation pharmacologique (R-L3) pour obtenir un courant K⁺ maximisé seulement au niveau pulmonaire nous servirait à évaluer la contribution totale du KvLQT1.

Toutefois, nous avons été surpris de constater que les souris WT et KO-KvLQT1 ne réagissent pas de la même façon en condition pathologique (modèle bléomycine), ce qui nous semble indiquer que cette comparaison n'est pas juste. Afin de comparer la contribution de l'activité du canal KvLQT1, il aurait fallu étudier en parallèle l'impact de son inhibition pharmacologique (chromanol).

Bien que les réponses soient hétérogènes entre chaque sujet, la reproduction des paramètres spécifiques au SDRA est constante et confirme que nous avons développé, optimisé et obtenu nos résultats à partir d'un modèle valide de dommages pulmonaires aigus (ALI). La formation de membrane hyaline n'est pas produite dans le modèle de bléomycine et pourtant ce mécanisme est primordial dans la compréhension de la mise en place de la fibrose à la suite du SDRA. L'utilisation d'un modèle *in vivo* complémentaire pourrait permettre de confirmer l'implication du canal KvLQT1 dans la résolution des mécanismes lésionnels que nous avons étudiés et permettrait d'explorer leur rôle dans le développement de membranes hyalines. De plus, nous n'avons évalué le rôle du KvLQT1 qu'en utilisant une insulte pulmonaire directe et nous pourrions l'examiner suite d'une insulte pulmonaire indirecte. Les modèles de double-insulte présentent des lésions cumulatives et plus représentatives du SDRA. Généralement, l'administration de ventilation mécanique à la suite d'une insulte primaire (directe ou indirecte) est plus représentative de la réalité clinique. L'idéal serait de transposer les stratégies thérapeutiques les plus prometteuses vers un modèle SDRA produit chez un grand animal. Il pourrait s'agir du porc par exemple, car son anatomie et la présence de macrophages intravasculaires pulmonaires sont les plus rapprochés de l'Homme.

La méthode expérimentale ne nous a pas permis de savoir si l'activation de KvLQT1 avait un impact bénéfique, lorsqu'administré en prophylaxie ou dans une optique thérapeutique. Il serait plus pertinent d'élaborer un protocole qui soit représentatif de la réalité clinique où le traitement des patients SDRA débute lors de leur admission aux soins intensifs et donc que l'insulte primaire ait déjà eu lieu. Pour ce faire, nous pourrions administrer l'activateur pharmacologique de façon répétée suivant une période où les mécanismes lésionnels sont déjà engendrés. Nous nous sommes penchés uniquement sur le rôle du canal KvLQT1, mais des données préliminaires et des résultats publiés du laboratoire démontrent que le canal K_{ATP} est aussi impliqué dans les

mécanismes de clairance liquidienne et de réparation épithéliale. Des traitements combinatoires pourraient être envisagés dans l'étude *in vivo* de la résolution du SDRA.

8.3 Perspectives émergentes dans la résolution du SDRA

De multiples études cliniques sont portées sur l'optimisation de la prise en charge des patients SDRA. Il manque toutefois d'avenues thérapeutiques prometteuses dans le but de renverser la dysfonction biologique entraînée par le développement du SDRA, indépendamment d'une insulte pulmonaire directe ou indirecte. Les échecs multiples concernant l'efficacité de nombreuses stratégies thérapeutiques (voir section 1.4.5) s'expliquent en partie par le recrutement de patients SDRA hétérogènes au niveau de plusieurs paramètres (étiologie, phénotype inflammatoire, sévérité du SDRA). De plus, le manque de marqueurs biologiques nous permettant de cibler des mécanismes lésionnels précis et qui soient spécifiques au SDRA empêche de comprendre ce qui se produit au niveau cellulaire chez le patient. L'identification de nouveaux biomarqueurs pourrait éventuellement faciliter une médecine de précision personnalisée. De plus, les critères de succès tel que le taux de mortalité ou la période de ventilation à 28 jours sous-estiment et limitent le potentiel de certaines thérapies.

L'une des plus récentes cibles constitue les protéines capables de stabiliser l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire (248). Par exemple, la sphingosine 1-phosphate (S1P) est un lipide protégeant la perméabilité endothéliale et réduisant l'infiltration de neutrophiles dans un modèle d'infection à l'influenza A. D'autres voies de signalisation sont également à l'étude dans le but de préserver la barrière endothéliale par le maintien des protéines de jonctions VE-cadhérines.

Une autre approche serait la thérapie basée sur les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) qui ont déjà prouvé leur bénéfice dans d'autres types d'atteintes (maladies auto-immunes principalement). Les MSCs ont démontré avoir des propriétés anti-inflammatoires, être impliquées dans la préservation de l'intégrité et dans le mécanisme de clairance liquidienne par leur interaction avec de multiples facteurs intracellulaires (248). Leur capacité de différenciation est également un atout dans un processus tel que la réparation épithéliale. Une étude clinique de phase 2 (328) a permis d'assurer que l'administration de MSCs chez des patients SDRA était sécuritaire, toutefois elle n'a pas eu d'impact sur la mortalité à long terme. Des études de phase

clinique (276) sont présentement conduites pour étudier la sécurité de l'administration de cellules souches adultes ou de MSCs dérivées du cordon ombilical.

En conclusion, bien que nos études suggèrent une implication des canaux K^+ dans les différents processus de clairance liquidienne, de diminution de la réponse inflammatoire et d'accélération de la réparation épithéliale, des études plus poussées sont nécessaires. Toutefois, nous sommes persuadés que cibler l'épithélium alvéolaire afin de restaurer son intégrité et lui permettre de retrouver son homéostasie est une étape cruciale. Je souhaite que mon projet de doctorat et les résultats qui en sont tirés contribuent à la compréhension des mécanismes qui pourront un jour réussir à résoudre le SDRA.

Références bibliographiques

1. Albertine KH. Chapter 1. Anatomy of the Lungs. In: Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 6^e éd. United States: Elsevier Saunders; 2016. p. 3-21.
2. Koval M, K. Sidhaye V. Introduction: The Lung Epithelium. In: Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease. 1^{re} éd. Academic Press; 2017. p. XIII-XVIII.
3. Netter FH. Respiratory System: a compilation of paintings depicting anatomy and embryology, physiology, pathology, pathophysiology, and clinical features and treatment of diseases. 2^e éd. Divertie MB, Brass A, éditeurs. Summit (NJ): CIBA; 1996. 328 p. (The CIBA Collection of Medical Illustrations; vol. 7).
4. Kradin RL. Chapter 2 - Anatomy of the Lung. In: Understanding Pulmonary Pathology. 1^{re} éd. Boston: Academic Press; 2016. p. 5-19.
5. Fraser RS. Histology and gross anatomy of the respiratory tract. In: Physiologic Basis of Respiratory Disease. Hamilton: BC Decker Inc; 2005. p. 1-14.
6. Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. 12. Appareil respiratoire. In: Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. 2^e éd. Belgique: De Boeck; 2008. p. 234-50.
7. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*. 2019;560(7718):319-24.
8. Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*. 2014;507(7491):190-4.
9. Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(1):67-74.
10. Whiteman EL, Fan S, Harder JL, Walton KD, Liu CJ, Soofi A, et al. Crumbs3 Is Essential for Proper Epithelial Development and Viability. *Mol Cell Biol*. 2014;34(1):43-56.
11. Koval M. Chapter 1 - Junctional Interplay in Lung Epithelial Barrier Function. In: Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease. 1^{re} éd. Academic Press; 2017. p. 1-20.
12. Flecknoe S, Harding R, Maritz G, Hooper SB. Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(6):L1180-1185.

13. Boitano S, Safdar Z, Welsh DG, Bhattacharya J, Koval M. Cell-cell interactions in regulating lung function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(3):L455-459.
14. Foster CD, Varghese LS, Skalina RB, Gonzales LW, Guttentag SH. In Vitro Transdifferentiation of Human Fetal Type II Cells Toward a Type I-like Cell. *Pediatr Res*. 2007;61(4):404-9.
15. Wade KC, Guttentag SH, Gonzales LW, Maschhoff KL, Gonzales J, Kolla V, et al. Gene Induction during Differentiation of Human Pulmonary Type II Cells In Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(6):727-37.
16. Chen SP, Zhou B, Willis BC, Sandoval AJ, Liebler JM, Kim KJ, et al. Effects of transdifferentiation and EGF on claudin isoform expression in alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol*. 2005;98(1):322-8.
17. Schlingmann B. Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;42:47-57.
18. LaFemina MJ, Sutherland KM, Bentley T, Gonzales LW, Allen L, Chapin CJ, et al. Claudin-18 Deficiency Results in Alveolar Barrier Dysfunction and Impaired Alveologenesis in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(4):550-8.
19. Li G, Flodby P, Luo J, Kage H, Sipos A, Gao D, et al. Knockout Mice Reveal Key Roles for Claudin 18 in Alveolar Barrier Properties and Fluid Homeostasis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(2):210-22.
20. Kage H, Flodby P, Gao D, Kim YH, Marconett CN, DeMaio L, et al. Claudin 4 knockout mice: normal physiological phenotype with increased susceptibility to lung injury. *Am J Pathol*. 179(3):1081-7.
21. Rokkam D, LaFemina MJ, Lee JW, Matthay MA, Frank JA. Claudin-4 Levels Are Associated with Intact Alveolar Fluid Clearance in Human Lungs. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1081-7.
22. Ding L, Lu Z, Foreman O, Tatum R, Lu Q, Renegar R, et al. Inflammation and Disruption of the Mucosal Architecture in Claudin-7-Deficient Mice. *Gastroenterology*. 2012;142(2):191-3.
23. Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, et al. Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. *Mol Biol Cell*. 2008;19(6):2465-75.
24. Xu J, Kausalya PJ, Phua DCY, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. Early Embryonic Lethality of Mice Lacking ZO-2, but Not ZO-3, Reveals Critical and Nonredundant Roles for Individual Zonula Occludens Proteins in Mammalian Development. *Mol Biol Cell*. 2008;28(5):1669-78.
25. Huber D, Balda MS, Matter K. Occludin Modulates Transepithelial Migration of Neutrophils. *J Biol Chem*. 2000;275(8):5773-8.

26. Ashino Y, Ying X, Dobbs LG, Bhattacharya J. $[Ca^{2+}]_i$ oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(1):L5-13.
27. Abraham V, Chou ML, George P, Pooler P, Zaman A, Savani RC, et al. Heterocellular gap junctional communication between alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(6):L1085-1093.
28. Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M. Pannexin 1 Contributes to ATP Release in Airway Epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(5):525-34.
29. Bastacky J, Lee CY, Goerke J, Koushafar H, Yager D, Kenaga L, et al. Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J Appl Physiol*. 1995;79(5):1615-28.
30. Neergaard KV. Neue auffassungen uber einen grundbegriff der atemmechanik. Die retraktionskraft der lunge, abhangig von der oberflachenspannung in den alveolen. *Z Gesamt Exp Med*. 1929;66:373-94.
31. Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;95(1):170-2.
32. Mason RJ, Dobbs LG. Chapter 8 - Alveolar Epithelium and Pulmonary Surfactant. In: Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 6^e éd. United States: Elsevier Saunders; 2016. p. 134-149.e5.
33. Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408(2-3):79-89.
34. Olmeda B, Martinez-Calle M, Pérez-Gil J. Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Ann Anat*. 2017;209:78-92.
35. Possmayer F. Biophysical activities of pulmonary surfactant. Philadelphia: WB Saunders Company; 1991. 949-962 p. (Fetal and Neonatal physiology; vol. 2).
36. Lu J, Teh C, Kishore U, Reid KBM. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta*. 2002;15(2-3):387-400.
37. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Mol Immunol*. 2006;43:1293-315.
38. Crouch E, Wright JR. Surfactant Proteins A and D and Pulmonary Host Defense. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:521-54.
39. Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory Roles of Surfactant Proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(3):252-7.

40. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, et al. Role of Surfactant Proteins A, D, and C1q in the Clearance of Apoptotic Cells In Vivo and In Vitro: Calreticulin and CD91 as a Common Collectin Receptor Complex. *J Immunol.* 2002;169(7):3978-86.
41. Alcorn JL. Chapter 4. Pulmonary Surfactant Trafficking and Homeostasis. In: *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease*. 1^{re} éd. Academic Press (Elsevier); 2017. p. 59-75.
42. Melton KR, Nesselin LL, Ikegami M, Tichelaar JW, Clark JC, Whitsett JA, et al. SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(3):L543-549.
43. Tokieda K, Whitsett JA, Clark JC, Weaver TE, Ikeda K, McConnell KB, et al. Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am J Physiol.* 1997;273(4):L875-882.
44. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab AE, He M, et al. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest.* 2011;91(3):363-78.
45. Wright JR, Dobbs LG. Regulation of Pulmonary Surfactant Secretion and Clearance. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:395-414.
46. Batenburg JJ. Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol.* 1991;262((4 Pt 1)):L367-385.
47. Günther A, Schmidt R, Feustel A, Meier U, Pucker C, Ermert M, et al. Surfactant Subtype Conversion Is Related to Loss of Surfactant Apoprotein B and Surface Activity in Large Surfactant Aggregates. Experimental and clinical studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(1):244-51.
48. Magoon M, Wright JR, Baritussio A, Williams MC, Goerke J, Benson BJ, et al. Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta.* 1983;750(1):18-31.
49. Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* 2017;367:427-44.
50. Preyer W. *Specielle Physiologie des Embryos*. Germany: The Grieben's Verlag; 1885.
51. Carmel JA, Friedman F, Adams FH. Fetal Tracheal Ligation And Lung Development. *Am J Child.* 1965;109:452-6.
52. Potter EL, Bohlender GP. Intrauterine Respiration in Relation to Development of the Fetal Lung. *Am J Obstet Gynecol.* 1941;42:14-22.
53. Adamson TM, Boyd RDH, Platt HS, Strang LB. Composition of alveolar liquid in the foetal lamb. *J Physiol.* 1969;204:159-68.

54. Rao AK, Cott GR. Ontogeny of ion transport across fetal pulmonary epithelial cells in monolayer culture. *Am J Physiol.* 1991;261(Lung Cell. Mol. Physiol. 5):178-87.
55. Van Scott MR, Davis CW, Boucher RC. Na⁺ and Cl⁻ transport across rabbit nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells. *Am J Physiol.* 1989;256(Cell Physiol. 25):893-901.
56. Katz C, Bentur L, Elias N. Clinical implication of lung fluid balance in the perinatal period. *J Perinatol.* 2011;31:230-5.
57. Widdicombe JH. Chapter 7 - Development of Salt and Water Transport across Airway and Alveolar Epithelia. In: *The Lung.* 2^e éd. Great Britain: Academic Press (Elsevier); 2014. p. 137-55.
58. Olver RE, Walters DV, Wilson SM. Developmental Regulation of Lung Liquid Transport. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:77-101.
59. Cassin S, Gause G, Perks AM. The Effects of Bumetanide and Furosemide on Lung Liquid Secretion in Fetal Sheep. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986;181(3):427-31.
60. McCray PJ, Bettencourt J. Prostaglandins stimulate fluid secretion in human fetal lung. *J Dev Physiol.* 1993;19(1):29-36.
61. Graeff R, Wang G, McCray PJ. KGF and FGF-10 stimulate liquid secretion in human fetal lung. *Pediatr Res.* 1999;46(5):523-9.
62. Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol.* 1996;81(1):209-24.
63. Klaus M, Tooley WH, Weaver KH, Clements JA. Lung volume in the newborn infant. *Pediatrics.* 1962;30:111-6.
64. Bland RD, Hansen TN, Haberkern CM, Bressack MA, Hazinski TA, Raj JU, et al. Lung fluid balance in lambs before and after birth. *J Appl Physiol Respir Env Exerc Physiol.* 1982;53(4):992-1004.
65. Dickson KA, Maloney JE, Berger PJ. Decline in lung liquid volume before labor in fetal lambs. *J Appl Physiol.* 1986;61(6):2266-72.
66. Bland RD. Lung fluid balance during development. *NeoReviews.* 2005;6(6):e255-267.
67. Cheng JohnB, Goldfien A, Ballard PL, Roberts JM. Glucorticoids increase pulmonary B-adrenergic receptors in fetal rabbit. *Endocrinology.* 1980;107(5):1646-8.
68. Walters DV, Olver RE. The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth. *Pediatr Res.* 12(3):239-42.

69. Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV. The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol.* 1986;376:321-40.
70. Janer C, Pitkänen OM, Helve O, Andersson S. Airway expression of the epithelial sodium channel α -subunit correlates with cortisol in term newborns. *Pediatrics.* 2011;128(2):e414-421.
71. Chapman DL, Widdicombe JH, Bland RD. Developmental differences in rabbit lung epithelial cell Na(+)-K(+)-ATPase. *Am J Physiol.* 1990;259(Lung Cell. Mol. Physiol. 3):481-7.
72. Ingbar DH, Weeks CB, Gilmore-Hebert M, Jacobsen E, Duvick S, Dowin R, et al. Developmental regulation of Na,K-ATPase in rat lung. *Am J Physiol.* 1996;270(Lung Cell. Mol. Physiol. 14):619-29.
73. Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry Jr LC. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79(19):6033-7.
74. Cheek JM, Kim KJ, Crandall ED. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol.* 1989;256(Cell Physiol. 25):688-93.
75. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in aENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 1996;12(3):325-8.
76. McDonald F, Yang B, Hrstka R, Drummond H, Tarr D, McCray PJ, et al. Disruption of the β subunit of the epithelial Na⁺ channel in mice: Hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(4):1727-31.
77. Brochiero E, Dagenais A, Prive A, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287:L382-92.
78. Fang X, Fukuda N, Barbry P, Sartori C, Verkman AS, Matthay MA. Novel Role for CFTR in Fluid Absorption from the Distal Airspaces of the Lung. *J Gen Physiol.* 2002;119(2):199-207.
79. Downs C. Chap 2 - Ion transport and lung fluid balance. In: *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease*. 1^{re} éd. Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease; 2017. p. 21-31.
80. Baoxue Y. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science+Business Media; 2017. 278 p. (Aquaporins; vol. 969).

81. Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and Localization of Epithelial Aquaporins in the Adult Human Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(3):224-34.
82. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* 2005;118(15):3225-32.
83. Verkman AS. Role of aquaporines in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(3):324-30.
84. Horie M, Castaldi A, Sunohara M, Wang H, Ji Y, Liu Y, et al. Integrated Single-Cell RNA-Sequencing Analysis of Aquaporin 5-Expressing Mouse Lung Epithelial Cells Identifies GPRC5A as a Novel Validated Type I Cell Surface Marker. *Cells.* 2020;9(11):2460.
85. Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. Role of Aquaporin Water Channels in Airway Fluid Transport, Humidification, and Surface Liquid Hydration. *J Gen Physiol.* 2001;117(6):573-82.
86. Umenishi F, Carter EP, Yang B, Oliver B, Matthay MA, Verkman AS. Sharp increase in rat lung water channel expression in the perinatal period. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15(5):673-9.
87. Carter EP, Umenishi F, Matthay MA, Verkman AS. Developmental Changes in Water Permeability Across the Alveolar Barrier in Perinatal Rabbit Lung. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1071-8.
88. Bai C, Fukuda N, Song Y, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice. *J Clin Invest.* 1999;103(4):555-61.
89. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest.* 2000;105(1):93-100.
90. Song Y, Verkman AS. Aquaporin-5 Dependent Fluid Secretion in Airway Submucosal Glands. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41288-92.
91. Vassiliou AG, Manitsopoulos N, Kardara M, Maniatis NA, Orfanos SE, Kotanidou A. Differential Expression of Aquaporins in Experimental Models of Acute Lung Injury. *In Vivo.* 2017;31:885-94.
92. Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Aquaporin 5 Expression in Mouse Lung Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 2001;276(22):18657-64.
93. Gabazza EC, Kasper M, Ohta K, Keane M, D'Alessandro-Gabazza C, Fujimoto H, et al. Decreased expression of aquaporin-5 in bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Pathol Int.* 2004;54(10):774-80.

94. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 2016;579(2):95-132.
95. Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(4):1966-71.
96. Johnson MD. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst*. 2007;3(3):178-86.
97. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M. Molecular Cloning and Functional Expression of a Novel Amiloride-sensitive Na⁺ Channel. *J Biol Chem*. 1995;270(46):27411-4.
98. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994;367(6462):463-7.
99. Yue G, Malik B, Yue G, C. Eaton D. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP₂) Stimulates Epithelial Sodium Channel Activity in A6 Cells*. *J Biol Chem*. 2002;277(14):11965-9.
100. Pochynyuk O, Staruschenko A, Tong Q, Medina J, Stockand JD. Identification of a Functional Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Binding Site in the Epithelial Na⁺ Channel. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37565-71.
101. Mazzochi C, Bubien JK, Smith PR, Benos DJ. The Carboxyl Terminus of the α -Subunit of the Amiloride-sensitive Epithelial Sodium Channel Binds to F-actin. 2006;281(10):6528-38.
102. Fotia AB, Dinudom A, Shearwin KE, Koch JP, Korbmacher C, Cook DI, et al. The role of individual Nedd4–2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB J*. 2003;17(1):70-2.
103. Zhou R, Patel SV, Snyder PM. Nedd4-2 Catalyzes Ubiquitination and Degradation of Cell Surface ENaC*. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20207-12.
104. Sheng S, Maarouf AB, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR. Functional Role of Extracellular Loop Cysteine Residues of the Epithelial Na⁺ Channel in Na⁺ Self-inhibition. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20180-90.
105. Sheng S, Bruns JB, Kleyman TR. Extracellular Histidine Residues Crucial for Na⁺ Self-inhibition of Epithelial Na⁺ Channels. *J Biol Chem*. 2004;279(11):9743-9.
106. Firsov D, Robert-Nicoud M, Gruender S, Schild L, Rossier BC. Mutational Analysis of Cysteine-rich Domains of the Epithelium Sodium Channel (ENaC). *J Biol Chem*. 1999;274(5):2743-9.

107. Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, Grubb B, Norman H, Hummler E, et al. Role of gENaC Subunit in Lung Liquid Clearance and Electrolyte Balance in Newborn Mice. *Clin Invest.* 1998;102(8):1634-40.
108. Eaton DC, Helms MN, Koval M, Fang H, Jain L. The Contribution of Epithelial Sodium Channels to Alveolar Function in Health and Disease. 2009;*Annu Rev Physiol*(71):403-23.
109. Staruschenko A, Adams E, Booth RE, Stockand JD. Epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry. *Biophys J.* 2005;88(6):3966-75.
110. Snyder PM, Cheng C, Prince L, Rogers J, Welsh M. Electrophysiological and Biochemical Evidence That DEG/ENaC Cation Channels Are Composed of Nine Subunits. *J Biol Chem.* 1998;273(2):681-4.
111. Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO.* 1998;17(2):344-52.
112. Noreng S, Bharadwaj A, Posert R, Yoshioka C, Bacongus I. Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy. *Elife.* 7:e39340.
113. Champigny' G, Voilley' N, Lingueglia E, Friend V, Lazdunski M. Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na⁺ channel by steroid hormones. *EMBO.* 1994;13(9):2177-81.
114. Folkesson HG, Norlin A, Wang Y, Abedinpour P, Matthay MA. Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats. *J Appl Physiol.* 88(2):416-24.
115. Sayegh R, Auerbach SD, Li X, Loftus RW, Husted RF, Thomas CP. Glucocorticoid Induction of Epithelial Sodium Channel Expression in Lung and Renal Epithelia Occurs via trans-Activation of a Hormone Response Element in the 5'⁷-flanking Region of the Human Epithelial Sodium Channel Alpha Subunit Gene. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12431-7.
116. Kishore BK, Ginns SM, Krane CM, Nielsen S, Knepper MA. Cellular localization of P2Y2 purinoceptor in rat renal inner medulla and lung. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2000;278(1):F43-51.
117. Taylor AL, Schwiebert LM, Smith JJ, King C, Jones JR, Sorscher EJ, et al. Epithelial P2X purinergic receptor channel expression and function. *J Clin Invest.* 1999;104(7):875-84.
118. Helms MN, Chen XJ, Ramosevac S, Eaton DC, Jain L. Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(4):L710-722.
119. Chen XJ, Eaton DC, Jain L. β -Adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(4):L609-620.

120. Berdiev BK, Prat A, Cantiello H, Ausiello D, Fuller C, Jovov B, et al. Regulation of Epithelial Sodium Channels by Short Actin Filaments. *J Biol Chem.* 271(30):17704-10.
121. Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, Dagenais A, Berthiaume Y. Impact of β -adrenergic agonist on Na⁺ channel and Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am J Physiol.* 1998;275(2):L414-422.
122. Sugita M, Ferraro P, Dagenais A, Clermont ME, Barbry P, Michel RP, et al. Alveolar Liquid Clearance and Sodium Channel Expression Are Decreased in Transplanted Canine Lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1440-50.
123. Richard C, Shabbir W, Ferraro P, Massé C, Berthiaume Y. Alveolar liquid clearance in lung injury_ Evaluation of the impairment of the β 2-adrenergic agonist response in an ischemia-reperfusion lung injury model. *Respir Physiol Neurobiol.* 2019;259:104-10.
124. Dagenais A, Frechette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, et al. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF- α in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(2):301-11.
125. Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Transforming Growth Factor-B1 Decreases Expression of the Epithelial Sodium Channel α ENaC and Alveolar Epithelial Vectorial Sodium and Fluid Transport via an ERK1/2-dependent Mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278(45):43939-50.
126. Roux J, Kawakatsu H, Gartland B, Pespenti M, Sheppard D, Matthay M, et al. Interleukin-1 β Decreases Expression of the Epithelial Sodium Channel α -Subunit in Alveolar Epithelial Cells via a p38 MAPK-dependent Signaling Pathway. *J Biol Chem.* 2005;280(19):18579-89.
127. Farley RA. Chapter 12 - Active Ion Transport by ATP-Driven Ion Pumps. In: *Cell Physiology Source Book - Essentials of Membrane Biophysics.* 4^e éd. Academic Press (Elsevier); 2011. p. 167-77.
128. Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol.* 2017;8:371.
129. Shyjan AW, Levenson R. Antisera specific for the α 1, α 2, α 3, and β subunits of the sodium-potassium ATPase: differential expression of α and β subunits in rat tissue membranes. *Biochemistry.* 1989;28(11):4531-5.
130. Arystarkhova E, Sweadner KJ. Tissue-specific Expression of the Na,K-ATPase β 3 Subunit. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22405-8.
131. Zhang XL, Danto SI, Borok Z, Eber JT, Martin-Vasallo P, Lubman RL. Identification of Na(+)-K(+)-ATPase β -subunit in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol.* 272((1 Pt 1)):L85-94.

132. Lemas MV, Hamrick M, Takeyasu K, Fambrough DM. 26 amino acids of an extracellular domain of the Na,K-ATPase alpha-subunit are sufficient for assembly with the Na,K-ATPase beta-subunit. *J Biol Chem.* 1994;269(11):8255-9.
133. Gatto C, Wang AX, Kaplan JH. The M4M5 Cytoplasmic Loop of the Na,K-ATPase, Overexpressed in *Escherichia coli*, Binds Nucleoside Triphosphates with the Same Selectivity as the Intact Native Protein. *J Biol Chem.* 1998;273(17):10578-85.
134. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:511-35.
135. Eakle KA, Kabalin MA, Wang SG, Farley RA. The influence of beta subunit structure on the stability of Na⁺/K⁺-ATPase complexes and interaction with K⁺. *J Biol Chem.* 1994;269(9):6550-7.
136. Kirley TL. Inactivation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by beta-mercaptoethanol. Differential sensitivity to reduction of the three beta subunit disulfide bonds. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4227-32.
137. Horowitz B, Eakle KA, Scheiner-Bobis G, Randolph GR, Chen CY, Hitzeman RA, et al. Synthesis and assembly of functional mammalian Na,K-ATPase in yeast. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4189-92.
138. Jorgensen PL, Håkansson KO, Karlsh SJD. Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:817-49.
139. Bertorello AM, Ridge KM, Chibalin AV, Katz AI, Sznajder JI. Isoproterenol increases Na⁺-K⁺-ATPase activity by membrane insertion of α -subunits in lung alveolar cells. *Am J Physiol.* 1999;276(1):L20-27.
140. Saldías FJ, Lecuona E, Comellas AP, Ridge KM, Rutschman DH, Sznajder JI. β -Adrenergic Stimulation Restores Rat Lung Ability to Clear Edema in Ventilator-associated Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):282-7.
141. Saldías FJ, Comellas AP, Pesce L, Lecuona E, Sznajder JI. Dopamine increases lung liquid clearance during mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(1):L136-143.
142. Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(3):C541-566.
143. Planes C, Friedlander G, Loiseau A, Amiel C, Clerici C. Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line. *Am J Physiol.* 1996;271((1 Pt 1)):L70-78.
144. Hardiman KM, Matalon S. Modification of Sodium Transport and Alveolar Fluid Clearance by Hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25(5):538-41.

145. Gamper N, Wang K, éditeurs. Pharmacology of potassium channels. Cham, Switzerland: Springer; 2021. 545 p. (Handbook of experimental pharmacology).
146. Bardou O, Trinh NTN, Brochiero E. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(2):L145-155.
147. Jan LY, Jan YN. How might the diversity of potassium channels be generated? *Trends Neurosci*. 1990;13(10):415-9.
148. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):557-94.
149. Girault A, Privé A, Trinh NTN, Bardou O, Ferraro P, Joubert P, et al. Identification of KvLQT1 K⁺ channels as new regulators of non-small cell lung cancer cell proliferation and migration. *Int J Oncol*. 2014;44(3):838-48.
150. Tian C, Zhu R, Zhu L, Cao Z, Kang T. Potassium Channels: Structures, Diseases, and Modulators. *Chem Biol Drug Des*. 2014;83(1):1-26.
151. Girault A, Brochiero E. Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am J Physiol Cell Physiol*306. 2013;306(4):C307-319.
152. Shieh C, Kirsch G. Mutational Analysis of Ion Conduction and Drug Binding Sites in the Inner Mouth of Voltage-Gated K⁺ Channels. *Biophys J*. 1994;67(67):6.
153. Pascual JM, Shieh CC, Kirsch GE, Brown AM. Multiple Residues Specify External Tetraethylammonium Blockade in Voltage-Gated Potassium Channels. *Biophys J*. 1995;69(2):428-34.
154. Leroy C, Privé A, Bourret J, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291(6):L1207-1219.
155. Lee SY, Maniak PJ, Ingbar DH, O'Grady SM. Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K_v channels that are located in apical membrane. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(6):C1614-1624.
156. Moser SL, Harron SA, Crack J, Fawcett JP, Cowley EA. Multiple KCNQ Potassium Channel Subtypes Mediate Basal Anion Secretion from the Human Airway Epithelial Cell Line Calu-3. *J Membr Biol*. 2008;221(3):153-63.
157. Trinh N, Privé A, Maillé E, Noël J, Brochiero E. EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(5):L866-880.

158. Aubin Vega M, Girault A, Adam D, Chebli J, Privé A, Maillé É, et al. Impact of KvLQT1 potassium channel modulation on alveolar fluid homeostasis in an animal model of thiourea-induced lung edema. *Front Physiol.* 2023;
159. Pusch M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflugers Arch.* 1998;437(1):172-4.
160. Romey G, Attali B, Chouabe C, Abitbol I, Guillemare E, Barhanin J, et al. Molecular Mechanism and Functional Significance of the MinK Control of the KvLQT1 Channel Activity. *J Biol Chem.* 1997;272(27):16713-6.
161. Nakajo K, Kubo Y. KCNQ1 channel modulation by KCNE proteins via the voltage-sensing domain. *J Physiol.* 2015;593(12):2617-25.
162. Splawski I, Tristani-Firouz M, Lehmann M, Sanguinetti M, Keating M. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet.* 1997;17(3):338-40.
163. Abbott GW. Biology of the KCNQ1 Potassium Channel. *New J Sci.* 2014;Article ID 237431:26.
164. Warth R, Barhanin J. The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282(3):R639-648.
165. Teng S, Ma L, Zhen Y, Lin C, Vardanyan V, Pongs O, et al. Novel gene hKCNE4 slows the activation of the KCNQ1 channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(3):808-13.
166. Jespersen T, Grunnet M, Olesen S. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiol Bethesda.* 2005;20:408-16.
167. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leïbovici M, Donger C, Barhanin S J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet.* 1997;15(2):186-9.
168. Casimiro MC, Grinberg A, Huang SP, Pfeifer K. Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange–Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(5):2526-31.
169. Liin SI, Barro-Soria R, Larsson HP. The KCNQ1 channel – remarkable flexibility in gating allows for functional versatility. *J Physiol.* 2015;593(12):260-2615.
170. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wang J, Evans BE, Orme HT, Sanguinetti MC. A Novel Benzodiazepine that Activates Cardiac Slow Delayed Rectifier K_z Currents. *Mol Pharmacol.* 1998;54(1):220-30.
171. Mattmann M, Yu H, Lin Z, Xu K, Huang X, Long S, et al. Identification of (R)-N-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-1-tosylpiperidine-2-carboxamide, ML277, as a novel, potent

- and selective Kv7.1 (KCNQ1) potassium channel activator. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(18):5936-41.
172. Chen L, Peng G, Comollo TW, Zou X, Sampson KJ, Larsson HP, et al. Two small-molecule activators share similar effector sites in the KCNQ1 channel pore but have distinct effects on voltage sensor movements. *Front Physiol*. 2022;13:903050.
173. Trinh NTN, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, et al. Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(4):L870-882.
174. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev*. 2010;90(1):291-366.
175. Schwingshackl A, Teng B, Ghosh M, West AN, Makena P, Gorantla V, et al. Regulation and function of the two-pore-domain (K2P) potassium channel Trek-1 in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(1):L93-102.
176. Monaghan A, Baines D, Kemp P, Olver R. Inwardly rectifying K⁺ currents of alveolar type II cells isolated from fetal guinea-pig lung :regulation by G protein- and Mg²⁺-dependent pathways. *Pflugers Arch*. 1997;433(3):294-303.
177. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function in transepithelial transport of KATP channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(5):L1027-1037.
178. Bardou O, Privé A, Migneault F, Roy-Camille K, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(7):1682-90.
179. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81(2):133-76.
180. Patel AJ, Honore E. Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J*. 18(1):221-7.
181. Buckler K, Williams B, Honore E. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol*. 2000;525 Pt 1(Pt 1):135-42.
182. Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinauer MC, Cutz E. NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: Evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(8):4374-9.

183. Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Miera EVSD, et al. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K_v channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(23):13182-7.
184. Platoshyn O, Yu Y, Golovina VA, McDaniel SS, Krick S, Li L, et al. Chronic hypoxia decreases KV channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(4):L801-812.
185. Jovanovic S, Crawford R, Ranki H, Jovanovic A. Large Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Sense Acute Changes in Oxygen Tension in Alveolar Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(3):363-72.
186. Grahammer F, Warth R, Barhanin J, Bleich M, Hug M. The Small Conductance K⁺ Channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42268-75.
187. Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, et al. Modulation of Ca²⁺-Activated Cl⁻ Secretion by Basolateral K⁺ Channels in Human Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *Pediatr Res*. 2003;53:608-18.
188. Matos JE, Sausbier M, Beranek G, Sausbier U, Ruth P, Leipziger J. Role of cholinergic-activated KCa1.1 (BK), KCa3.1 (SK4) and KV7.1 (KCNQ1) channels in mouse colonic Cl⁻ secretion. *Acta Physiol*. 2007;189(3):251-8.
189. Sakuma T, Takahashi K, Ohya N, Nakada T, Matthay MA. Effects of ATP-Sensitive Potassium Channel Opener on Potassium Transport and Alveolar Fluid Clearance in the Resected Human Lung. *Pharmacol Toxicol*. 1998;83(1):16-22.
190. Berthiaume Y, Matthay MA. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;159(3):350-9.
191. Redente EF, Jakubzick CV, Martin TR, Riches DW. Innate immunity. In: Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 6^e éd. États-Unis: Elsevier Saunders; 2016. p. 184-205.
192. Kulle A, Thanabalasuriar A, Cohen TS, Szydlowska M. Resident macrophages of the lung and liver: The guardians of our tissues. *Front Immunol*. 2022;13(1029085).
193. Hu G, Christman JW. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Front Immunol*. 2019;10.
194. Bissonnette EY, Lauzon-Joset JF, Debley JS, Ziegler SF. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;11(583042).

195. Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH. MafB/c-Maf Deficiency Enables Self-Renewal of Differentiated Functional Macrophages. *Science*. 2009;326(5954):876-871.
196. Neupane A, Willson M, Chojnacki A, Vargas E, Morehouse C, Carestia A, et al. Patrolling Alveolar Macrophages Conceal Bacteria from the Immune System to Maintain Homeostasis. *Cell*. 2020;183(1):110-25.
197. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Toews GB, Westwick J, Strieter RM. Interleukin-8 Gene Expression by a Pulmonary Epithelial Cell Line. *J Clin Invest*. 1990;86(6):1945-53.
198. Hallstrand TS, Hackett TL, Altemeier WA, Matute-Bello G, Hansbro PM, Knight DA. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clin Immunol*. 2014;151(1):1-15.
199. Scharf S, Vardarova K, Lang F, Schmeck B, Opitz B, Flieger A, et al. Legionella pneumophila induces human beta Defensin-3 in pulmonary cells. *Respir Res*. 2010;11(93).
200. Jang BC, Lim KJ, Suh MH, Park JG, Suh SI. Dexamethasone suppresses interleukin-1b-induced human b-defensin 2 mRNA expression: involvement of p38 MAPK, JNK, MKP-1, and NF- κ B transcriptional factor in A549 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51(1):171-84.
201. Jiang-Shieh YF, Chien HF, Chang CY, Wei TS, Chiu MM, Chen HM, et al. Distribution and expression of CD200 in the rat respiratory system under normal and endotoxin- induced pathological conditions. *J Anat*. 2010;216(3):407-16.
202. Hu JF. Inhibition of the PD-1/PD-L1 signaling pathway enhances innate immune response of alveolar macrophages to mycobacterium tuberculosis in mice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2020;60(101842).
203. Barclay AN. The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:25-50.
204. Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, Cohen TS, Prince AS, Bhattacharya J. Sessile alveolar macrophages modulate immunity through connexin 43-based epithelial communication. *Nature*. 2014;506(7489):503-6.
205. Lanyu Z, Feilong H. Emerging role of extracellular vesicles in lung injury and inflammation. *Biomed Pharmacother*. 2019;113(108748).
206. Immler R, Simon SI, Sperandio M. Calcium signaling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. *Eur J Clin Invest*. 2019;48 Suppl 2:e12964.
207. Henríquez C, Riquelme TT, Vera D, Julio-Kalajzić F, Ehrenfeld P, Melvin JE, et al. The calcium-activated potassium channel KCa3.1 plays a central role in the chemotactic response of mammalian neutrophils. *Acta Physiol*. 2017;216(1):132-45.

208. Kindzelskii AL, Petty HR. Ion channel clustering enhances weak electric field detection by neutrophils: apparent roles of SKF96365-sensitive cation channels and myeloperoxidase trafficking in cellular responses. *Eur Biophys J.* 2005;35(1):1-26.
209. Immler R, Nadolni W, Bertsch A, Morikis V, Rohwedder I, Masgrau-Alsina S, et al. The voltage-gated potassium channel KV1.3 regulates neutrophil recruitment during inflammation. *Cardiovasc Res.* 2022;118(5):1289-302.
210. Bittner S, Budde T, Wiendl H, Meuth SG. From the Background to the Spotlight: TASK Channels in Pathological Conditions. *Brain Pathol.* 2010;20(6):999-1009.
211. Pompermayer K, Amaral FA, Fagundes CT, Vieira AT, Cunha FQ, Teixeira MM, et al. Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2007;556(1-3):215-22.
212. Ling MY. Up-regulated ATP-sensitive potassium channels play a role in increased inflammation and plaque vulnerability in macrophages. *Atherosclerosis.* 2013;226(2):348-55.
213. Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sanchez-Tillo E, Lopez-Iglesias C, et al. Differential Voltage-dependent K⁺ Channel Responses during Proliferation and Activation in Macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46307-20.
214. Krause KH, Welsh MJ. Voltage-dependent and Ca²⁺-activated Ion Channels in Human Neutrophils. *J Clin Invest.* 1990;85(2):491-8.
215. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(6):L715-731.
216. Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114((Pt 20)):3583-90.
217. Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 2002;4(4):E97-100.
218. Schwab A, Hanley P, Fabian A, Stock C. Potassium Channels Keep Mobile Cells on the Go. *Physiol Bethesda.* 2008;23:212-20.
219. Xiao H, Li DX, Liu M. Knowledge translation: airway epithelial cell migration and respiratory diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(24):4149-62.
220. Yano T, Mason RJ, Pan T, Deterding RR, Nielsen LD, Shannon JM. KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(6):L1146-1158.

221. Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest.* 2013;123(7):3025-36.
222. Chan M, Liu Y. Function of epithelial stem cell in the repair of alveolar injury. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):170.
223. Kobayashi Y, Tata A, Konkimalla A, Katsura H, Lee R, Ou J, et al. Persistence of a regeneration-associated, transitional alveolar epithelial cell state in pulmonary fibrosis. *Nat Cell Biol.* 2020;22(8):934-46.
224. Strunz M, Simon L, Ansari M, Kathiriya J, Angelidis I, Mayr C, et al. Alveolar regeneration through a Krt8+ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nat Commun.* 11(1):3559.
225. Yee M, Domm W, Gelein R, Bentley K, Kottmann R, Sime P, et al. Alternative Progenitor Lineages Regenerate the Adult Lung Depleted of Alveolar Epithelial Type 2 Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(4):453-64.
226. Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Arnam JSV, Krause DS. Lack of a Fusion Requirement for Development of Bone Marrow-Derived Epithelia. *Science.* 2004;305(5680):90-3.
227. Potier M, Joulin V, Besson P, Jourdan ML, LeGuennec JY, Bougnoux P, et al. Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(11):2946-53.
228. Gomez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knotgen H, Sanchez A, Hettmann T, Ossipov D, et al. Monoclonal Antibody Blockade of the Human Eag1 Potassium Channel Function Exerts Antitumor Activity. *Cancer Res.* 2007;67(15):7343-9.
229. Wu WKK, Li GR, Wong TM, Wang JY, Yu L, Cho CH. Involvement of voltage-gated K⁺ and Na⁺ channels in gastric epithelial cell migration. *Mol Cell Biochem.* 2008;308(1-2):219-26.
230. Rampino T, Gregorini M, Guidetti C, Brogginini M, Marchini S, Bonomi R, et al. KCNA1 and TRPC6 ion channels and NHE1 exchanger operate the biological outcome of HGF/scatter factor. *Growth Factors.* 2007;25(6):382-91.
231. Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L. Modulation of Rabbit Corneal Epithelial Cell Proliferation by Growth Factor-regulated K⁺ Channel Activity. *J Membr Biol.* 2003;196(1):41-50.
232. Pedersen SF, Hoffmann EK, Mills JW. The cytoskeleton and cell volume regulation &. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol.* 2001;130(3):385-99.

233. Wei J feng, Wei L, Zhou X, Lu Z yang, Francis K, Hu X yang, et al. Formation of Kv2.1-FAK Complex as a Mechanism of FAK Activation, Cell Polarization and Enhanced Motility. *J Cell Physiol.* 2009;217(2):544-57.
234. Girault A, Chebli J, Privé A, Trinh N, Maillé E, Grygorczyk R, et al. Complementary roles of KCa3.1 channels and β 1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir Res.* 2015;16(1):100.
235. Lesur O, Arsalane K, Lane D. Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *Am J Physiol.* 1996;270((3 Pt 1)):L311-319.
236. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2(7511):319-23.
237. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149((3 Pt 1)):818-24.
238. ARDS Definition Task Force, Ranieri V, Rubenfeld G, Thompson B, Ferguson N, Caldwell E, et al. Acute Respiratory Distress SyndromeThe Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307(23):2526-33.
239. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA.* 2016;315(8):788-800.
240. Saguil A, Fargo MV. Acute Respiratory Distress Syndrome: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2020;101(12):730-8.
241. Calfee CS, Janz DR, Bernard GR, May AK, Kangelaris KN, Matthay MA, et al. Distinct Molecular Phenotypes of Direct vs Indirect ARDS in Single-Center and Multicenter Studies. *Chest.* 147(6):1539-48.
242. Bos L, Schouten L, van Vught L, Wiewel M, Ong D, Cremer O, et al. Identification and validation of distinct biological phenotypes in patients with acute respiratory distress syndrome by cluster analysis. *Thorax.* 2018;72(10):876-83.
243. Calfee C, Delucchi K, Parsons P, Thompson B, Ware L, Matthay M, et al. Latent Class Analysis of ARDS Subphenotypes: Analysis of Data From Two Randomized Controlled Trials. *Lancet Respir Med.* 2015;2(8):611-20.
244. Heijnen NFL, Hagens LA, Smit MR, Schultz MJ. Biological subphenotypes of acute respiratory distress syndrome may not reflect differences in alveolar inflammation. *Physiol Rep.* 2021;9(3):e14693.
245. Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet.* 2022;400(10358):1145-56.

246. Matthay M, Zemans R, Zimmerman G, Arabi Y, Beitler J, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Primer*. 2019;5(1):18.
247. Mokra D. Acute Lung Injury – From Pathophysiology to Treatment. *Physiol Res*. 2020;69((Suppl 3)):S353-366.
248. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;40(1):31-9.
249. Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche J, Combes A, Dreyfuss D, et al. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care*. 2019;9(1):69.
250. Duggal A, Ganapathy A, Ratnapalan M, Adhikari NKJ. Pharmacological treatments for acute respiratory distress syndrome: systematic review. *Minerva Anesthesiol*. 2015;81(5):567-88.
251. Meduri GU, Bridges L, Shih MC, Marik PE, Siemieniuk R, Kocak M. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. *Intensive Care Med*. 2016;42(5):829-40.
252. Foster JR. Steroids for early acute respiratory distress syndrome: Critical appraisal of Meduri GU, Golden E, Freire AX, et al: Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: Results of a randomized controlled trial. *Chest* 2007; 131:954 –963. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11(3):404-7.
253. Bein T, Briegel J, Annane D. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: yes. *Intensive Care Med*. 2016;42(5):918-20.
254. Thompson BT, Ranieri VM. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: no. *Intensive Care Med*. 2016;42(5):921-3.
255. Rios P, Radhakrishnan A, Darvesh N, Antony J, Williams C, Ramkissoon N, et al. Comparative-effectiveness research of COVID--19 treatment: a rapid scoping review. *BMJ Open*. 2022;12(6):e045115.
256. Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review of Analytical Approaches, Pathologic Features, and Common Measurements. *Toxicol Pathol*. 2015;43(8):1074-92.
257. Uhlig S, Kuebler WM. Difficulties in modelling ARDS. *Pulm Circ*. 2018;8(2):2045894018766737.
258. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(5):725-38.

259. American Thoracic Society. Update on the Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2022;66(2):e1-d14.
260. Reiss L, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6-7):590-601.
261. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(3):L379-399.
262. Richard JC, Guérin C. Modèles animaux de SDRA. *Réanimation.* 2006;15(1):21-8.
263. Sipahi EY, Atalay F. Experimental Models of Acute Lung Injury. *Eurasian J Pulmonol.* 2014;16:69-77.
264. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Path.* 2002;83(3):111-9.
265. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, Castro-Faria MV, Castro-Faria-Neto HC. Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered Lung Injury and Inflammation. *Mediat Inflamm.* 2015;2015:260465.
266. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, Zhou X, Zwischenberger JB. Large-Animal Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2012;93(4):1331-9.
267. Hesse F, Loosli C. The lining of the alveoli in mice, rats, dogs, and frogs following acute pulmonary edema produced by ANTU poisoning. *Anat Rec.* 1949;105(2):299-323.
268. Scott AM, Powell GM, Upshall DG, Curtis CG. Pulmonary Toxicity of Thioureas in the Rat. *Env Health Perspect.* 85:43-50.
269. Menezes S, Bozza P, Neto H, Laranjeira A, Negri E, Capelozzi V, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol.* 2005;98(5):1777-83.
270. Fard N, Saffari A, Emami G, Hofer S, Kauczor H, Mehrabi A. Acute respiratory distress syndrome induction by pulmonary ischemia-reperfusion injury in large animal models. *J Surg Res.* 189(2):274-84.
271. Hoegl S, Burns N, Mills TW, Blackburn MR, Eltzschig HK, Vohwinkel CU. Capturing the multifactorial nature of ARDS – “Two-hit” approach to model murine acute lung injury. *Physiol Rep.* 2018;6(6):e13648,.
272. Rocco P, Neimen G. ARDS: what experimental models have taught us. *Int Care Med.* 2016;42:806-10.

273. Aubin Vega M, Chupin C, Pascariu M, Privé A, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice. *Physiol Rep.* 2019;7(21):e14253.
274. Matthay M, Ware L, Zimmerman G. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2731-40.
275. Johnson ER, Matthay MM. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(4):243-52.
276. Silva PL, Pelosi P, Rocco PR. Personalized pharmacological therapy for ARDS: a light at the end of the tunnel. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(1):49-61.
277. Tomazini B, Maia I, Cavalcanti A, Avezum A, Lopes R, Bueno F, et al. Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2020;324(13):1307-16.
278. Aubin Vega M, Chupin C, Massé C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin. *Exp Physiol.* 2021;106:1110-9.
279. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact Epithelial Barrier Function Is Critical for the Resolution of Alveolar Edema in Humans. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142((6 Pt 1)):1250-7.
280. Pires-Neto R, Nascimento E, Souza J, Rodrigues A, Bernardi F, Mauad T, et al. Expression of water and ion channels proteins in acute respiratory distress syndrome from different etiologies. *Eur Respir J.* 2014;44:3936.
281. Vadász I, Sznajder JI. Gas Exchange Disturbances Regulate Alveolar Fluid Clearance during Acute Lung Injury. *Front Immunol.* 2017;8(757).
282. Wynne BM, Li Z, Linck V, Hoover RS, Ma HP, Eaton DC. Regulation of Lung Epithelial Sodium Channels by Cytokines and Chemokines. *Front Immunol.* 2017;8(766).
283. Fronius M. Treatment of Pulmonary Edema by ENaC Activators/Stimulators. *Curr Mol Pharmacol.* 2013;6(1):13-27.
284. Schwingshackl A, Teng B, Makena P, Ghosh M, Sinclair SE, Luellen C, et al. Deficiency of the Two-Pore-Domain Potassium (K2P) Channel TREK-1 Promotes Hyperoxia-Induced Lung Injury. *Crit Care Med.* 2014;42(22):e692-701.
285. Zhou L, Köhncke C, Roepke T, Abbott G. The KCNE2 potassium channel β subunit is required for normal lung function and resilience to ischemia and reperfusion injury. *FASEB J.* 2019;33(9):9762-74.

286. Kabir K, Gelinas JP, Chen M, Chen D, Zhang D, Luo X, et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock*. 2002;17(4):300-3.
287. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams M. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity.pdf. *Am Rev Respir Dis*. 1986;134(1):141-5.
288. Sordi R, Fernandes D, Heckert B, Assreuy J. Early potassium channel blockade improves sepsis-induced organ damage and cardiovascular dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2011;163(6):1289-301.
289. Zyrianova T, Lopez B, Olcese R, Belperio J, Waters C, Wong L, et al. K2P2.1 (TREK-1) potassium channel activation protects against hyperoxia-induced lung injury. *Sci Rep*. 2020;10(1):22011.
290. Zyrianova T, Lopez B, Zou K, Gu C, Pham D, Talapaneni S, et al. Activation of TREK-1 (K2P2.1) potassium channels protects against influenza A-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2023;324(1):L64-75.
291. Tang DG, Pavot DR, Mouria MM, Holwitt DM, Cohen NM. Warm Ischemia Lung Protection With Pinacidil: An ATP Regulated Potassium Channel Opener. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(2):385-90.
292. Sadikot RT, Jansen ED, Blackwell TR, Zoia O, Yull F, Christman JW, et al. High-Dose Dexamethasone Accentuates Nuclear Factor- κ B Activation in Endotoxin-Treated Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:873-8.
293. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*. 1996;156(11):4422-8.
294. Park JH, Jiang Y, Zhou J, Gong H, Mohapatra A, Heo J, et al. Genetically engineered cell membrane-coated nanoparticles for targeted delivery of dexamethasone to inflamed lungs. *Sci Adv*. 2021;7(25):eabf7820.
295. Volpe BT, Lin W, Thrall RS. Effect of Intratracheal Dexamethasone on Oleic Acid-induced Lung Injury in the Rat. *Chest*. 1994;105(2):583-7.
296. Dagenais A, Frechette R, Clermont ME, Masse C, Prive A, Brochiero E, et al. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L1220-31.
297. Headley L, Bi W, Wilson C, Collum SD, Chavez M, Darwiche T, et al. Low-dose administration of bleomycin leads to early alterations in lung mechanics. *Exp Physiol*. 2018;103(12):1692-703.
298. Takahashi Y, Saito M, Usuda H, Takahashi T, Watanabe S, Hanita T, et al. Direct administration of the non-competitive interleukin-1 receptor antagonist rytvela transiently

- reduced intrauterine inflammation in an extremely preterm sheep model of chorioamnionitis. *PLoS One*. 2021;16(9):e0257847.
299. Egli M, Duplain H, Lepori M, Cook S, Nicod P, Hummler E, et al. Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol*. 2004;560((Pt 3)):857-65.
300. Chen XJ, Seth S, Yue G, Kamat P, Compans RW, Guidot D, et al. Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(2):L366-373.
301. Hagiwara T, Yoshida S, Hidaka Y. Gene expression of the concentration-sensitive sodium channel is suppressed in lipopolysaccharide-in. *Exp Lung Res*. 2017;43(3):150-7.
302. Emr BM, Roy S, Kollisch-Singule M, Gatto LA, Lin X, Young JL, et al. Electroporation mediated gene delivery of Na⁺,K⁺-ATPase and ENaC subunits to the lung attenuates acute respiratory distress syndrome in a two-hit porcine model. *Shock*. 2016;43(1):16-23.
303. Vallon V, Grahammer F, Volkl H, Sandu CD, Richter K, Rexhepaj R, et al. KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(49):17864-9.
304. Boini KM, Graf D, Hennige AM, Koka S, Kempe DS, Wang K, et al. Enhanced insulin sensitivity of gene-targeted mice lacking functional KCNQ1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(6):R1695-1701.
305. Villanueva S, Burgos J, López-Cayuqueo KI, Lai KMV, Valenzuela DM, Cid LP, et al. Cleft Palate, Moderate Lung Developmental Retardation and Early Postnatal Lethality in Mice Deficient in the Kir7.1 Inwardly Rectifying K⁺ Channel. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139284.
306. Schwingshackl A, Lopez B, Teng B, Luellen C, Lesage F, Belperio J, et al. Hyperoxia treatment of TREK-1/TREK-2/TRAAK-deficient mice is associated with a reduction in surfactant proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(6):L1030-1046.
307. Chiang EY, Li T, Jeet S, Peng I, Zhang J, Lee W, et al. Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions. *Nat Commun*. 2017;8:14644.
308. Kallet RH, Lipnick MS, Zhuo H, Pangilinan LP, Gomez A. Characteristics of Nonpulmonary Organ Dysfunction at Onset of ARDS Based on the Berlin Definition. *Respir Care*. 2019;64(5).
309. Cowley PM, Roberts CR, Baker AJ. Monitoring the Health Status of Mice with Bleomycin-induced Lung Injury by Using Body Condition Scoring. *Comp Med*. 2019;69(2):95-102.
310. Miyamoto H, Takemura S, Minamiyama Y, Tsukioka T, Toda M, Nishiyama N, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis model by small amount of lipopolysaccharide in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2022;70(2):129-39.

311. Shi Y, Dong M, Zhou Y, Li W, Gao Y, Han L, et al. Distal airway stem cells ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):161.
312. Bai X, Zhao G, Chen Q, Li Z, Gao M, Ho W, et al. Inhaled siRNA nanoparticles targeting IL11 inhibit lung fibrosis and improve pulmonary function post-bleomycin challenge. *Sci Adv.* 2022;8(25):eabn7162.
313. Lopez-Rodrigue E, Gay-Jordi G, Knudsen L, Ochs M, Serrano-Mollar M. Improved Alveolar Dynamics and Structure After Alveolar Epithelial Type II Cell Transplantation in Bleomycin Induced Lung Fibrosis. *Front Med Lausanne.* 2021;8:640020.
314. Han DY, Nie HG, Gu X, Nayak RC, Su XF, Fu J, et al. K⁺channel openers restore verapamil-inhibited lung fluid resolution and transepithelial ion transport. *Respir Res.* 2010;11(1):65.
315. Abe K, Horiguchi T, Enzan K, Masaki Y, Nishikawa T, Kimura T. Nicorandil, a KATP Channel Opener, Attenuates Ischemia–Reperfusion Injury in Isolated Rat Lungs. *Lung.* 2020;198(2):315-21.
316. Vega G, Guequén A, Philp AR, Gianotti A, Arzola L, Villalón M, et al. Lack of Kcnn4 improves mucociliary clearance in muco-obstructive lung disease. *JCI Insight.* 2020;5(16):e140076.
317. Petersen AG, Lind PC, Mogensen S, Jensen AB, Granfeldt A, Simonsen U. Treatment with senicapoc, a KCa3.1 channel blocker, alleviates hypoxaemia in a mouse model of acute respiratory distress syndrome. *Br J Pharmacol.* 2022;179(10):2175-92.
318. Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, et al. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-induced Inflammation. *Immunity.* 2019;49(1):56-65.e4.
319. Drinkall S, Lawrence CB, Ossola B, Russell S, Bender C, Brice NB, et al. The Two pore Potassium Channel THIK-1 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Glia.* 2022;70(7):1301-16.
320. He M, Shi W, Yu M, Li X, Xu J, Zhu J, et al. Nicorandil Attenuates LPS-Induced Acute Lung Injury by Pulmonary Endothelial Cell Protection via NF-κB and MAPK Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:4957646.
321. Lin D, Halilovic A, Yue P, Bellner L, Wang K, Wang L, et al. Inhibition of miR-205 Impairs the Wound-Healing Process in Human Corneal Epithelial Cells by Targeting KIR4. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(9):6167-78.
322. Zhang W, Bei M. Kcnh2 and Kcnj8 interactively regulate skin wound healing and regeneration. *Wound Repair Regen.* 2015;23(6):797-806.
323. Li B, Ge N, Pan Z, Hou C, Xie K, Wang D, et al. KCNJ14 knockdown significantly inhibited the proliferation and migration of colorectal cells. *BMC Med Genomics.* 2022;15(1):194.

324. Wu X, Yu X. Overexpression of KCNJ4 correlates with cancer progression and unfavorable prognosis in lung adenocarcinoma. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019;33(4):e22270.
325. Schwingshackl A, Roan E, Teng B, Waters CM. TREK-1 Regulates Cytokine Secretion from Cultured Human Alveolar Epithelial Cells Independently of Cytoskeletal Rearrangements. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126781.
326. deHart GW, Jin T, McCloskey DE, Pegg AE, Sheppard D. The alpha9beta1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(20):7188-93.
327. Ojo OO, Ryu MH, Jha A, Unruh H, Halayko AJ. High-mobility group box 1 promotes extracellular matrix synthesis and wound repair in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(11):L1354-1366.
328. Matthay MA, Calfee C, Zhuo H, Thompson B, Wilson J, Levitt J, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7(2):154-62.

Annexes

Annexe A : Article #1

Titre: **Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice**

Statut: Publié dans *Physiological Reports* en 2019

ORIGINAL RESEARCH

Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice

Mélissa Aubin Vega^{1,2,*}, Cécile Chupin^{1,2,*}, Mihai Pascariu^{2,3}, Anik Privé¹, André Dagenais³, Yves Berthiaume^{1,2,3,†} & Emmanuelle Brochiero^{1,2,†} 

1 Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

2 Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

3 Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada

Keywords

Acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, bleomycin, dexamethasone, edema, inflammation, repair.

Correspondence

Emmanuelle Brochiero, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Pavillon R, 900 rue St-Denis, Montréal H2X0A9, Québec, Canada.
Tel: +1-514-890-8000 x 14691
Fax: +1-514-412-7655
E-mail: emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

Funding Information

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR to YB and CIHR grant 230753 and PJT153406 to EB), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, discovery grant RGPIN-2016-04378 to EB), CRCHUM and Université de Montréal (scholarship to EB). MAV also acknowledges studentships from the NSERC and the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). The CRCHUM is supported by a Centre grant from FRQ-S. Authors are members of the Respiratory Health Network of Québec. The funders have no role in study design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Abstract

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) features an exudative phase characterized by alveolar damage, lung edema and exacerbated inflammatory response. Given their anti-inflammatory properties, the potential therapeutic effect of corticosteroids has been evaluated in ARDS clinical trials and experimental models of ALI. These studies produced contradictory results. Therefore, our aim was to investigate the effects of dexamethasone in an animal model of bleomycin-induced acute lung injury and then to determine if the lack of response could be related to an impairment in repair ability of alveolar epithelial cells after injury. NMRI mice were challenged with bleomycin and then treated daily with dexamethasone or saline. Bronchoalveolar lavages (BAL) and lungs were collected for assessment of the inflammatory response and wet/dry ratio (lung edema) and for histological analyses. The effect of bleomycin and dexamethasone on wound repair was also evaluated in vitro on primary alveolar epithelial cell (ATII) cultures. Our data first showed that dexamethasone treatment did not reduce the weight loss or mortality rates induced by bleomycin. Although the TNF- α level in BAL of bleomycin-treated mice was reduced by dexamethasone, the neutrophil infiltration remained unchanged. Dexamethasone also failed to reduce lung edema and damage scores. Finally, bleomycin elicited a time- and dose-dependent reduction in repair rates of ATII cell cultures. This inhibitory effect was further enhanced by dexamethasone, which also affected the expression of β 3- and β 6-integrins, key proteins of alveolar repair. Altogether, our data indicate that the inability of dexamethasone to improve the resolution of ALI might be due to its deleterious effect on the alveolar epithelium repair.

Received: 5 June 2019; Revised: 5 September 2019; Accepted: 8 September 2019

doi: 10.14814/phy2.14253

Physiol Rep, 7 (21), 2019, e14253,
<https://doi.org/10.14814/phy2.14253>

*Co-first authors.

†Co-senior authors.

Introduction

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) (Ranieri et al. 2012; Fitzgerald et al. 2014), a severe form of respiratory failure, remains one of the leading causes of mortality both in adults and children in intensive care units. Various disorders, either direct (e.g., pneumonia, gastric content aspiration) or indirect (e.g., sepsis, trauma), are associated with the development of ARDS (Monahan 2013; Ware and Matthay 2000). However, regardless of the causes, ARDS features overlapping exudative, proliferative and fibrotic phases. The acute exudative phase is characterized by extensive alveolar epithelial and endothelial damage, eliciting alveolar edema, neutrophil infiltration, high levels of chemokines/cytokines and decreased lung compliance (Ware and Matthay 2000; Monahan 2013). Collagen deposition and fibroproliferation, competing with epithelial repair, can rapidly progress toward irreversible pulmonary fibrosis, ultimately leading to respiratory failure (Ware and Matthay 2000; Shimabukuro et al. 2003; Ranieri et al. 2012). Therefore, the resolution of the acute phase is pivotal for ARDS recovery.

Although improvements in mechanical ventilation procedures have been associated with increased survival over the last decades (Ranieri et al. 2012; Fitzgerald et al. 2014), mortality rates (30–45%) still remain unacceptably high, and effective, noninvasive pharmacological therapies are needed. Because the inflammatory response is a key determinant of ARDS, several studies have evaluated the efficiency of anti-inflammatory therapies. One of the most studied therapy has been systemic corticosteroids. Clinical trials on ARDS patients and subsequent meta analyses (Steinberg et al. 2006; Foster 2010; Yehya et al. 2015; Meduri et al. 2016; Kimura et al. 2016; Tongyoo et al. 2016; Standiford and Ward 2016; Yang et al. 2017; Fan et al. 2018) as well as experimental studies in animal models of acute lung injury (ALI) (Chen et al. 2006; Leite-Junior et al. 2008; Wang et al. 2008; Xu et al. 2009; Yubero et al. 2012; Hegeman et al. 2013; Engel et al. 2015) have indicated that glucocorticoids (e.g., methylprednisolone, dexamethasone, hydrocortisone) elicit variable effects as a function of the dose, the route of administration, the time to treatment initiation and duration, the age of the patient, the cause of ARDS/type of ALI model and/or the measured outcomes. Therefore, the available evidence for glucocorticoids benefits in ARDS is conflicting and the use of these treatments in ARDS patients are still subject to debate (Bein et al. 2016; Bihari et al. 2016; Seam and Suffredini 2016; Thompson and Ranieri 2016; Mac and McAuley 2017; Meduri and Siemieniuk 2017; Bos et al. 2018).

The goal of our study was first to dissect the effect of daily treatments with dexamethasone in an experimental

model of ALI in mice. We opted for the well-characterized model of bleomycin-induced lung injury and focused our study on the acute exudative phase, featuring an endothelial/alveolar epithelial damage, lung edema, neutrophil infiltration and decreased lung function (over a 7-day period), before establishment of fibrosis (day-12–21) (Matute-Bello et al. 2008; Saito et al. 2008; Goto et al. 2010). The effect of the dexamethasone treatment was evaluated by assessing mouse survival, lung edema, inflammatory response and alveolar injury after the bleomycin challenge. Our data indicated that dexamethasone reduced TNF- α levels but failed to improve mouse survival or to reduce lung edema, neutrophil infiltration and injury scores after bleomycin. We then hypothesized that dexamethasone may impair the repair ability of alveolar epithelial cells after injury. We thus analyzed the effect of bleomycin and dexamethasone in vitro on the wound healing of primary alveolar epithelial cell cultures and showed that dexamethasone worsened the deleterious effect of bleomycin on the repair rates.

Materials and Methods

In vivo experimental design

Wild-type NMRI mice (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA) were kindly gifted by E. Hummler (Lauzanne, Switzerland). All procedures were conducted according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC), and the experimental protocol was approved by the Institutional Animal Protection Committee (CIPA) of the Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Animals were sheltered under standard conditions with food and water provided ad libitum. Experiments were conducted on 7- to 10-week-old male mice, randomly divided into 4 groups: Ctl (control, instillation of saline and daily intraperitoneal (i.p.) treatment with saline), Bleo (instillation with bleomycin and daily i.p. treatment with saline), Dex (instillation with saline and daily i.p. treatment with dexamethasone) and Bleo + Dex (instillation with bleomycin and daily i.p. treatment with dexamethasone). More precisely, mice were anesthetized at day 1 with a solution (0.01 mL/g) of 13% ketamine (100 mg/mL) and 1.3% xylazine (20 mg/mL) in 0.9% saline. Then, animals were instilled intratracheally (i.t.) with saline (0.9%, 50 μ L) or bleomycin (MaynePharma Canada, QC, Canada, 4 U/kg, 50 μ L) following a modified non-surgical and non-damaging method (Guilbault et al. 2005). Immediately after instillation of saline or bleomycin, mice were treated with dexamethasone (Sandoz Canada, QC, Canada, 0.5 mg/kg, 100 μ L) or vehicle (saline 0.9%, 100 μ L) by i.p.

Treatments (saline or dexamethasone) were repeated daily and outcomes (see below) were measured 3, 7 and/or 12 days after the bleomycin challenge, corresponding to the development of acute lung injury, as described in the literature (Matute-Bello et al. 2008; Saito et al. 2008; Goto et al. 2010). As supplementary experiments (Fig. S1), a group was treated with methylprednisolone (NovoPharm, QC, Canada, 1 mg/kg, 100 μ L, daily, i.p. treatment).

Mice survival rates and weight variation

The mice weight variations were calculated from the measured weights at each time point (days 3, 7 and 12), including before sacrifice of mice reaching the endpoints (see below), and reported as % of the initial weight before the bleomycin challenge. In compliance with the CCAC standards and following daily animal assessment by the CRCHUM animal care personnel, mice reaching endpoints (respiratory failure, prostration, uncontrollable pain, dehydration, or loss of more than 30% of the initial weight), were sacrificed according to the procedure approved by the CRCHUM institutional animal care committee. To avoid a potential bias by studying the animals with the better outcomes, animals reaching endpoints were included in the calculation of the weight variation and survival rates (which were reported as % of the live mice in each group at 3, 7 and 12 days after the beginning of the bleomycin challenge). Subsequent experiments, for the measurement of lung edema, tissue injury and inflammatory response (see below), were performed during the acute exudative phase (day 3 and 7). It has to be noted that at these time points no (day 3) or small (day 7, <10%) mortality rates were observed.

Edema index (wet/dry ratio)

After euthanasia (with 0.02 mL/g, ketamine-xylazine) on days 3 and 7, the inferior *vena cava* was severed, the lungs were removed and directly weighed (wet weight). Lungs were heated to 95°C for 24 h to measure the dry weight and then to calculate the wet/dry ratio.

Bronchoalveolar lavages (BAL)

In another series of experiments, BAL were performed after mouse euthanasia (at days 3 and 7, in each condition) by instillation of saline (1 mL) through a catheter and then gentle aspiration. Six repeated BAL (from the same mouse) were collected and pooled on ice before centrifugation (200g, 4°C, 8 min). The supernatants were stored at -80°C until subsequent use to determine protein concentration and TNF- α levels.

The protein concentration in BAL supernatants was evaluated by the Bradford method (Bio-Rad Life Science,

Mississauga, ON, Canada). TNF- α levels in BAL supernatant samples were measured by AlphaLISA technology (AL505 C/F, PerkinElmer, Montreal, QC, Canada). Following the manufacturer's recommendation, experiments were performed in triplicate at room temperature, and TNF- α concentrations (pg/mL) were estimated from a TNF- α standard curve (dynamic range from 2.0 to 30,000 pg/mL) after reading with the EnVision-Alpha Reader (PerkinElmer).

Cell pellets were resuspended in 500 μ L of PBS for quantification of the total cell count. The cell suspensions were then diluted at a density of 1×10^6 cells/mL, cyto-centrifuged (300 rpm, 3 min, Shandon Cytospin 3 Centrifuge, Block Scientific, NY, USA) onto glass slides (4×10^4 cells/slide) and stained with Hema-3[®] (Fisher, US). The differential cell count (number of neutrophils, macrophages, lymphocytes and eosinophils (reported as percentage) among a total of 400 leukocytes) was then determined.

Histological analysis and lung damage severity scores

Mice lungs, collected 7 days after the initial bleomycin challenge, were fixed by immersion in a 10% formalin solution, embedded in paraffin and the sections were stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols at the Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC, Université de Montréal). Blind histological analysis was performed by Dr. Louis Gaboury (pathologist, Histology and Molecular Pathology research unit, University of Montréal), who defined a qualitative severity score (from 0 to 4), adapted from a well-recognized scoring system to evaluate experimental ALI in animals (Matute-Bello et al. 2011) and incorporating the following criteria: the presence of mononucleated cells/macrophages, polymorphonuclear, fibrinous exudate/hyaline membranes, widening of the septae, regenerative atypias/karyomegaly, intraalveolar hemorrhage, pneumocyte sloughing/cell debris, bronchial exudate, congestion/edema and consolidation. The results were expressed as the percentage of mice with each severity grade (from 0 to 4) of lung damage within the treatment group. Specimens were photographed using a digital camera (DP71) mounted on an Olympus BX61 microscope.

Alveolar epithelial cell (ATII) isolation and primary culture

Alveolar epithelial cells (ATII) were isolated from adult male Sprague-Dawley rats (6–7 weeks, Charles-River, St-Constant, QC) according to a well-established protocol

(Dagenais et al. 2006; Bardou et al. 2012; Girault et al. 2015). Briefly, lungs were washed with a physiological solution to remove excess blood cells and alveolar macrophages. Then, the lungs were digested with 160 U/rat elastase solution (Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. USA) and minced, and the resulting cell suspension was filtered. Alveolar cells were purified using a differential adherence technique (Dobbs et al. 1986), which enhances the purity of the ATII cell pool by up to 86% (Brochiero et al. 2004). The freshly isolated ATII cell suspension was then seeded on 6 or 12-well cell culture clusters (Corning) and cultured in minimum essential medium (MEM, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Canada), 0.2% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 0.01 mol/L HEPES (ThermoFisher Scientific Inc.), 2 mmol/L L-glutamine (Invitrogen, Canada), 0.08 mg/L gentamicin (Life Technologies) and Septra (Aspri Pharma Canada, Canada, 3 g/mL trimethoprim and 17 g/mL sulfamethoxazole) at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator. This medium was replaced by MEM + 10% FBS without Septra at day 4, as previously described (Dagenais et al. 2006; Leroy et al. 2006; Dagenais et al. 2013; Girault et al. 2015). Well clusters with ATII cells from the same animal were then randomly divided into the different experimental conditions (treatments, see below) and experiments repeated on cell cultures from at least 4 animals (as indicated in the figure legend).

Wound-healing assays

At day 2 of primary culture, ATII cell monolayers were treated, or not, for 24 h with dexamethasone (100 nmol/L in MEM medium supplemented with FBS and Septra (see above)). At day 3, mechanical injuries with a P10 Gilson pipette tip (6 wounds per Petri dish) were performed according to a well-established, highly reproducible technique (Maillé et al. 2011; Ruffin et al. 2016; Adam et al. 2018). Immediately after injury (T₀), the monolayers were then washed (with MEM + FBS without Septra) to remove detached cells, and the injured monolayers were treated with bleomycin (Bleo, 12.5–200 mU/mL), dexamethasone (Dex, 100 nmol/L), a combination of bleomycin and dexamethasone (Bleo + Dex) or vehicle (Ctl, saline 0.9%). Monolayers were photographed with a NIKON camera under light microscopy at T₀, T₂₄ h, T₃₆ h and T₄₈ h after injury. A mark under the Petri dishes allowed us to photograph the wounds at exactly the same place at every time point. After analysis with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), the wound area was measured, and the wound healing rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) were calculated. Wound healing assays on cell monolayers provide

insight into the initial repair processes engaged after injury (mainly cell migration and proliferation).

ATII cell apoptosis

ATII cells were collected after a 24 h treatment with bleomycin (Bleo, 50 mU/mL), dexamethasone (Dex, 100 nmol/L), a combination of bleomycin and dexamethasone (Bleo + Dex) or vehicle (Ctl, saline 0.9%) and then caspase-3/7 activity was determined by luminescent assay (630/595 nm) using the Caspase Glo kit (Promega), following the manufacturer instructions.

Immunoblotting

Freshly isolated primary ATII cells were seeded (2.5×10^6 cells/well) in 6-well cell culture clusters (Costar; Corning, Corning, NY). At day 4, ATII cell monolayers were treated with bleomycin (Bleo, 50 mU/mL), dexamethasone (Dex, 100 nmol/L), a combination of bleomycin and dexamethasone (Bleo + Dex) or vehicle (DMSO) and total proteins were extracted 24 h later. Briefly, ATII cell monolayers were washed twice with PBS, scraped with 200 μL /well lysis buffer (NaCl 150 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, TRIS 50 mmol/L, Triton X-100 1%, pH 7.5, plus a cocktail of proteases/phosphatases inhibitors (Sigma)). The suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and protein content was evaluated by the Bradford method. Sample proteins were denatured at 95°C for 10 min, separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to a PVDF membrane. PVDF membranes were first blocked with 5% powdered milk in Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h at room temperature and then washed three times with TBST before overnight incubation (at 4°C) with anti- β 3-integrin (Abcam, dilution 1:1000, TBST + 5% Bovine serum albumin (BSA, Sigma)), anti- β 6-integrin (Santa Cruz/Millipore, dilution 1:1000, TBST + 5% BSA), anti- β -actin (Sigma, 1:1000, TBST + 5% BSA) or anti-pan-actin (Cell signaling, 1:1000, TBST + 5% BSA) antibodies. Membranes were then washed with TBST and incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (goat anti-rabbit (Santa Cruz/Cell signaling), mouse anti-goat (Santa Cruz) and goat anti-mouse (Sigma/Abcam), dilution 1:1000, TBST + 5% powdered milk). Membranes were rinsed (TBST, 3 \times 15 min) and incubated with a luminescent reactive Immun-Star WesternC Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) or Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer). The intensity of each band was measured with a ChemiDoc system (BioRad Laboratories Inc.), quantified with the Image Lab program (BioRad Laboratories Inc.) and normalized to the actin signal. Protein expression is

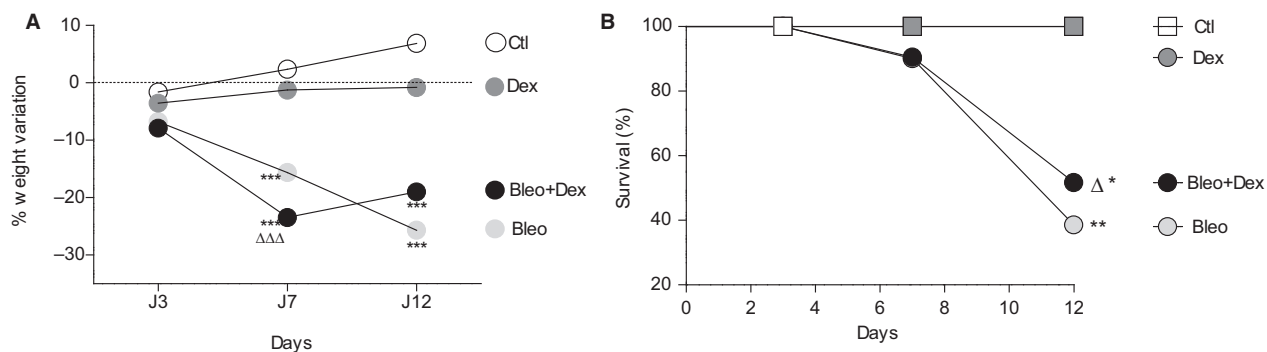


Figure 1. Effect of dexamethasone on body weight and survival after bleomycin-induced acute lung injury in mice. After i.t. instillation (at day 1) of saline (0.9%, 50 μ L) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg, 50 μ L), male NMRI mice were treated (i.p. injection) daily with saline (0.9%, 100 μ L) or dexamethasone (Dex, 0.5 mg/kg, 100 μ L) for 3, 7 or 12 days. Weight variations (A, $n = 3$ –21) as a function of time and percentage (%) of mouse survival (B, $n = 6$ –20) were compared between the four groups: Ctl (saline (i.t.)/saline (i.p.)); Bleo (bleo (i.t.)/saline (i.p.)); Dex (saline (i.t.)/dex (i.p.)) and Bleo + Dex (bleo (i.t.)/dex (i.p.)). Values are means \pm SEM, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control condition at the same time point, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ versus Dex condition at the same time point. 1-way ANOVA (Agostino/Pearson normality positive tested, $P < 0.0001$) and Bonferroni post hoc test (A, day 3), 1-way ANOVA; Kruskal–Wallis test and Dunn’s post hoc test (A, day 7 and 12). Comparison of survival curves was made with a Log-rank (Mantel–Cox) test which generated a Chi square, ** $P < 0.01$ Bleo versus Ctl curve, * $P < 0.05$ Bleo + Dex versus Ctl curve and $\Delta P < 0.05$ Dex versus Bleo + Dex curve (B)

presented as a percentage of the control condition (100%).

Statistical analysis

Mice survival rates (Fig. 1B) are presented as percentages (%) of living mice compared to the initial group for each treatment group, while lung damage scores (Fig. 4B) are presented as a repartition of mice with each damage score (expressed as % of the total number of mice in each treatment group). All other data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 software (CA, USA). Agostino/Pearson normality tests were first performed, followed by statistical tests, adapted to each type of experiment, as specified in figure legends. P values are also indicated for each series of experiments (P values < 0.05 (*) were considered significant).

Results

While progressive weight gain was observed in the control (Ctl) group as a function of time (at days 3, 7 and 12), lung delivery of bleomycin (Bleo, 4 U/kg) caused a significant weight loss at days 7 and 12 (Fig. 1A). However, daily (i.p.) treatment with dexamethasone (0.5 mg/kg) in mice with bleomycin-induced lung injury (Bleo + Dex group) did not prevent weight loss.

A 100% survival rate was observed in the control (Ctl) and dexamethasone (Dex) groups at each time points, whereas the bleomycin challenge (Bleo and Bleo + Dex

groups) induced an increasing mortality rate ($P < 0.05$). Dexamethasone treatment (Bleo + Dex) did not significantly improve the survival (Fig. 1B).

In subsequent experiments, the effect of dexamethasone on the bleomycin outcomes was measured during the acute exudative phase, i.e., at 3 and 7 days. We first evaluated the levels of the TNF- α cytokine, which plays a key role in alveolar epithelial damage and dysfunction in acute lung injury (Patel et al. 2013). We found that exposure to bleomycin was associated with a significant increase in TNF- α in the BAL collected at day 3 (Bleo and Bleo + dex group, Fig. 2A), and that the TNF- α levels in the Bleo + Dex group were significantly lower compared to the Bleo group on day 3. The same trend was observed at day 7, although the variations were not statistically significant.

Elevated total leukocyte cell counts in BAL were observed at day 7 in the Bleo and Bleo + Dex conditions (Fig. 2B). Differential cell count then revealed that compared to that in the control group, a significant increase in the proportion of neutrophils was observed in the BAL of mice challenged with bleomycin (Fig. 2C). The proportion of neutrophils was similar in the Bleo + Dex group. This increase in neutrophils induced by bleomycin was associated with a parallel decrease in the proportion of macrophages in both the Bleo and Bleo + Dex groups (Fig. 2D). The proportion of lymphocytes and eosinophils were lower than 5% in all experimental conditions (Fig. 2E and 2F).

Edema flooding was also associated with the bleomycin-induced damage of the alveolar epithelial/endothelial

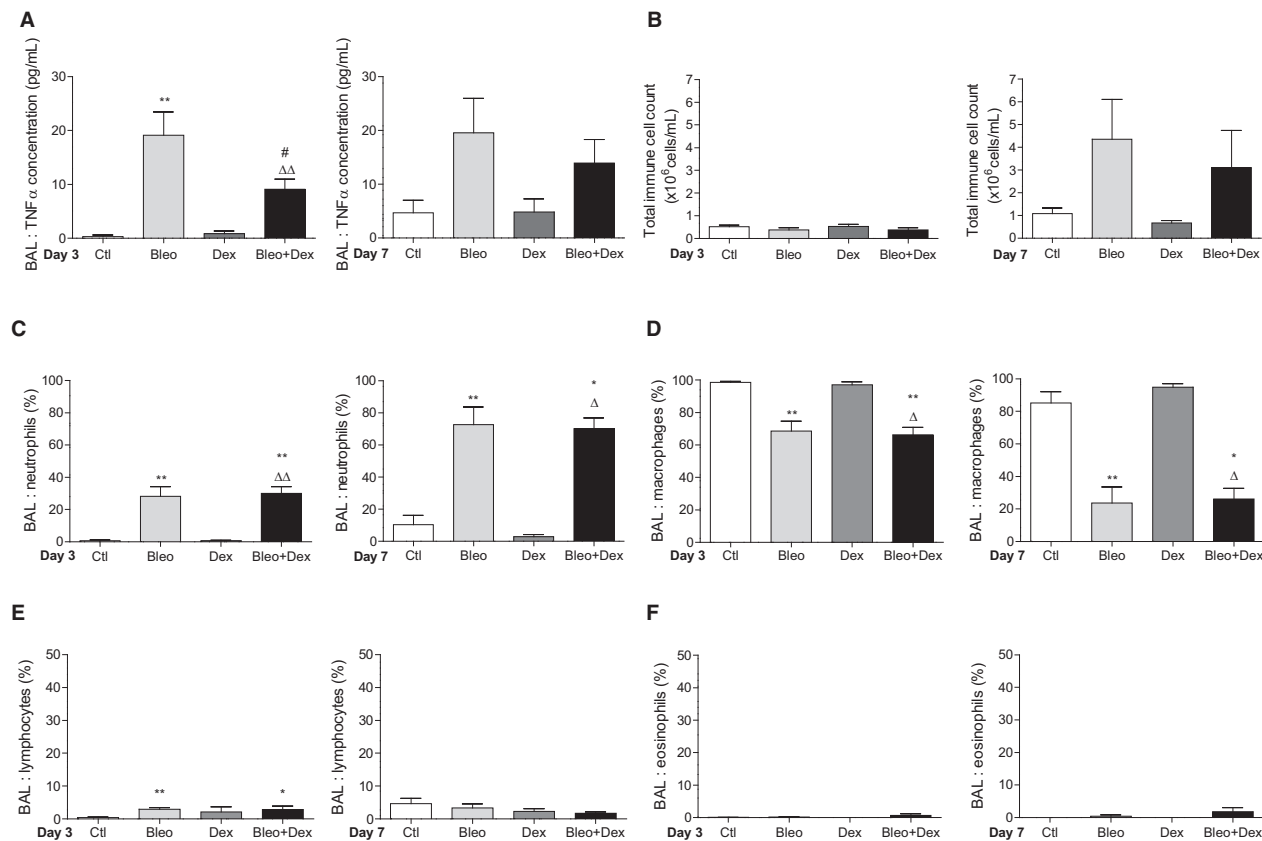


Figure 2. Effect of dexamethasone on the inflammatory response after bleomycin-induced acute lung injury in mice. A. Levels of TNF- α (pg/mL) detected by ELISA in BAL collected at day 3 ($n = 6$, left panel) and 7 ($n = 5-7$, right panel). Total immune cell counts (B) and differential cell count (% of neutrophils (C), macrophages (D), lymphocytes (E) and eosinophils (F)) in BAL collected from mice 3 (left panel) or 7 (right panel) days after the bleomycin challenge (4 U/kg, 50 μ L i.t., $n = 4-7$). Values are means \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Ctl condition, # $P < 0.05$ versus Bleo condition, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ versus Dex condition. Non-parametric t -test (Mann-Whitney, panel A) or 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (panels B, C, D, E, F)

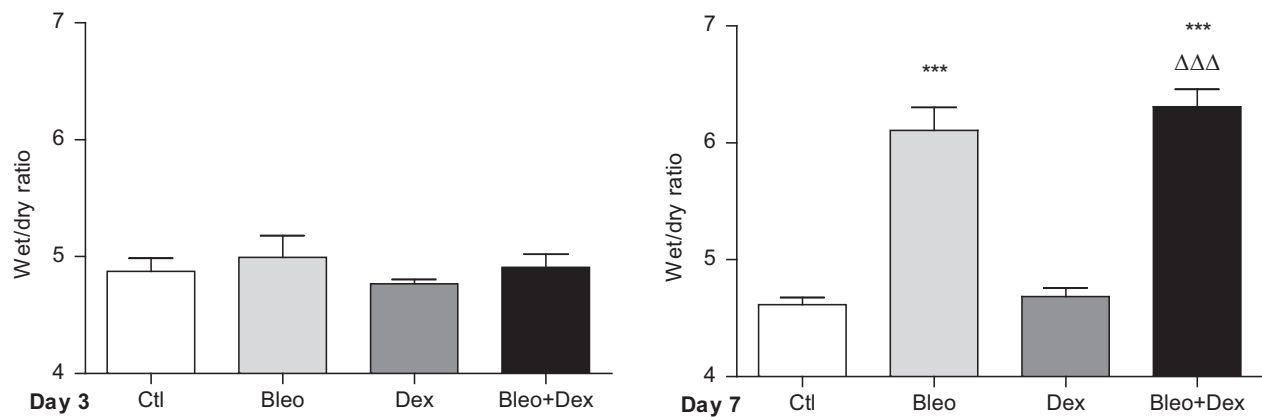


Figure 3. Effect of dexamethasone on edema formation after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Wet-to-dry lung weight ratios (edema index) were measured 3 ($n = 12$, left panel) and 7 ($n = 14-22$, right panel) days after initial instillation (day 1) of saline (Ctl, 0.9%) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg) and daily treatments (i.p. administration) with saline (0.9%) or dexamethasone (Dex, 0.5 mg/kg, 100 μ L). Values are means \pm SEM, *** $P < 0.001$ versus Ctl condition, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ versus Dex condition. 1-way ANOVA; Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test

barriers. Indeed, at day 7 the wet/dry (W/D) ratio is significantly higher in bleomycin-challenged mice (6.1 ± 0.2), compared to the control condition (4.6 ± 0.1) (Fig. 3, right panel). Moreover, dexamethasone treatment did not prevent bleomycin-induced edema. Similarly to dexamethasone, another corticosteroid (methylprednisolone, Fig. S1) did not elicit any beneficial effect on lung edema in bleomycin mice.

Because the observed inability to clear the lung edema could be due to persistent alveolar damage in the presence of bleomycin and dexamethasone, histological analyses (Fig. 4) were then performed. Substantial lung injury was observed in the presence of bleomycin, with injury scores of 2 and 3 in 50% and 33.3% of mice, respectively (Fig. 4B). Mice in the Bleo + Dex group exhibited severe injury scores [2 (16.7%), 3 (66.7%) and 4 (16.7%)]. Alveolar damage was also associated with a significant increase

in the protein concentration in the BAL of mice as early as day 3 in the Bleo + Dex group and at day 7 in the Bleo condition (Fig. 4C).

We then hypothesized that this persistent alveolar damage could be due to a deleterious effect of bleomycin and dexamethasone on the repair capacity of alveolar cells. To test this hypothesis, we then performed a series of wound healing assays on primary alveolar epithelial (ATII) cell cultures. As depicted in Figure 5A, a time- (over a 48 h period after injury) and dose- (12.5 to 200 mU/mL) dependent inhibition of the wound healing rates was observed in the presence of bleomycin. Because a dose of 50 mU/mL significantly decreased the repair rates at every time point, this concentration was used in subsequent experiments (Fig. 5B–D). Our data showed that a 24 h treatment with dexamethasone (100 nmol/L, a dose previously shown to elicit biological effects on ATII cells

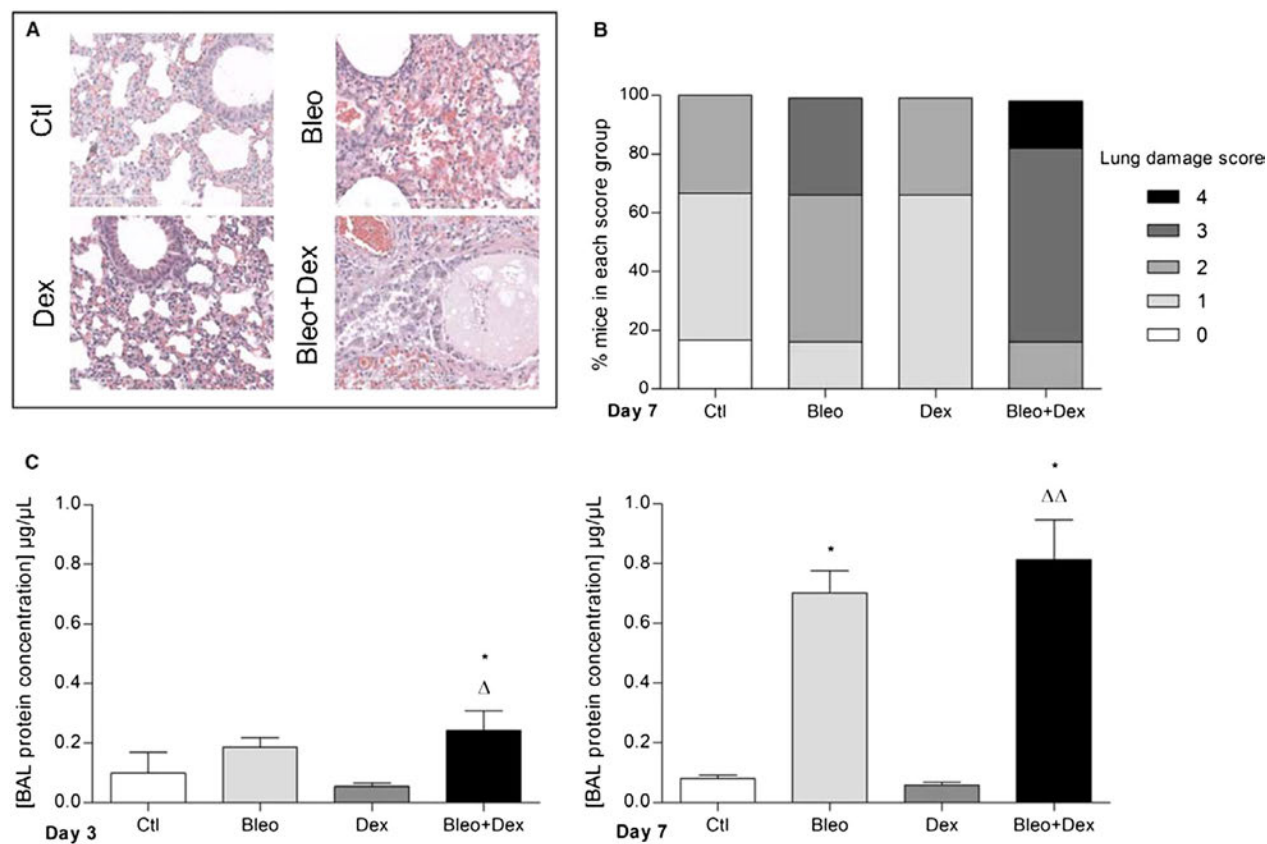


Figure 4. Effect of dexamethasone on alveolar epithelial damage after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Histological sections of mouse lungs stained with hematoxylin-eosin (Magnification $\times 20$. Scale: 200 μm , A) and repartition of lung damage scores at day 7 (B, $n = 6-8$) are presented for each group (Ctl (saline (i.t.)/saline (i.p.)); Bleo (bleo (i.t.)/saline (i.p.)); Dex (saline (i.t.)/dex (i.p.)) and Bleo + Dex (bleo (i.t.)/dex (i.p.))). The concentration of proteins in BAL ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$, C, $n = 5-6$) was measured at day 3 (left panel) and 7 (right panel). Values are means \pm SEM, * $P < 0.05$ versus Ctl condition, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ versus Dex condition. 1-way ANOVA; Kruskal–Wallis test and Dunn's post hoc test

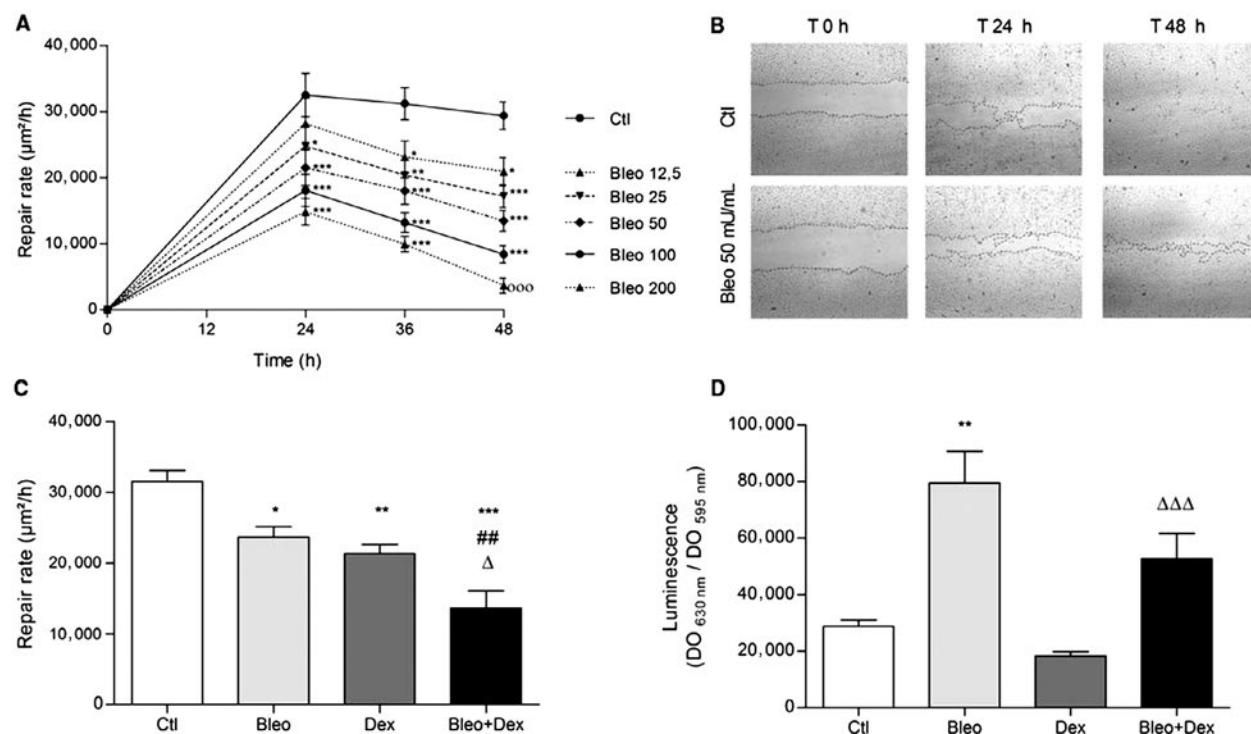


Figure 5. Effect of dexamethasone on the repair rates of primary ATII cell monolayers. (A) Primary rat ATII cell monolayers were injured mechanically, and repair rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) were measured over periods of 24, 36 and 48 h in the control (Ctl) condition (saline, 0.9%) and after treatments with increasing doses of bleomycin (Bleo, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$, $n = 8$). (B) Representative photographs of healing ATII cell monolayers at 0, 24 and 48 h after treatment with saline (0.9%) or bleomycin (Bleo, 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$). (C) Repair rates ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) of ATII cell monolayers in control condition (Ctl, 0.9%), after treatment with bleomycin alone (Bleo, 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$, applied at T0), dexamethasone alone (Dex, 100 nmol/L , applied 24 h before injury) and a combination of bleomycin (50 $\mu\text{M}/\text{mL}$, T0) and dexamethasone (100 nmol/L , 24 h before injury) (Bleo + Dex, $n = 8$). (D) ATII cell apoptosis in control condition (Ctl, 0.9% saline) and after 24 h treatment with bleomycin alone (Bleo, 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$), dexamethasone alone (Dex, 100 nmol/L) or a combination of bleomycin (50 $\mu\text{M}/\text{mL}$) and dexamethasone (100 nmol/L) (Bleo + Dex) ($n = 10$). Values are means \pm SEM, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ versus Ctl condition, $##P < 0.01$ versus Bleo condition, $\Delta P < 0.05$ versus Dex condition. 2-way ANOVA and Bonferroni post hoc test (vs. control at the same time point, panel A), 1-way ANOVA (Agostino/Pearson normality positive tested, $P < 0.0001$) and Bonferroni post hoc test (panel C), 1-way ANNOVA Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (panel D)

(Champigny et al. 1994; Dagenais et al. 2006)) alone significantly reduced the wound healing rates ($21,304 \pm 1328$ vs. $31,523.1 \pm 1519 \mu\text{m}^2/\text{h}$ in control condition) and further dampened the repair rates measured in the presence of bleomycin ($23,642.9 \pm 1484 \mu\text{m}^2/\text{h}$ and $13,671 \pm 2416 \mu\text{m}^2/\text{h}$ in Bleo and Bleo + Dex, respectively).

A pro-apoptotic effect of bleomycin has been established in several cell models (Lee et al. 2005; Wallach-Dayana et al. 2006). In agreement with these previous reports, a significant increase in caspase 3/7 activity was noted in bleomycin-treated ATII cells (in Bleo and Bleo + Dex conditions, compared to Ctl and Dex, respectively) (Fig. 5D). Although, ATII cell apoptosis was slightly lower in the presence of Dex (Bleo + Dex, compared to Bleo alone), the decrease was not statistically significant.

The negative effect of dexamethasone on wound healing was associated with a significant decrease in the

expression of two key proteins of alveolar repair, i.e., $\beta 3$ - and $\beta 6$ -integrins (37 and 55% decrease, compared to the control condition, when the cells were treated with dexamethasone (Fig. 6)). A significant reduction in $\beta 6$ -integrin expression was also observed after exposure to bleomycin. The Bleo + Dex combination also induced a decrease in $\beta 3$ - and $\beta 6$ -integrins (although non-statistically significant for $\beta 6$ -integrin).

Discussion

Although dexamethasone treatment efficiently prevented the TNF- α response after bleomycin-induced lung injury, our experiments showed that it failed to reduce the neutrophil infiltration in BAL, weight loss and mortality rates, as well as lung edema and injury scores. Our data support the hypothesis that this inability of

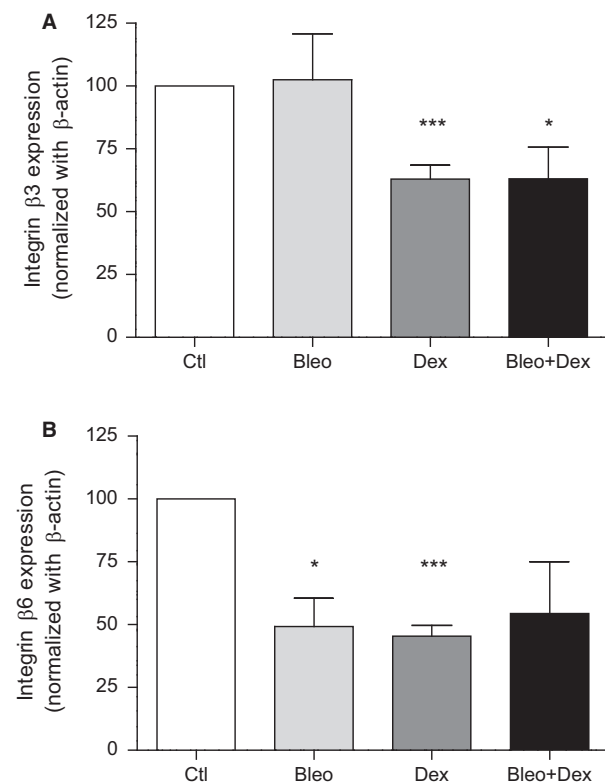


Figure 6. Effect of dexamethasone on $\beta 3$ - and $\beta 6$ -integrin expression in primary ATII cells. Protein expression (% of control condition normalized with actin expression) of $\beta 3$ - (upper panel, $n = 6-14$) and $\beta 6$ -integrin (lower panel, $n = 3-8$) in control, bleomycin, dexamethasone and bleomycin + dexamethasone pretreated (24 h) conditions. Values are presented as means \pm SEM, one simple t -test with a theoretical mean of 100%, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus Ctl condition

dexamethasone to improve the resolution of bleomycin outcomes may be due to its damaging effect on the repair capacity of the alveolar epithelium.

Our data first showed that daily treatments with dexamethasone over a 12-day period failed to prevent weight loss associated with the inflammatory response after the bleomycin challenge. The muscle atrophy induced by glucocorticoids might also be responsible for this inability to gain weight (Schakman et al. 2009; Bodine and Furlow 2015). Our study also demonstrated that the number of mice requesting euthanasia because they reached endpoints was similar in the Bleo and Bleo + Dex experimental groups. These findings are in agreement with previous reports indicating that dexamethasone did not reduce weight loss and/or mortality rates in experimental models of acute lung injury (Koshika et al. 2005; Xu et al. 2009).

Our results also show that although dexamethasone treatment efficiently dampened the early TNF- α increase

(at day 3), it did not impair the inflammatory response or the injury process. Indeed, the increase in neutrophils, the elevated protein content measured in the BAL, the injury score and the increase in the wet/dry lung weight ratio in the presence of bleomycin on day 7 were not attenuated by dexamethasone, at the tested dose. This persistent neutrophil infiltration most likely contributes to the epithelial injury (Ware and Matthay 2000; Grommes and Soehnlein 2011) observed in our histological analyses. This inability of dexamethasone to protect/improve the alveolar barrier has also been observed in other models of severe acute lung injury (Xu et al. 2009; Yubero et al. 2012; Hegeman et al. 2013; Engel et al. 2015). Indeed, our results are in phase with the variable response observed following dexamethasone treatment of lung-injured animals. In agreement with our findings, reduced TNF- α levels were observed in bleomycin + dexamethasone-treated rats compared to those in the bleomycin condition (Yang et al. 2015). Yubero et al. also reported that intramuscular injection of dexamethasone (1 mg/kg), 1 h after induction of lung injury due to acute pancreatitis in rats, downregulated inflammatory factors but did not reduce leukocyte infiltration (Yubero et al. 2012). However, i.v. administration of dexamethasone at the initiation of ventilation-induced lung injury in mice has been shown to attenuate both inflammatory mediator expression (KC, MCP-1, IL-1 β , IL-6) in lung tissues and neutrophil infiltration in BAL (Hegeman et al. 2013). In contrast, neither cellular infiltration nor cytokine release were inhibited by dexamethasone in a model of acute lung injury induced by the H5N1 virus in mice (Xu et al. 2009) and in ventilated adult sheep with early phase acute respiratory distress syndrome (Engel et al. 2015). Although the variability observed is in part secondary to the outcomes that are measured, the administration of dexamethasone alone does not appear to be efficient in reversing the evolution of lung injury or counteracting its undesirable side effects (Xu et al. 2009; Kohno et al. 2010; Yubero et al. 2012; Hegeman et al. 2013; Engel et al. 2015).

The persistent lung edema and/or inflammatory cell infiltration observed in our model and others (Xu et al. 2009; Yubero et al. 2012; Hegeman et al. 2013; Engel et al. 2015), despite the presence of dexamethasone, may be due to severe and nonresolving alveolar damage, at the measured time points. In agreement with our hypothesis of a deleterious impact of bleomycin and dexamethasone on the repair capacity of the alveolar epithelium, our experiments first show a time- and dose-dependent inhibition of wound repair rates of primary ATII cell cultures by bleomycin. The observed pro-apoptotic effect of bleomycin, could contribute, at least in part, to this repair impairment. Not only did dexamethasone not reverse the

bleomycin-repair impairment, but it further worsened the repair delay in vitro as well as the injury scores and protein levels in BAL in vivo. In agreement with our results, a deleterious effect of dexamethasone on repair mechanisms has also been shown in other epithelial cells (Liu et al. 2013; Kadmiel et al. 2016). Furthermore, it has been shown that dexamethasone inhibits corneal epithelial wound healing and cell migration (by altering the activity of membrane lamellipodia and filopodia) but promotes tight junction integrity (Kadmiel et al. 2016). The role of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial repair impairment has also been studied. A previous study by Dorscheid et al (2006) indicated that the observed airway epithelial cell apoptosis induced by dexamethasone or budesonide was not involved in the decrease in wound repair rates after corticosteroid exposure. At lower concentration, dexamethasone elicited in our study a slight, but non-significant, decrease in caspase 3/7 activity in ATII cells in the absence or presence of bleomycin.

The decreased $\beta 3$ - and $\beta 6$ -integrin expression that we observed in alveolar epithelial cells may be involved in dexamethasone-induced repair impairment. However, other mechanisms may also be involved. Indeed, a previous study indicated that the inhibition of airway epithelial repair, cell proliferation and migration by dexamethasone may be mediated, at least in part, by suppression of the MAPK/ERK signaling pathway (Liu et al. 2013). Similarly, a marked inhibition in cell proliferation and migration, associated with decreased levels of Mek1/2-p-Erk1/2, has been observed in human airway epithelial cell (16HBE) cultures in the presence of dexamethasone (Jia et al. 2018).

Conclusions

Altogether, our data indicates that the inability of dexamethasone to improve the resolution of bleomycin outcomes, in particular, mortality rates, cell infiltration and lung edema, may be due to the remaining alveolar damage observed at day 7 and repair impairment induced by dexamethasone. Although data from animal models should be taken with caution and never perfectly reflect the physiopathology of ARDS, our study and those previously published suggest that dexamethasone alone is unlikely to be an efficient therapy for acute lung injury. Indeed, there is accumulating evidence that successful treatment of ARDS and lung injury will depend on our capacity to reduce epithelial injury and allow for more rapid restoration of alveolar epithelial integrity and function (Matthay 2014).

Acknowledgments

The authors thank the histopathology core facility and Louis Gaboury of Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC, Université de Montréal) for histological analysis and injury scoring.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Adam, D., C. Bilodeau, L. Sognigbé, É. Maillé, M. Ruffin, and E. Brochiero. 2018. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J. Cyst. Fibros.* 17:705–714.
- Bardou, O., A. Privé, F. Migneault, K. Roy-Camille, A. Dagenais, Y. Berthiaume, et al. 2012. K^+ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1818:1682–1690.
- Bein, Thomas, J. Briegel, and D. Annane. 2016. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: yes. *Intensive Care Med.* 42:918–920.
- Bihari, S., M. Bailey, and A. D. Bersten. 2016. Steroids in ARDS: to be or not to be. *Intensive Care Med.* 42:931–933.
- Bodine, S. C., and J. D. Furlow. 2015. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol.* 2015;872:145–76.
- Bos, L. D., I. Martin-loeches, and M. J. Schultz. 2018. ARDS: challenges in patient care and frontiers in research. *Eur. Respir. Rev.* 27:1–9.
- Brochiero, E., A. Dagenais, A. Privé, Y. Berthiaume, and R. Grygorczyk. 2004. Evidence of a functional CFTR Cl^{-} channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287:L382–L392.
- Champigny, G., N. Voilley, E. Lingueglia, V. Friend, P. Barbry, and M. Lazdunski. 1994. Na^+ channel by steroid hormones. *EMBO J.* 13:2177–2181.
- Chen, F., L. Gong, L. Zhang, H. Wang, X. Qi, X. Wu, et al. 2006. Short courses of low dose dexamethasone delay bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 536:287–295.
- Dagenais, A., R. Fréchette, M.-E. Clermont, C. Massé, A. Privé, E. Brochiero, et al. 2006. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291:L1220–L1221.
- Dagenais, A., M. C. Tessier, S. Tatur, E. Brochiero, R. Grygorczyk, and Y. Berthiaume. 2013. Hypotonic Shock modulates Na^+ current via a Cl^{-} and Ca^{2+} /calmodulin

- dependent mechanism in alveolar epithelial cells. *PLoS ONE* 8:e74565.
- Dobbs, L. G., R. Gonzalez, and M. C. Williams. 1986. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:141–145.
- Dorscheid, D. R., B. J. Patchell, O. Estrada, B. Marroquin, R. Tse, and S. R. White. 2006. Effects of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial wound closure in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* [Internet] 291:794–801.
- Engel, M., R. M. E. Nowacki, P. Boden, L. K. Reiss, S. Uhlig, N. L. Reynaert, et al. 2015. The effects of dexamethasone and oxygen in ventilated adult sheep with early phase acute respiratory distress syndrome. *Lung* 193:97–103.
- Fan, E., D. Brodie, and A. S. Slutsky. 2018. Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment. *JAMA* 319:698–710.
- Fitzgerald, M., D. F. McAuley, and M. Matthay. 2014. Is there a need for emerging drugs for the acute respiratory distress syndrome? *Expert Opin. Emerg. Drugs* 19:323–328.
- Foster, J. R. 2010. Steroids for early acute respiratory distress syndrome: critical appraisal of Meduri GU, Golden E, Freire AX, et al.: Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: Results of a randomized controlled trial. *Chest* 2007; 131:954–963. *Pediatr. Crit. Care Med.* 11:404–407.
- Girault, A., J. Chebli, A. Privé, N. T. N. Trinh, E. Maillé, R. Grygorczyk, et al. 2015. Complementary roles of KCa3.1 channels and β 1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir. Res.* 16:100.
- Goto, H., J. G. Ledford, S. Mukherjee, P. W. Noble, K. L. Williams, and J. R. Wright. 2010. The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181:1336–1344.
- Grommes, J., and O. Soehnlein. 2011. Contributions of neutrophils to ALI. *Mol. Med.* 17:293–307.
- Guilbault, C., P. Martin, D. Houle, M. L. Boghdady, M. C. Guiot, D. Marion, et al. 2005. Cystic fibrosis lung disease following infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Cfr knockout mice using novel non-invasive direct pulmonary infection technique. *Lab. Anim.* 39:336–352.
- Hegeman, M. A., M. P. Hennis, P. M. Cobelens, A. Kavelaars, N. J. G. Jansen, M. J. Schultz, et al. 2013. Dexamethasone attenuates VEGF expression and inflammation but not barrier dysfunction in a murine model of ventilator-induced lung injury. *PLoS ONE* 8:e57374.
- Jia, S., P. Guo, X. Ge, H. Wu, J. Lu, and X. Fan. 2018. Overexpression of indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to the repair of human airway epithelial cells inhibited by dexamethasone via affecting the MAPK/ERK signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* 16:282–290.
- Kadmiel, M., A. Janoshazi, X. Xu, and J. A. Cidlowski. 2016. Glucocorticoid action in human corneal epithelial cells establishes roles for corticosteroids in wound healing and barrier function of the eye. *Exp. Eye Res.* 152:10–33.
- Kimura, D., J. Saravia, C. R. Rovnaghi, G. U. Meduri, A. Schwingshackl, S. A. Cormier, et al. 2016. Plasma biomarker analysis in pediatric ARDS: generating future framework from a pilot randomized control trial of methylprednisolone: a framework for identifying plasma biomarkers related to clinical outcomes in pediatric ARDS. *Front. Pediatr.* 4:31.
- Kohno, M., M. Haramoto, O. Nakajima, L. Yang, S. Hinotsu, M. Yokohira, et al. 2010. Antedrug budesonide by intrapulmonary treatment attenuates bleomycin-induced lung injury in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 33:1206–1211.
- Koshika, T., Y. Hirayama, Y. Ohkubo, S. Mutoh, and A. Ishizaka. 2005. Tacrolimus (FK506) has protective actions against murine bleomycin-induced acute lung injuries. *Eur. J. Pharmacol.* 515:169–178.
- Lee, V. Y., C. Schroedl, J. K. Brunelle, L. J. Buccellato, O. I. Akinci, H. Kaneto, et al. 2005. Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am. J. Physiol. - Lung Cell Mol. Physiol.* 289:521–528.
- Leite-Junior, J. H. P., C. S. N. B. Garcia, A. B. Souza-Fernandes, P. L. Silva, D. S. Ornellas, A. P. Larangeira, et al. 2008. Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice. *Crit. Care Med.* 36:2621–2628.
- Leroy, C., A. Privé, J.-C. Bourret, Y. Berthiaume, P. Ferraro, and E. Brochiero. 2006. Regulation of ENaC and CFTR expression with K^+ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291:L1207–L1219.
- Liu, J., M. Zhang, C. Niu, Z. Luo, J. Dai, L. Wang, et al. 2013. Dexamethasone inhibits repair of human airway epithelial cells mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *PLoS ONE* 8:e60705.
- Mac, S. R., and D. F. McAuley. 2017. Prolonged glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 389:1516–1517.
- Maillé, E., N. Thu, N. Trinh, A. Privé, C. Bilodeau, É. Bissonnette, et al. 2011. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- α after injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 301:945–955.
- Matthay, M. A. 2014. Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189:1301–1308.
- Matute-Bello, G., C. W. Frevert, and T. R. Martin. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295:L379–L399.
- Matute-Bello, G., G. Downey, B. B. Moore, S. D. Groshong, M. A. Matthay, A. S. Slutsky, et al. 2011. An official American Thoracic Society Workshop Report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44:725–738.

- Meduri, G. U., and R. A. C. Siemieniuk. 2017. Prolonged glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 389:1516–1517.
- Meduri, G. U., L. Bridges, M. C. Shih, P. E. Marik, R. A. C. Siemieniuk, and M. Kocak. 2016. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. *Intensive Care Med.* 42:829–840.
- Monahan, L. J. 2013. Acute respiratory distress syndrome. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 43:278–284.
- Patel, B. V., M. R. Wilson, K. P. O. Dea, and M. Takata. 2013. TNF-induced death signaling triggers alveolar epithelial dysfunction in acute lung injury. *J. Immunol.* 190:4274–4282.
- Ranieri, V. M., G. D. Rubenfeld, B. T. Thompson, N. D. Ferguson, E. Caldwell, E. Fan, et al. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307:2526–2533.
- Ruffin, M., C. Bilodeau, É. Maille, S. L. LaFayette, G. A. McKay, N. T. N. Trinh, et al. 2016. Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair. *FASEB J.* 30:3011–3025.
- Saito, F., S. Tasaka, K. I. Inoue, K. Miyamoto, Y. Nakano, Y. Ogawa, et al. 2008. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38:566–571.
- Shakman, O., H. Gilson, S. Kalista, and J. P. Thissen. 2009. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm. Res.* 72(Suppl 1):36–41.
- Seam, N., and A. F. Suffredini. 2016. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: we are not sure. *Intensive Care Med.* 42:924–927.
- Shimabukuro, D. W., T. Sawa, and M. A. Gropper. 2003. Injury and repair in lung and airways. *Crit. Care Med.* 31(8 Suppl):S524–S531.
- Standiford, T. J., and P. A. Ward. 2016. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Transl. Res.* 167:183–191.
- Steinberg, K. P., L. D. Hudson, R. B. Goodman, C. Lee Hough, O. Michigan, A. Arbor, et al. 2006. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome the national heart, lung, and blood institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) clinical trials network. *N. Engl. J. Med.* 354:1671–1684.
- Thompson, B. T., and V. M. Ranieri. 2016. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: no. *Intensive Care Med.* 42:921–923.
- Tongyoo, S., C. Permpikul, W. Mongkolpun, V. Vattanavanit, S. Udompanturak, M. Kocak, et al. 2016. Hydrocortisone treatment in early sepsis-associated acute respiratory distress syndrome: results of a randomized controlled trial. *Crit. Care* 20:329.
- Wallach-Dayana, S. B., G. Izbicki, P. Y. Cohen, R. Gerstl-Golan, A. Fine, and R. Breuer. 2006. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am. J. Physiol. - Lung Cell Mol. Physiol.* 290:790–796.
- Wang, X. Q., X. Zhou, Y. Zhou, L. Rong, L. Gao, and W. Xu. 2008. Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. *Respirology* 13:772–780.
- Ware, L., and M. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342:1334–1349.
- Xu, T., J. Qiao, L. Zhao, G. He, K. Li, J. Wang, et al. 2009. Effect of dexamethasone on acute respiratory distress syndrome induced by the H5N1 virus in mice. *Eur. Respir. J.* 33:852–860.
- Yang, D., W. Yuan, C. Lv, N. Li, T. Liu, L. Wang, et al. 2015. Dihydroartemisinin suppresses inflammation and fibrosis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8:1270–1281.
- Yang, Z. G., X. L. Lei, and X. L. Li. 2017. Early application of low-dose glucocorticoid improves acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp. Ther. Med.* 13:1215–1224.
- Yehya, N., S. Servaes, N. J. Thomas, V. M. Nadkarni, and V. Srinivasan. 2015. Corticosteroid exposure in pediatric acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 41:1658–1666.
- Yubero, S., M. A. Manso, L. Ramudo, S. Vicente, and I. De Dios. 2012. Dexamethasone down-regulates the inflammatory mediators but fails to reduce the tissue injury in the lung of acute pancreatitis rat models. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 25:319–324.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.:

Figure S1. Effect of another anti-inflammatory drug, methylprednisolone, on edema index after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Wet/dry ratios were measured 3 ($n = 6$, left panel) and 7 days ($n = 6$, right panel) after instillation of saline (Ctl, 0.9%) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg) and daily treatments (i.p. administration) with saline (0.9%) or methylprednisolone (methyl, 1 mg/kg, 100 μ L). Values are means \pm SEM, $^{**}P < 0.01$ versus Ctl condition, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ versus Dex condition. $n = 6$. 1-way ANOVA Kruskal–Wallis test and Dunn's post hoc test.

Annexe B : Article #2

Titre: **Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin**

Statut: Publié dans *Experimental Physiology* en 2021

Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin

Mélissa Aubin Vega^{1,2} | Cécile Chupin^{1,2} | Chantal Massé^{1,3} | André Dagenais^{1,3} | Yves Berthiaume^{1,2,3} | Emmanuelle Brochiero^{1,2}

¹ Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

² Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada

Correspondence Emmanuelle Brochiero, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Pavillon R, 900 rue St-Denis, Montréal, QC H2X0A9, Canada. Email: emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

Edited by: Jian Wang

Mélissa Aubin Vega and Cécile Chupin are co-first authors.

Yves Berthiaume and Emmanuelle Brochiero are co-senior authors

Funding information
Canadian Institutes of Health Research, Grant/Award Numbers: MOP-111054, PJT153406, PJT166004; Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Grant/Award Number: RGPIN-2016-04378; Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S)

Abstract

The exudative phase of acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by extended alveolar damage, resulting in accumulation of protein-rich inflammatory oedematous fluid in the alveolar space. Na⁺ reabsorption through ENaC channels is a major driving force for alveolar fluid clearance (AFC) in physiological and pathological conditions. It has previously been shown that partial α ENaC impairment in transgenic (α ENaC(-/-)Tg+) mice results in reduced AFC in basal conditions and increased wet/dry ratio after thiourea-induced lung oedema, a model in which the integrity of the alveolar epithelium is preserved. The goal of this study was to further investigate the impact of α ENaC downregulation in α ENaC(-/-)Tg+ mice using an experimental model of acute lung injury induced by bleomycin. A non-significant trend in enhanced weight loss and mortality rates was observed after the bleomycin challenge in α ENaC(-/-)Tg+ compared to wild-type (WT) mice. Bronchoalveolar lavage analyses revealed increased TNF α levels and protein concentrations, as indexes of lung inflammation and alveolar damage, in α ENaC(-/-)Tg+ mice, compared to WT, at day 3 post-bleomycin, although a statistical difference was no longer measured at day 7. Differential immune cell counts were similar in WT and α ENaC(-/-)Tg+ mice challenged with bleomycin. Moreover, lung weight measurements indicated similar oedema levels in WT mice and in transgenic mice with impaired ENaC channels. Altogether, our data indicated that change in ENaC expression does not elicit a significant impact on lung oedema level/resolution in the bleomycin model, featuring alveolar damage.

KEYWORDS

acute lung injury, bleomycin, ENaC

1 | INTRODUCTION

Fluid absorption through type I (ATI) and type II (ATII) alveolar epithelial cells is essential to maintain alveolar spaces virtually free of liquid, a physiological condition essential for optimal gas exchange

(Basset et al., 1987a, b). Alveolar fluid clearance (AFC) depends on sodium (Na⁺) absorption, driven by passive Na⁺ entry through apical Na⁺ channels and active exit by the basolateral Na⁺/K⁺-ATPase (Basset et al., 1987a, b). The importance of Na⁺ transport through epithelial Na⁺ (ENaC) channels and non-selective cation channels in

AFC has been established *in vitro* and in several animal models (Basset et al., 1987b; Fang et al., 2004; Hummler et al., 1996; Li and Folkesson, 2006; O'Brodovich et al., 1990; Smedira et al., 1991; Trac et al., 2017). Notably, Hummler *et al.* demonstrated that α ENaC knockout (KO) in mice was associated with a lethal phenotype at birth, due to the inability to clear alveolar fluid (Hummler et al., 1996). Furthermore, partial α ENaC silencing in rats resulted in increased extravascular lung water and newborn mortality (Li et al., 2007). Finally, it has been established that active Na⁺ absorption across the alveolar epithelial barrier is the primary mechanisms for resolution of hydrostatic or cardiogenic pulmonary oedema in uninjured lungs (Matthay, 2014).

It has been shown that Na⁺ absorption is also critical for AFC in injured lungs (Matthay, 2014). Indeed, gene transfer with cationic lipid-mediated or adenovirus-mediated transfer of the Na⁺/K⁺-ATPase pump has been shown to mitigate pulmonary oedema in different models of acute lung injury (ALI) (Factor et al., 2000; Stern et al., 2000; Adir et al., 2008). The contribution of ENaC to the resolution of pulmonary oedema has also been investigated by Egli et al. (2004) in transgenic mice (α ENaC(-/-)Tg+) exhibiting reduced α ENaC expression, using a model of acute lung oedema induced by thiourea, which causes diffuse vascular endothelial damage (Cunningham and Hurley, 1972). Data showed that α ENaC(-/-)Tg+ mice exhibited reduced AFC, increased lung oedema severity and slower rates of oedema resolution in thiourea-challenged mice (Egli et al., 2004). However, the thiourea model, used in the study by Egli et al. (2004), induces lung oedema secondarily to diffuse vascular damage, while the alveolar epithelium remains relatively intact (Cunningham and Hurley, 1972). Therefore, this animal model might not be totally representative of the injury observed in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Indeed, ARDS is characterized by an exacerbated inflammatory response and severe damage of both the alveolar epithelium and vascular endothelium, leading to lung oedema flooding (Albertine et al., 1998; Berthiaume et al., 1999; Ingbar et al., 1998; Matthay et al., 2019). As previously discussed (Berthiaume et al., 1999), the progressive epithelial injury seen in ARDS patients can be of heterogeneous severity among alveoli/areas.

Therefore, the goal of our study was to evaluate if ENaC downregulation, using α ENaC(-/-)Tg+ mice, would worsen the outcomes of ALI in an animal model harbouring damage of the alveolar epithelium. Although no single animal model recapitulates all the characteristics of ARDS in humans (Aeffner et al., 2015; Matute-Bello et al., 2008; Richard et al., 2006), we opted for the well-characterized model of bleomycin-induced ALI. We focused our study on the acute exudative phase (over a 7-day period), featuring severe alveolar epithelial and vascular endothelial damage as well as lung oedema flooding and exacerbated inflammatory response (with neutrophil infiltration and cytokine release), before establishment of fibrosis (day 12–21) (Goto et al., 2010; Matute-Bello et al., 2008; Saito et al., 2008). Our hypothesis was that bleomycin-induced ALI would lead to outcomes of similar to worsened severity in α ENaC(-/-)Tg+ compared to wild-type mice. The effect of α ENaC downregulation in these transgenic mice was thus evaluated by assessing mouse survival,

New Findings

• What is the central question of this study?

How does the downregulation of ENaC, the major driving force for alveolar fluid clearance, impact acute lung injury outcomes induced by bleomycin, featuring alveolar damage, as observed during ARDS exudative phase?

• What is the main finding and its importance?

ENaC downregulation in α ENaC(-/-)Tg+ mice did not elicit a substantial worsening impact on the main bleomycin outcomes. In ARDS patients, both ENaC alteration and alveolar damage are observed. Thus, novel therapeutic avenues, favouring alveolar integrity restoration, in addition to lung oedema resolution capacity, mainly driven by ENaC, would be essential.

inflammatory response, alveolar damage and lung oedema indexes after the bleomycin challenge.

2 | METHODS

2.1 | Ethical approval

All procedures on animals were approved by the Institutional Animal Protection Committee (CIPA, Approval references nos H040056Ybs and IP19019EBr) of the Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines. In addition, the experimental protocols are in agreement with *Experimental Physiology's* principles and regulations for animal studies.

2.2 | Animal care

α ENaC transgenic (α ENaC(-/-)Tg+) mice, harbouring a non-lethal downregulation of α ENaC expression/function were generated as previously described (Egli et al., 2004; Hummler et al., 1997). The initial breeding pair (on NMRI background) was kindly provided by Dr E. Hummler (Lauzanne, Switzerland). The mouse colony was then maintained by breeding heterozygous mice (male α ENaC(+/-)Tg+ × female α ENaC(+/-)Tg+) at the animal care facility of CRCHUM and backcrossed with NMRI WT mice (Naval Medical Research Institute, Bethesda, MD, USA) every 10 generations. Mice were housed under standard humidity and lighting conditions (12:12-h light–dark cycles) and allowed free access to standard mouse diet and water *ad libitum*.

For transparency, authors would like to clarify that, as recommended by our Institutional Animal Protection Committee, according to the principles of the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement), our protocol was initially designed to compare controls to two distinct experimental groups aimed at investigating two separate scientific questions. The first one was to evaluate the impact of a treatment with a corticosteroid (dexamethasone) on the resolution of bleomycin-induced ALI (comparison between the control groups and mice treated with dexamethasone after the bleomycin challenge). These results have already been published (Aubin Vega et al., 2019). The second question was to explore the impact of α ENaC down-regulation (in α ENaC(-/-)Tg+ mice) in the bleomycin-induced ALI model (data presented here comparing the control and α ENaC(-/-)Tg+ groups). Thus, in order to decrease the number of animals used as per the 3Rs principles, the same group of animals was used as control within the two studies performed at the same time and the values reported here (Ctl group) are similar to the ones recently published in (Aubin Vega et al., 2019).

2.3 | Intratracheal instillation

Experiments were conducted on 7- to 10-week-old male WT and α ENaC(-/-)Tg+ mice, randomly divided into Ctl (instillation of saline) and Bleo (instillation of Bleomycin, see below) groups. More precisely, mice were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a solution (0.01 ml/g) of 13% ketamine (100 mg/ml) and 1.3% xylazine (20 mg/ml) in 0.9% saline. Mice were then positioned on their back on a 45° table and instilled intratracheally (i.t.) via a catheter with saline (0.9%, 50 μ l) or bleomycin (MaynePharma Canada, Kirkland, Quebec, Canada, 4 U/kg, 50 μ l) under direct visualization of the vocal cord, following a modified, non-surgical and non-damaging method (Guilbault et al., 2005; Weksler et al., 1994).

In another series of experiments, a model of thiourea-induced acute lung oedema was used. Briefly, WT and α ENaC(-/-)Tg+ mice were treated by an (i.p.) injection with saline (0.9%, 150 μ l) or thiourea (40 mg/kg (effective dose previously used in NMRI mice; Egli, 2004; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, 150 μ l).

Animals were then sacrificed (lethal dose of ketamine–xylazine (0.02 ml/g, i.p.) followed by inferior *vena cava* severing) at different time points (as detailed in the following sections describing experimental procedures and outcome measurements).

2.4 | Physiological parameters

The mice weight variations were calculated from the measured weights at day 3 or 7, including before euthanasia of mice reaching the endpoints (see below), and reported as percentage of initial weight before bleomycin i.t. instillation. In compliance with the CCAC standards and following daily animal assessment by the CRCHUM animal care personnel, mice reaching endpoints (respiratory failure, loss of more than 30% of the initial weight, prostration, uncontrollable pain, dehydration) were sacrificed according to the procedure approved

by the CRCHUM institutional animal care committee. To avoid a potential bias by using the animals with the better outcomes, mice reaching endpoints were included in the calculation of the weight changes and survival rates (reported as percentage of living mice in each group at 3, 7 and 12 days after the beginning of the bleomycin challenge). Subsequent experimental procedures (described below) were performed at 3 and 7 days after bleomycin challenge (i.e. during the acute exudative phase). At this time points no (day 3) or small (day 7) mortality rates were observed.

2.5 | Lung oedema (wet/dry ratio)

After sacrifice on day 3 and 7 (model of bleomycin-induced ALI) or 4 and 7 h (corresponding to the peak effect and resolution phase, respectively, of lung oedema in the thiourea model), the lungs were removed and directly weighed (wet weight). Lungs were then heated to 95°C for 24 h to measure the dry weight, and then to calculate the wet/dry weight ratio, index of lung oedema.

2.6 | Bronchoalveolar lavages

In another series of experiments, bronchoalveolar lavages (BALs; six repeated i.t. instillation of 1 ml, pooled together on ice) were performed after euthanasia at day 3 and 7 post-bleomycin challenge. After centrifugation (200 g, 4°C, 8 min), the supernatant was aliquoted and stored at -80°C until subsequent use to determine protein concentration and tumour necrosis factor α (TNF α) levels (see below).

The protein concentration in BAL supernatants was assessed by the Bradford method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). TNF α concentrations (pg/ml) were measured (in triplicates at room temperature) by AlphaLISA technology (AL505 C/F, PerkinElmer Discovery Services, RRID:SCR_012163, Montreal, Quebec, Canada) following manufacturer's recommendation, from a standard curve (dynamic range is from 2.0 to 30,000 pg/ml), after reading with the EnVision-Alpha Reader (PerkinElmer).

Cell pellets were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; 500 μ l), and cell suspensions were then diluted at a density of 1×10^6 cells/ml before cytocentrifugation (300 rpm, 3 min, Shandon Cytospin 3 Centrifuge, Block Scientific, North Bellport, NY, USA) onto glass slides (4×10^4 cells/slide). Cells were then stained with Hema-3[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to allow differential cell count (number of neutrophils, macrophages, lymphocytes and eosinophils reported as a percentage, among a total of 400 leukocytes/slide).

2.7 | Short-circuit current measurements through primary alveolar epithelial cells

Primary alveolar epithelial cells were isolated from adult Sprague–Dawley rats (Aubin Vega et al., 2019; Dagenais et al., 2004, 2006). Animals were anaesthetized by i.p. lethal injection of somnotol

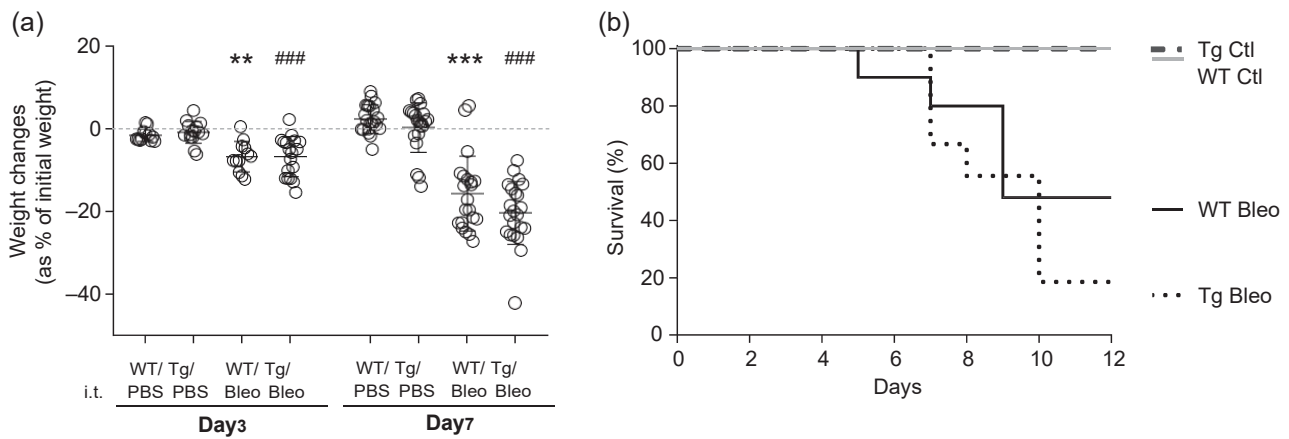


FIGURE 1 Impact of ENaC downregulation on weight changes and survival after bleomycin-induced acute lung injury in mice. Weight changes (a) and survival (b) (%) were compared as a function of time after i.t. installation (at day 1) of saline (0.9%, 50 μ l) or bleomycin (Bleo, 4 U/kg, 50 μ l), in WT or α ENaC(-/-)Tg+ NMRI mice. Values are mean \pm SD. (a) Weight changes. Day 3: D'Agostino–Pearson omnibus normality test, $P < 0.0001$, one-way ANOVA followed by bonferroni *post hoc* test, $n = 12$ –18. Day 7: normality test negative, Kruskal–Wallis followed by Dunns *post hoc* test, $n = 21$ –22. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WT Ctl at the same time point. ### $P < 0.001$ vs. Tg Ctl at the same time point. (b) Survival curve. Log-rank Mantel–Cox test, $n = 6$ –19. ** $P < 0.01$ vs. WT Ctl curve, ### $P < 0.01$ vs. Tg Ctl curve

(40 mg/kg), exsanguinated, tracheatomized and lungs were inflated and perfused to remove excess blood and alveolar macrophages before digestion with elastase (160 U/rat). After collection, lungs were minced and the resulting suspension was filtered. A differential adherence technique was then used to discard the remaining macrophages to purify alveolar epithelial cells, which were then seeded on permeant filters in minimum essential medium + fetal bovine serum 10% + sepramycin. At day 3, alveolar cell cultures were treated or not with bleomycin (apical side, 50 mU/ml, a dose determined in a previous study; Aubin Vega et al., 2019) for 24 h before short-circuit currents measurements in Ussing chamber (Dagenais et al., 2004, 2006). Amiloride (10 μ M, apical side) was then applied to compare amiloride-sensitive sodium transepithelial currents.

2.8 | Statistical analysis

Mice survival rates are represented as a percentage of living mice in the initial experimental group. All other data are presented as means \pm standard deviation (SD). Graphs and statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (v5-8, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Normality tests (Agostino and Pearson) were first performed, followed by statistical tests, adapted to each type of experiments, as specified in each figure legend. A P -value < 0.05 was considered significant.

3 | RESULTS

Lung delivery of bleomycin (Bleo, 4 U/kg) was associated with a significant loss of weight, an indicator of the clinical deterioration of animal condition, in WT mice at day 3 and 7 (Figure 1a). This weight

loss was slightly, but not significantly, greater in α ENaC(-/-)Tg+ mice (Tg), at day 7 after the bleomycin challenge.

A 100% survival rate was observed in WT and α ENaC(-/-)Tg+ mice in control conditions, whereas bleomycin-induced ALI resulted in increasing mortality rates in both groups (WT Bleo and Tg Bleo). The trend in higher mortality in α ENaC(-/-)Tg+, compared to WT mice, was not statistically significant ($P = 0.2782$, Figure 1b).

The levels of TNF α , which plays a key role in alveolar damage and dysfunction after ALI (Patel et al., 2013), were then measured in the BALs of WT and α ENaC(-/-)Tg+ mice. Our results showed that the increase in TNF α induced after bleomycin delivery was higher at day 3 in transgenic than in WT mice. The TNF α concentration in Tg mice then diminished at day 7 to a level similar as the one measured in WT mice (Figure 2a).

Differential cell counts of immune cells indicated a similar increase in neutrophils in WT and transgenic mice, with a parallel decrease in the proportion of macrophages, after the bleomycin challenge (Figure 2b, c). In all experimental conditions, the proportion of lymphocytes and eosinophils remained lower than 5% (data not shown).

Our data also showed that alveolar damage induced by bleomycin was associated with a progressive increase in protein concentration in BAL supernatants, which was significant as early as day 3 in α ENaC(-/-)Tg+ mice, whereas significance was reached at day 7 in WT mice (Figure 3). The trend in higher protein content in BAL from α ENaC(-/-)Tg+ mice collected at day 7, compared to WT, remained non-statistically significant.

α ENaC downregulation in transgenic mice was also accompanied with a small, but significant, elevation of the baseline wet/dry ratio (Figure 4), 3 days following i.t. instillation with the PBS (control condition). However, oedema flooding, following damage of the alveolar epithelial/endothelial barrier induced by bleomycin, was

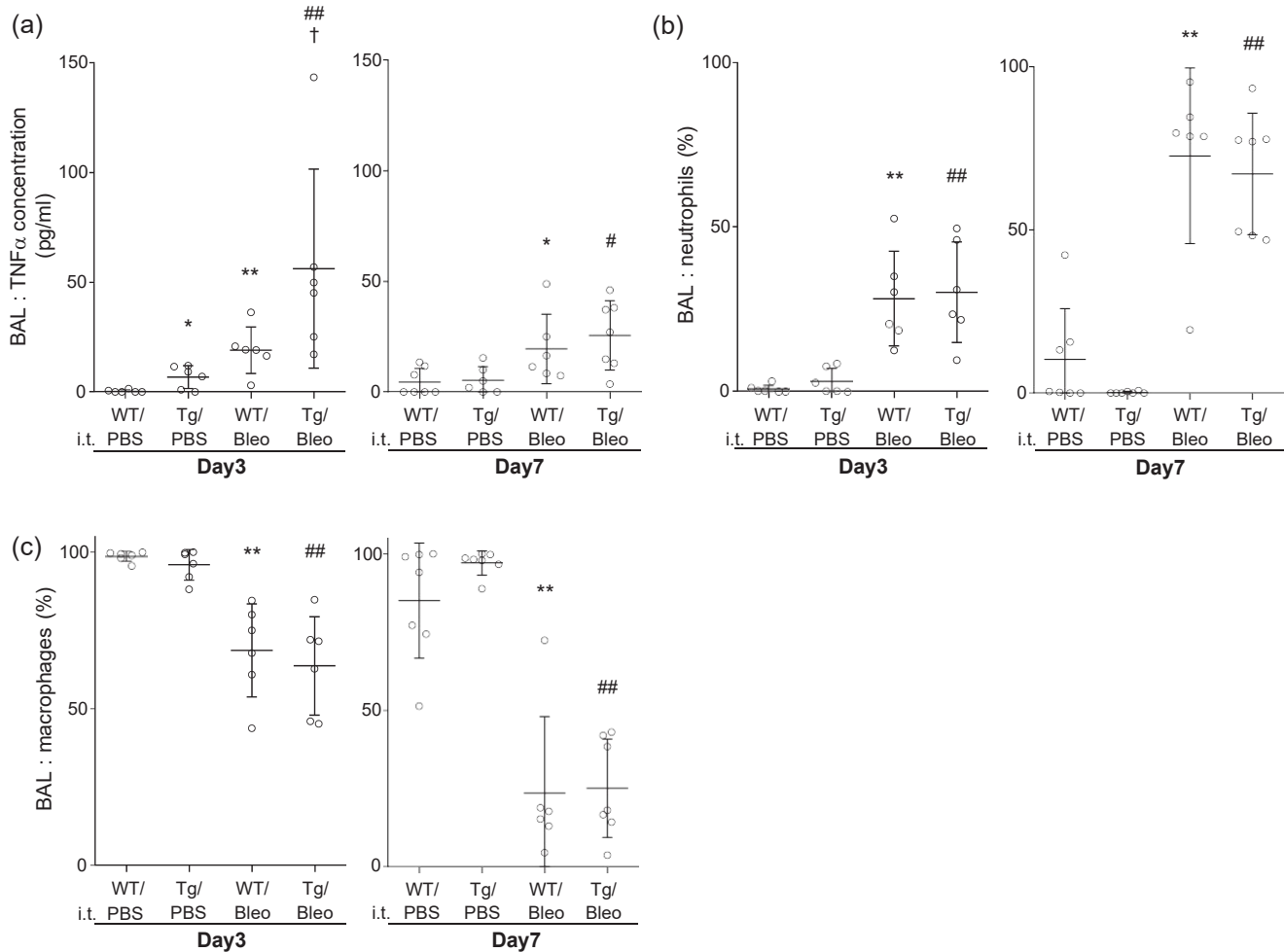


FIGURE 2 Effect of ENaC downregulation on the inflammatory response after bleomycin-induced acute lung injury in mice. (a) TNF α levels (pg/ml) detected at day 3 ($n = 6$) and 7 ($n = 6-7$) in BAL collected from WT or α ENaC($-/-$)Tg+ mice after bleomycin (4 U/kg, 50 μ l)-induced lung injury. (b, c) Differential cell count (% of neutrophils (b) and macrophages (c)) in BAL collected from Tg mice 3 or 7 days after the bleomycin challenge (4 U/kg, 50 μ l i.t., $n = 6-7$). Values are means \pm SD, * $P < 0.05$ vs. WT Ctl condition, ** $P < 0.01$ vs. WT Ctl, # $P < 0.05$ vs. Tg Ctl, ## $P < 0.01$ vs. Tg Ctl, † $P < 0.05$ vs. WT Bleo at the same time point. Mann–Whitney test (a, between WT Ctl vs. Tg Ctl and WT bleo vs. Tg bleo); one-way ANOVA; Kruskal–Wallis, Dunn’s *post hoc* test (b, c)

similar ($P = 0.9071$) in the lungs of mice harbouring normal (WT) and reduced (Tg) ENaC expression (Figure 4a). As shown in Figure 4b, we verified that bleomycin *per se* did not significantly impact ENaC currents through alveolar epithelial cells, which are responsible for secondary liquid resorption.

Because a previous study (Egli et al., 2004) showed that these transgenic mice exhibited slower resolution rates of lung oedema in a model of thiourea-induced vascular permeability (Cunningham and Hurley, 1972), we felt that it was important to demonstrate that the lack of worsening in the bleomycin model was not due to a defective phenotype of α ENaC($-/-$)Tg+ mice used in our protocol. As shown in Figure 5, α ENaC impairment resulted in slight but significant increase in baseline wet/dry ratio in α ENaC($-/-$)Tg+ mice (Tg/PBS vs. WT/PBS at 4 h). This is similar to what was observed in the bleomycin protocol (Figure 4). Moreover, WT mice exhibited a significant decrease in lung oedema at 7 h (WT/Thio 4 h vs. WT/Thio 7 h), whereas no resolution was observed in α ENaC($-/-$)Tg+ mice (Tg/Thio 4 h vs.

Tg/Thio 7 h, Figure 5). This impairment in lung oedema resolution in the α ENaC($-/-$)Tg+ mice is in agreement with previous observations by Egli et al. (2004).

4 | DISCUSSION

Our study shows that ENaC downregulation in α ENaC($-/-$)Tg+ mice did not worsen the outcomes of bleomycin-induced lung injury, an animal model harbouring significant alveolar damage, inflammatory response and lung oedema flooding.

Several observations indicate that the primary outcomes of bleomycin are not severely aggravated in the α ENaC($-/-$)Tg+ mice. First, the progressive reduction in body weight that is associated with intratracheal instillation of bleomycin (Cowley et al., 2019) was not increased in Tg compared to WT mice (Figure 1). Secondly, the number of mice requiring euthanasia because they reached

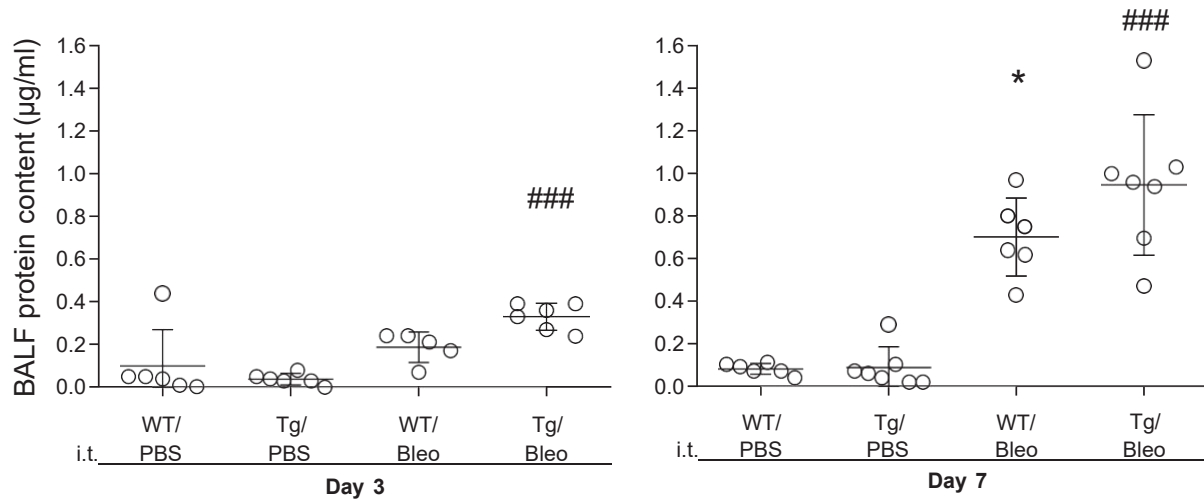


FIGURE 3 Effect of ENaC downregulation on alveolar epithelial damage after bleomycin-induced acute lung injury in mice. The concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) of proteins in BAL fluid (BALF) was measured at day 3 ($n = 5-6$) and 7 ($n = 6-7$) for each group (WT Ctl, WT Bleo, Tg Ctl and Tg Bleo). Values are means \pm SD, * $P < 0.05$ vs. WT Ctl condition, ### $P < 0.001$ vs. Tg Ctl condition at the same time point. One-way ANOVA; Kruskal–Wallis, Dunn's *post hoc* test

endpoints, established by the Institutional Animal Protection Committee, was not statistically different in the two Bleo experimental groups (WT/Bleo vs. Tg/Bleo). Although Hummler *et al.* demonstrated that the lethal pulmonary phenotype of αENaC KO mice at birth (Hummler *et al.*, 1996) was rescued by transgenic αENaC expression (Hummler *et al.*, 1997) in physiological conditions, the survival rates of these $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice during pathological experimental models (e.g. with exposure to hyperoxia or thiourea; Egli *et al.*, 2004) have, however, not been reported.

Although bleomycin did induce, as expected, an inflammatory response in the lungs, it was almost identical in the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ and WT mice at day 7. Indeed, no difference in differential immune cell counts in BAL was noted between WT and Tg mice at days 3 and 7 post-bleomycin (Figure 2). There was, however, a 2.9-fold increase in $\text{TNF}\alpha$ at day 3 after bleomycin instillation in Tg mice, compared to the WT Bleo group. This increase in $\text{TNF}\alpha$ level did not persist over time since it reached a value similar to that measured in BAL from WT Bleo mice on day 7. This early (day 3) exacerbated pro-inflammatory $\text{TNF}\alpha$ levels during bleomycin-induced ALI in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice has, to the best of our knowledge, never been reported before. However, a relationship between ENaC downregulation and inflammation has previously been shown in a model of transgenic mice with reduced βENaC expression, exhibiting higher renal cytokine levels ($\text{TNF}\alpha$, interleukin (IL)-6 and IL-1 β), which could be secondary to altered blood flow and defective autoregulatory response (Drummond *et al.*, 2011; Grifoni *et al.*, 2010). However, the mechanism by which αENaC impairment may be responsible for increased lung $\text{TNF}\alpha$ levels, as observed in our study at day 3 after bleomycin, would deserve clarification in further studies.

Could the transient increase in $\text{TNF}\alpha$ be involved in the lung injury of the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice? Indeed, $\text{TNF}\alpha$ has been shown to play a role in tight junction protein and lung barrier alteration as well

as alveolar damage and dysfunction (Mazzon and Cuzzocrea, 2007; Patel *et al.*, 2013). Therefore, the inflammatory response to bleomycin with enhanced $\text{TNF}\alpha$ levels on day 3 might have contributed to the significant rise in BAL proteins that we observed as early as day 3 in Tg Bleo mice (Figure 3). At this time point, the ongoing alveolar damage is, however, probably not sufficiently severe/uniform to lead to a significant increase in wet/dry weight. At day 7, $\text{TNF}\alpha$ and proteins reached similar levels in WT Bleo and Tg Bleo mice (Figures 2 and 3), indicating that ENaC impairment did not elicit a sustained aggravating effect on the inflammatory response and permeability of the alveolar barrier. At this time point, the alveolar injury is well established leading to a statistically significant increase in wet/dry weight ratio in both WT and Tg mice. However, our data showed that the oedema level was not significantly increased in Tg Bleo, compared to WT Bleo mice (Figure 4). Indeed, although we observed on day 3 following PBS instillation a slightly, but significantly, higher W/D ratio in Tg than WT mice, the decrease in ENaC expression in the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice did not worsen the severity of lung oedema after the bleomycin-induced ALI on day 7.

The lack of oedema worsening in $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ Bleo mice is surprising since the capacity to remove pulmonary oedema is impaired in most patients with ARDS, at least in part due to decreased expression and function of ENaC and Na^+/K^+ -ATPase (for review see Matthay, 2014). Indeed, ENaC downregulation has been reported during ARDS and in several ALI models (Huppert and Matthay, 2017). Furthermore, decreased ENaC expression and fluid transport through ATII cells have also been measured after exposure to oedema fluids from ARDS patients (Lee *et al.*, 2007). We have also previously observed that $\text{TNF}\alpha$, which is elevated on day 3 in the $\alpha\text{ENaC}(-/-)\text{Tg}+$ mice (Figure 2), downregulated the expression and activity of ENaC channels, and secondarily liquid clearance through the alveolar epithelium (Dagenais *et al.*, 2004, 2006). Based

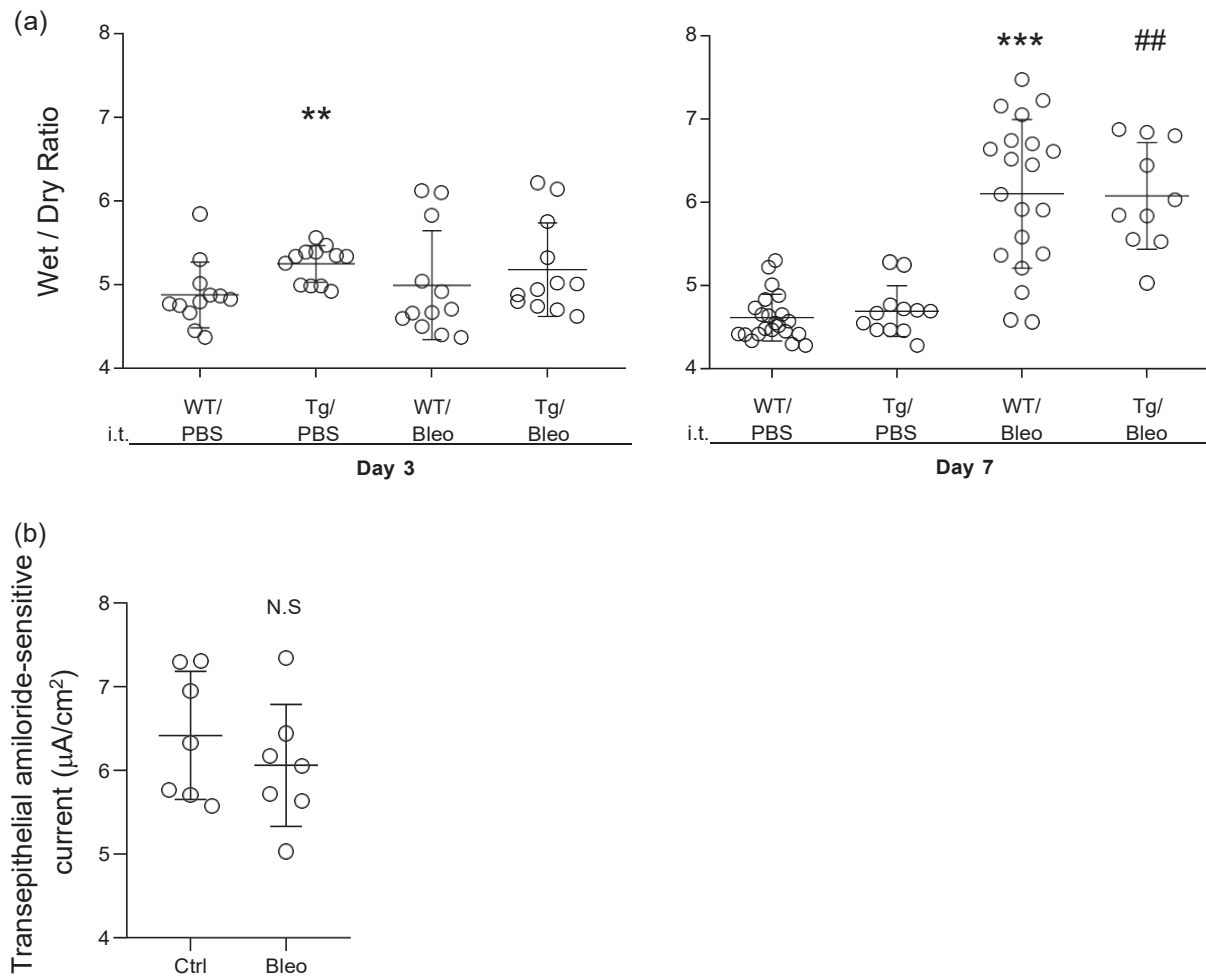


FIGURE 4 Effect of ENaC downregulation on oedema formation after bleomycin-induced acute lung injury. (a) Wet-to-dry lung weight ratios (oedema index) were measured 3 ($n = 12$) and 7 days ($n = 10$ – 22) after instillation (day 1) of saline (0.9%) or bleomycin (Bleo, i.t., 4U/kg) in WT or α ENaC(-/-)Tg+ mice. (b) Amiloride-sensitive short-circuit current measurements in Ussing chamber through primary cultures of alveolar epithelial cells (isolated from rat lungs), pretreated or not for 24 h with bleomycin (50 μ U/ml, apical side, $n = 7$). Values are means \pm SD. (a) ** $P < 0.01$ vs. WT Ctrl mice, *** $P < 0.001$ vs. WT Ctrl condition, ## $P < 0.01$ vs. Tg Ctrl mice. One-way ANOVA; Kruskal–Wallis; Dunn’s *post hoc* test for each time point. (b) Non-significant (N.S.) vs. Ctrl condition. Non-parametric Mann–Whitney *U*-test

on these observations, we should expect a significant increase in wet/dry weight ratio in the α ENaC(-/-)Tg+ compared to WT mice on days 3 and 7. At day 3, the lack of significant increase in wet/dry ratio is probably due to the fact that the level of alveolar injury is variable/heterogeneous and not severe enough (Figure 3) to lead to a substantial amount of lung oedema in all animals. Indeed, the individual data in Figure 4a show that only a few animals exhibited an increased wet/dry weight ratio in response to bleomycin compared to the PBS control group. At day 7, there is a sustained inflammatory response (Figure 2) and significant alveolar injury (increase in BAL proteins, Figure 3) that could lead to a decrease in ENaC activity and a rise in wet/dry weight ratio in both WT and Tg mice. Indeed, we have previously shown that bleomycin induces severe alveolar damage with pneumocyte sloughing (Aubin Vega et al., 2019). A loss or injury of type I and type II alveolar epithelial cells, expressing ENaC channels, might impair sodium and liquid absorption. As shown in one of our recent studies, wounded cultured alveolar epithelial

cells induced a decrease in ENaC mRNA expression (Dagenais et al., 2018). Beside epithelial injury, the associated inflammatory response observed (day 7, Figure 2) could also lead to a decrease in ENaC activity and expression (Dagenais et al., 2004, 2006). The lack of oedema worsening in α ENaC(-/-)Tg+, compared to WT mice, can be explained by the fact that the alveolar damage and inflammatory response probably decreased ENaC function in both the WT and Tg models. The interrelationship between ENaC expression/activity and alveolar injury/repair would thus deserve further study since recent evidence suggests a role of ENaC in the wound healing processes of various cellular types (for review see Chifflet and Hernandez, 2016).

Is it possible that the results observed might not be related to an impact of epithelial injury or to the associated inflammatory response but rather to a direct effect of bleomycin? Folkesson et al. previously reported a decreased expression and function of ENaC in alveolar epithelial cells isolated from rat lungs, 10 days after intratracheal administration of bleomycin (Folkesson et al., 1998). Surprisingly, they

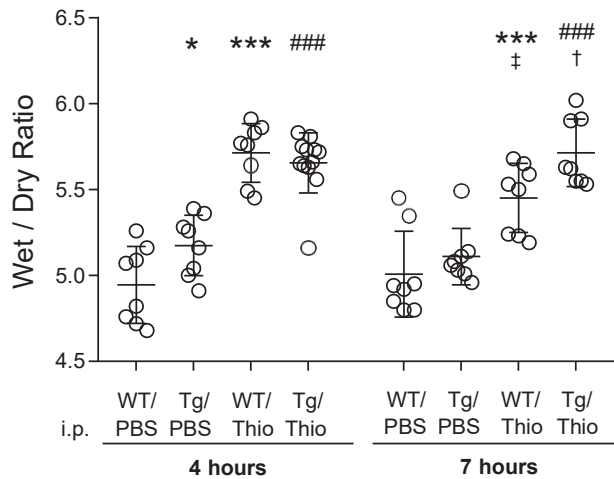


FIGURE 5 Effect of ENaC downregulation on oedema formation after a thiourea challenge in mice. Wet-to-dry lung weight ratios (oedema index) were measured 4 h ($n = 8-12$) and 7 h ($n = 8$) days after initial i.p. injection of saline (0.9%, Ctl) or thiourea (40 mg/kg, Thio), in WT or α ENaC(-/-)Tg+ mice. Values are means \pm SD, * $P < 0.05$ vs. WT Ctl condition, *** $P < 0.001$ vs. WT Ctl condition, ### $P < 0.001$ vs. Tg Ctl mice condition, † $P < 0.05$ vs. WT Thio condition at the same time point, † $P < 0.05$ vs. WT Thio at 4h condition. Two-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test

also observed an increase in alveolar liquid clearance in rat lungs at this time point. This improved alveolar clearance was explained by an increase in the number of alveolar type II cells due to the ongoing repair phase occurring 10 days after bleomycin (Folkesson et al., 1998). This is a major difference between our studies. Whereas we focused on the acute exudative inflammatory phase, featuring a severe epithelial damage, theirs was done when epithelial repair was ongoing, as shown by the increased number of alveolar type II cells. This is also confirmed by the fact that there was a minimal increase in wet/dry weight ratio in their animals, compared to the one measured in ours. Nevertheless, since their data suggest that bleomycin might have downregulated ENaC, we studied the impact of bleomycin on ENaC activity in rat alveolar type II cells in primary culture. As shown in Figure 4b, we did not observe a direct effect of bleomycin on ENaC currents.

We could also wonder if the lack of oedema/damage worsening that we observed might be secondary to a loss of the ENaC transgenic phenotype in the α ENaC(-/-)Tg+ mice used in our study. To explore this possibility, we evaluated in our α ENaC(-/-)Tg+ mice, as was done previously (Egli et al., 2004), lung oedema resolution after a thiourea challenge (Figure 5). The thiourea model is characterized by an increase in vascular permeability (while the alveolar epithelial integrity is quite preserved; Cunningham and Hurley, 1972; Egli et al., 2004; Giri et al., 1991; Michel, 1985), whereas the bleomycin model features severe alveolar epithelial injury (Aubin Vega et al., 2019; Matute-Bello et al., 2008). In agreement with the previous findings of Egli et al. (2004), we observed impaired lung oedema resolution after thiourea, confirming the expected downregulated ENaC phenotype in our transgenic mice.

We are aware that there are potential limitations to our study. Indeed, the mouse strain (NMRI) is not the one most frequently used

(C57BL/6J) in studies on bleomycin-induced lung injury. Nevertheless, the outcomes we observed, as measured by survival, weight loss, oedema level and inflammatory response, are similar to the one observed in the C57BL/6J strain (Chua et al., 2007; Cowley et al., 2019; Milton et al., 2012). Moreover, our results might have been impacted by the sacrifice of some mice, which had reached the endpoints established by the Institutional Animal Protection Committee. However, to avoid a potential bias by using the animals with the better outcomes, mice reaching endpoints were included in the calculation of the weight changes and survival rates. Subsequent experimental procedures were performed 3 and 7 days after the bleomycin challenge where no (day 3) or minimal (day 7) mortality rates were observed.

Altogether, our data indicated that ENaC downregulation in α ENaC(-/-)Tg+ mice does not elicit a significant impact on the main outcomes in the bleomycin model, featuring severe alveolar damage. This suggests that the recovery process after ALI is dependant not only on lung capacity, mainly driven by ENaC, to remove fluid, but also on alveolar epithelial ability to restore its integrity and function. This might also explain why therapies aimed only at enhancing oedema resolution through ENaC stimulation have failed (Matthay et al., 2011; Smith et al., 2012). Indeed, both ENaC alteration and alveolar damage have been reported in ARDS patients, which may contribute to the lack of efficacy of pharmacological treatments targeting ENaC. Thus, the development of novel therapeutic avenues that favour the restoration of alveolar integrity as well as its capacity for oedema resolution will be essential for patient recovery (Berthiaume et al., 1999; Fitzgerald et al., 2014; Matthay, 2014; Shimabukuro et al., 2003; Ware and Matthay, 2000).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs Jacinthe Lavoie for her valuable technical assistance with the bleomycin model. We thank Dr E. Hummler who kindly provided the initial breeding pair (on NMRI background) of the α ENaC(-/-)Tg+ mice. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, to Y.B., CIHR grants MOP-111054, PJT153406 and PJT166004 to E.B.), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, discovery grant RGPIN-2016-04378 to E.B.), CRCHUM and Université de Montréal (scholarship to E.B.). M.A.V. also acknowledges studentships from the NSERC and the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). The CRCHUM is supported by a Centre grant from FRQ-S. Authors are members of the Respiratory Health Research Network of Québec. The funders have no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MAV, C.C., A.D., Y.B. and E.B. contributed to the conception and/or design of the study. All authors have been involved in data acquisition, analysis, and/or interpretation, as well as manuscript drafting/revision. All authors have read and approved the final version of this manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as

authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Adir, Y., Welch, L. C., Dumasius, V., Factor, P., Sznajder, J. I., & Ridge, K. M. (2008). Overexpression of the Na⁺K⁺-ATPase α 2-subunit improves lung liquid clearance during ventilation-induced lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(6), L1233–L1237.
- Aeffner, F., Bolon, B., & Davis, I. C. (2015). Mouse models of acute respiratory distress syndrome. *Toxicologic Pathology*, 43, 1074–1092.
- Albertine, K. H. (1998). Histology of pulmonary edema and the acute respiratory distress syndrome. In M. A. Matthay & D. Ingbar (Eds.), *Lung Biology in Health and Disease* (pp. 37–83). New York: Marcel Dekker.
- Aubin Vega, M., Chupin, C., Pascariu, M., Privé, A., Dagenais, A., Berthiaume, Y., & Brochiero, E. (2019). Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice. *Physiological Reports*, 7(21), e14253.
- Basset, G., Crone, C., & Saumon, G. (1987a). Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *Journal of Physiology*, 384(1), 325–345.
- Basset, G., Crone, C., & Saumon, G. (1987b). Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *Journal of Physiology*, 384(1), 311–324.
- Berthiaume, Y., Lesur, O., & Dagenais, A. (1999). Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax*, 54(2), 150–160.
- Chifflet, S., & Hernandez, J. A. (2016). The epithelial sodium channel and the processes of wound healing. *BioMed Research International*, 2016, 5675047.
- Chua, F., Dunsmore, S. E., Clingen, P. H., Mutsaers, S. E., Shapiro, S. D., Segal, A. W., Roes, J., & Laurent, G. J. (2007). Mice lacking neutrophil elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*, 170(1), 65–74.
- Cowley, P. M., Roberts, C. R., & Baker, A. J. (2019). Monitoring the health status of mice with bleomycin-induced lung injury by using body condition scoring. *Comparative Medicine*, 69(2), 95–102.
- Cunningham, A., & Hurley, J. (1972). Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study. *Journal of Pathology*, 106(1), 25–35.
- Dagenais, A., Desjardins, J., Shabbir, W., Roy, A., Filion, D., Sauvé, R., & Berthiaume, Y. (2018). Loss of barrier integrity in alveolar epithelial cells downregulates ENaC expression and activity via Ca²⁺ and TRPV4 activation. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 470(11), 1615–1631.
- Dagenais, A., Fréchette, R., Clermont, M.-E., Massé, C., Privé, A., Brochiero, E., & Berthiaume, Y. (2006). Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291, L1220–L1231.
- Dagenais, A., Fréchette, R., Yamagata, Y., Yamagata, T., Carmel, J.-F., Clermont, M.-E., Brochiero, E., Massé, C., & Berthiaume, Y. (2004). Downregulation of ENaC activity and expression by TNF- α in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(2), L301–L311.
- Drummond, H. A., Grifoni, S. C., Abu-Zaid, A., Gousset, M., Chiposi, R., Barnard, J. M., Murphey, B., & Stec, D. E. (2011). Renal inflammation and elevated blood pressure in a mouse model of reduced β -ENaC. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 301(2), F443–F449.
- Egli, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., Sartori, C., & Scherrer, U. (2004). Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *Journal of Physiology*, 560(3), 857–865.
- Factor, P., Dumasius, V., Saldias, F., Brown, L. A., & Sznajder, J. I. (2000). Adenovirus-mediated transfer of an Na⁺K⁺/ATPase β 1 subunit gene improves alveolar fluid clearance and survival in hyperoxic rats. *Human Gene Therapy*, 11(16), 2231–2242.
- Fang, X., Song, Y., Zemans, R., Hirsch, J., & Matthay, M. A. (2004). Fluid transport across cultured rat alveolar epithelial cells: A novel in vitro system. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1), L104–L110.
- Fitzgerald, M., McAuley, D. F., & Matthay, M. (2014). Is there a need for emerging drugs for the acute respiratory distress syndrome? *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 19(3), 323–328.
- Folkesson, H. G., Nitenberg, G., Oliver, B. L., Jayr, C., Albertine, K. H., & Matthay, M. A. (1998). Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin. *American Journal of Physiology*, 275(3 Pt 1), L478–L490.
- Giri, S. N., Hollinger, M. A., & Rice, S. A. (1991). Effects of thiourea on pulmonary vascular permeability and on lung and plasma histamine levels in rats. *Toxicology Letters*, 57(3), 283–290.
- Goto, H., Ledford, J. G., Mukherjee, S., Noble, P. W., Williams, K. L., & Wright, J. R. (2010). The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(12), 1336–1344.
- Grifoni, S. C., Chiposi, R., McKey, S. E., Ryan, M. J., & Drummond, H. A. (2010). Altered whole kidney blood flow autoregulation in a mouse model of reduced β -ENaC. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 298(2), F285–F292.
- Guilbault, C., Martin, P., Houle, D., Boghdady, M. L., Guiot, M. C., Marion, D., & Radzioch, D. (2005). Cystic fibrosis lung disease following infection with *Pseudomonas aeruginosa* in *Cftr* knockout mice using novel non-invasive direct pulmonary infection technique. *Laboratory Animals*, 39(3), 336–352.
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., & Rossier, B. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in α -ENaC-deficient mice. *Nature Genetics*, 12, 925–928.
- Hummler, E., Barker, P., Talbot, C., Wang, Q., Verdumo, C., Grubb, B., Gatzky, J., Burnier, M., Horisberger, J. D., Beermann, F., Boucher, R., & Rossier, B. (1997). A mouse model for the renal salt-wasting syndrome pseudo-hypoadosteronism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94(21), 11710–11715.
- Huppert, L. A., & Matthay, M. A. (2017). Alveolar fluid clearance in pathologically relevant conditions: In vitro and in vivo models of acute respiratory distress syndrome. *Frontiers in Immunology*, 8, 371.
- Ingbar, D., Wendt, C., & Crandall, E. D. (1998). Na,K-ATPase and the clearance of pulmonary edema fluid. In M. Matthay & D. Ingbar (Eds.), *Pulmonary Edema* (pp. 477–499). New York: Marcel Dekker.
- Lee, J. W., Fang, X., Dolganov, G., Fremont, R. D., Bastarache, J. A., Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2007). Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24109–24119.
- Li, T., & Folkesson, H. G. (2006). RNA interference for α -ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(4), L649–L660.
- Li, T., Koshy, S., & Folkesson, H. G. (2007). Involvement of α ENaC and Nedd4-2 in the conversion from lung fluid secretion to fluid absorption at birth in the rat as assayed by RNA interference analysis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(4), L1069–L1078.

- Matthay, M. A. (2014). Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *189*(11), 1301–1308.
- Matthay, M. A., Brower, R. G., Carson, S., Douglas, I. S., Eisner, M., Hite, D., Holets, S., Kallet, R. H., Liu, K. D., MacIntyre, N., Moss, M., Schoenfeld, D., Steingrub, J., & Thompson, B. T. (2011). Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized β 2-agonist for treatment of acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *184*(5), 561–568.
- Matthay, M. A., Zemans, R. L., Zimmerman, G. A., Arabi, Y. M., Beitler, J. R., Mercat, A., . . . Calfee, C. S. (2019). Acute respiratory distress syndrome. *Nature Reviews. Disease Primers*, *5*(18), 1–22.
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *295*, L379–L399.
- Mazzon, E., & Cuzzocrea, S. (2007). Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respiratory Research*, *8*(1), 75.
- Michel, R. P. (1985). Lung microvascular permeability to dextran in a naphthylthiourea-induced edema. *American Journal of Pathology*, *119*(3), 474–484.
- Milton, P. L., Dickinson, H., Jenkin, G., & Lim, R. (2012). Assessment of respiratory physiology of C57BL/6 mice following bleomycin administration using barometric plethysmography. *Respiration*, *83*(3), 253–266.
- O'Brodovich, H., Hannam, V., Seear, M., & Mullen, J. B. M. (1990). Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *Journal of Applied Physiology*, *68*(4), 1758–1762.
- Patel, B. V., Wilson, M. R., Dea, K. P. O., & Takata, M. (2013). TNF-induced death signaling triggers alveolar epithelial dysfunction in acute lung injury. *Journal of Immunology*, *190*, 4274–4282.
- Richard, J. C., & Guérin, C. (2006). Animal models of ARDS. *Resuscitation*, *15*, 21–28.
- Saito, F., Tasaka, S., Inoue, K. I., Miyamoto, K., Nakano, Y., Ogawa, Y., Yamada, W., Shiraishi, Y., Hasegawa, N., Fujishima, S., Takano, H., & Ishizaka, A. (2008). Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *38*(5), 566–571.
- Shimabukuro, D. W., Sawa, T., & Gropper, M. A. (2003). Injury and repair in lung and airways. *Critical Care Medicine*, *31*(8 Suppl), S524–S531.
- Smedira, N., Gates, L., Hastings, R., Jayr, C., Sakuma, T., Pittet, J. F., & Matthay, M. A. (1991). Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits. *Journal of Applied Physiology*, *70*(4), 1827–1835.
- Smith, F. G., Perkins, G. D., Gates, S., Young, D., McAuley, D. F., Tunnicliffe, W., Khan, Z., & Lamb, S. E. (2012). Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): A multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*, *379*(9812), 229–235.
- Stern, M., Ulrich, K., Robinson, C., Copeland, J., Griesenbach, U., Masse, C., Cheng, S., Munkonge, F., Geddes, D., Berthiaume, Y., & Alton, E. (2000). Pretreatment with cationic lipid-mediated transfer of the Na⁺K⁺-ATPase pump in a mouse model in vivo augments resolution of high permeability pulmonary oedema. *Gene Therapy*, *7*, 960–966.
- Trac, P. T., Thai, T. L., Linck, V., Zou, L., Greenlee, M., Yue, Q., Al-Khalili, O., Alli, A. A., Eaton, A. F., & Eaton, D. C. (2017). Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ α -ENaC channels and contribute to AFC. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *312*(6), L797–L811.
- Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, *342*(18), 1334–1349.
- Weksler, B., Ng, B., Lenert, J., & Burt, M. (1994). A simplified method for endotracheal intubation in the rat. *Journal of Applied Physiology*, *76*(4), 1823–1825.

How to cite this article: Aubin Vega M, Chupin C, Massé C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Impact of ENaC down-regulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin. *Experimental Physiology*. 2021;106:1110–1119. <https://doi.org/10.1113/EP089060>

Annexe C : Article #3

Titre: **Impact of KvLQT1 potassium channel modulation on alveolar fluid homeostasis in an animal model of thiourea-induced lung edema**

Statut: Publié dans *Frontiers in Physiology section Respiratory Physiology and Pathophysiology* en 2023



OPEN ACCESS

EDITED BY
Lars Knudsen,
Hannover Medical School, Germany

REVIEWED BY
Manfred Frick,
University of Ulm, Germany
Ulf Simonsen,
Aarhus University, Denmark
Xiaojie Luan,
University of Saskatchewan, Canada

*CORRESPONDENCE
Emmanuelle Brochiero,
✉ emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Respiratory
Physiology and Pathophysiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

RECEIVED 13 October 2022
ACCEPTED 19 December 2022
PUBLISHED 09 January 2023

CITATION
Aubin Vega M, Girault A, Adam D, Chebli J,
Privé A, Maillé É, Robichaud A and
Brochiero E (2023), Impact of
KvLQT1 potassium channel modulation on
alveolar fluid homeostasis in an animal
model of thiourea-induced lung edema.
Front. Physiol. 13:1069466.
doi: 10.3389/fphys.2022.1069466

COPYRIGHT
© 2023 Aubin Vega, Girault, Adam, Chebli,
Privé, Maillé, Robichaud and Brochiero.
This is an open-access article distributed
under the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Impact of KvLQT1 potassium channel modulation on alveolar fluid homeostasis in an animal model of thiourea-induced lung edema

Mélissa Aubin Vega^{1,2}, Alban Girault^{1,2,3}, Damien Adam^{1,2},
Jasmine Chebli^{1,2}, Anik Privé¹, Émilie Maillé¹, Annette Robichaud⁴
and Emmanuelle Brochiero^{1,2*}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada, ²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, ³Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire (LPCM), Amiens, France, ⁴SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc., Montréal, QC, Canada

Alveolar ion and fluid absorption is essential for lung homeostasis in healthy conditions as well as for the resorption of lung edema, a key feature of acute respiratory distress syndrome. Liquid absorption is driven by active transepithelial sodium transport, through apical ENaC Na⁺ channels and basolateral Na⁺/K⁺-ATPase. Our previous work unveiled that KvLQT1 K⁺ channels also participate in the control of Na⁺/liquid absorption in alveolar epithelial cells. Our aim was to further investigate the function of KvLQT1 channels and their interplay with other channels/transporters involved in ion/liquid transport *in vivo* using adult wild-type (WT) and KvLQT1 knock-out (KO) mice under physiological conditions and after thiourea-induced lung edema. A slight but significant increase in water lung content (WLC) was observed in naïve KvLQT1-KO mice, relative to WT littermates, whereas lung function was generally preserved and histological structure unaltered. Following thiourea-induced lung edema, KvLQT1-KO did not worsen WLC or lung function. Similarly, lung edema was not aggravated by the administration of a KvLQT1 inhibitor (chromanol). However, KvLQT1 activation (R-L3) significantly reduced WLC in thiourea-challenged WT mice. The benefits of R-L3 were prevented in KO or chromanol-treated WT mice. Furthermore, R-L3 treatment had no effect on thiourea-induced endothelial barrier alteration but restored or enhanced the levels of epithelial alveolar AQP5, Na⁺/K⁺-ATPase, and ENaC expressions. Altogether, the results indicate the benefits of KvLQT1 activation in the resolution of lung edema, probably through the observed up-regulation of epithelial alveolar channels/transporters involved in ion/water transport.

KEYWORDS

potassium channels, pulmonary edema, animal model, ion/liquid transport, ENaC, Na⁺/K⁺-ATPase, AQP5, lung homeostasis

1 Introduction

The epithelial tissue lining alveoli is essential to lung homeostasis and function. The alveolar epithelium is composed of alveolar type I (ATI) cells, responsible for gas exchange, and alveolar type II (ATII) cells, which produce and secrete the surfactant, crucial for alveolar stability and lung compliance. In addition, ATII cells are regarded as progenitor cells for lung

self-regeneration and repair after injury (Barkauskas et al., 2013). ATI and ATII cells also play a critical role in the control of fluids at the surface of alveoli. Indeed, fluid absorption, through the paracellular route or *via* aquaporins (AQP) across ATI and ATII cells, is essential to maintain alveolar air spaces virtually free of liquid, necessary for effective gas exchange. Liquid clearance is essentially driven by sodium (Na^+) absorption, which depends on passive entry, mainly through apical ENaC channels, and then on active Na^+ exit by the basolateral Na^+/K^+ -ATPase. Potassium (K^+) ion recycling, *via* basolateral K^+ channels, is also crucial to maintain the driving force for Na^+ absorption (Basset et al., 1987).

The importance of Na^+ transport, through ENaC channels, in alveolar fluid clearance has been demonstrated *in vitro* as well as in various animal models, in physiological conditions, and after acute lung injury (Basset et al., 1987; O'Brodovich et al., 1990; Smedira et al., 1991; Hummler et al., 1996; Fang et al., 2004; Li and Folkesson, 2006; Matthay, 2014). Notably, Hummler et al., 1996 reported that α -ENaC knock-out (KO) mice were unable to clear alveolar fluid at birth and rapidly died from respiratory distress (Hummler et al., 1996). Although partial transgenic expression of α -ENaC in α ENaC(-/-) Tg + mice rescued the lethal lung phenotype after birth, the remaining impairment in Na^+ transport was associated with a lower resolution rate of acute pulmonary edema after thiourea-induced lung injury (Egli et al., 2004; Aubin Vega et al., 2021). Several experimental studies also demonstrated the role of the Na^+/K^+ -ATPase in alveolar edema clearance (Berthiaume et al., 1987; Olivera et al., 1994; Saldías et al., 1998). Furthermore, previous work highlighted the importance of K^+ channel function in lung ion and fluid absorption. Indeed, it has been reported that KCa3.1 and K_{ATP} channels play a role in Na^+ and K^+ transport pathways and alveolar fluid clearance (Han et al., 2010). Our previous *in vitro* studies also revealed that KvLQT1 and K_{ATP} channels, which contribute to the major part of basolateral K^+ currents across primary rat alveolar epithelial cells, participate in the control of Na^+ transport, through the regulation of ENaC mRNA and protein expression (Leroy et al., 2004, 2006; Bardou et al., 2012). Furthermore, we demonstrated that pharmacological activation of KvLQT1 or K_{ATP} channels secondarily enhanced alveolar fluid clearance through the alveolar epithelium *in vitro* (Leroy et al., 2006; Bardou et al., 2012). In resected human lungs, (Sakuma et al., 1998) also reported that a K_{ATP} channel opener favored alveolar liquid absorption, by a process secondarily mediated by amiloride-sensitive ENaC channels (Sakuma et al., 1998). However, to the best of our knowledge, the function of KvLQT1 channels in lung fluid clearance has never been studied before *in vivo*.

Therefore, the aim of our study was to investigate the function of KvLQT1 channels *in vivo*, using complementary molecular and pharmacological approaches, i.e., KO mice with a targeted mutation in the gene coding for the α -subunit (KCNQ1) of the KvLQT1 channel and lung treatments with pharmacological KvLQT1 modulators. KvLQT1 function was studied in physiological conditions, and then, in a model of pulmonary edema induced by a thiourea challenge to assess the impact of KvLQT1 modulation on fluid clearance. This well-established, long-standing model is characterized by the development of lung edema, within both interstitial and alveolar spaces, peaking at ~4 h after thiourea injection (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004), which initial rapid removal has been shown to be preferentially driven through alveolar reabsorption (Havill and Gee, 1987). Our results indicated

that KvLQT1 activation favors the resolution of lung edema at 4 h, probably through the observed up-regulation in alveolar epithelial ENaC channels, AQP5, and Na^+/K^+ -ATPase expression.

2 Materials and methods

2.1 Animals and ethical statements

Mice with a targeted disruption in the *kcnq1* gene (constitutive *kcnq1*^{-/-} knock-out (KO) mice), coding for the KCNQ1 protein (α -subunit of the KvLQT1 K^+ channel) was originally generated by insertion of a neomycin cassette into exon two by Dr. K. Pfeifer's group (Laboratory of Mammalian Genes and Development, NICHD/National Institutes of Health, Bethesda, United States), as previously described (Casimiro et al., 2001). The initial breeding pairs (on a C57BL/6J background) were kindly given by Dr. K. Pfeifer. The mouse colony was then maintained by breeding heterozygous mice (male *kcnq1*^{+/-} x female *kcnq1*^{+/-}) at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) animal care facility and backcrossed with C57BL/6J wild-type mice (purchased from Jackson Laboratory) every 10 generations. Animals were maintained in a controlled environment with *ad libitum* access to water and food (2018 Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo, United States). Pups were ear punched for genotyping by PCR (using G-KOF (5'-CCA GGA GTG GGT GGT TCT AC -3'), G-KONF (5'-CGC TTC CTC GTG CTT TAC G-3') and G-KOR (5'-GCC AGC ACT AAA GAT CTT GC-3') primers (Integrated DNA Technologies, United States) amplifying 240 and 370-bp products, for WT and mutant alleles) at weaning, and designed WT and KO mice. All procedures involving the use of animals were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the CRCHUM, in agreement with Canadian Council for Animal Care (CCAC) guidelines.

2.2 *In vivo* experimental design

In vivo experiments were performed on 6–10 weeks old mice, randomly divided into the experimental groups described below (matched for weight and sex). WT and KO mice were first compared under basal physiological conditions and then after thiourea-induced acute lung edema. Thiourea (TU, 5 mg/kg, Sigma) was injected intraperitoneally (i.p., 150 μl); the control group received the same volume of PBS (i.p.) (i.e., four experimental groups: WT/PBS, KO/PBS, WT/TU, and KO/TU).

The effect of pharmacological treatments with KvLQT1 modulators was also assessed. Briefly, mice received the KvLQT1 activator R-L3 (4 μM , 1/1000 DMSO (vehicle, (veh)) in PBS, Tocris Bioscience, UK), the KvLQT1 inhibitor chromanol (Chrom, 20 μM , 1/1000 DMSO (veh) in PBS, Tocris Bioscience United States), a combination of chromanol and R-L3 (R + C) or PBS (PBS + veh (1/1000 DMSO in PBS, Sigma)) by intranasal instillation (i.n., 50 μl), 1 h before the treatment with thiourea (TU, i.p.) or PBS (PBS, i.p.). Groups (i.n./i.p.): PBS/PBS, Chrom/PBS, R-L3/PBS, PBS/TU, Chrom/TU, R-L3/TU and/or R + C/TU are indicated in each figure legends, as appropriate. 4 h after injection of thiourea (or PBS, i.p.), mice were euthanized with an overdose of pentobarbital (i.p.), and lungs were removed to perform water lung content (WLC) assays, histology/

immunofluorescence (IF) analyses or isolation of primary airway or alveolar epithelial cells (see below).

2.3 Water lung content assay

After euthanasia, the inferior vena cava was severed; the lungs were removed and directly weighed (wet weight, W). Lungs were heated to 95°C for 24 h to measure the dry weight (D) and then to calculate the water lung content using the formula (Kabir et al., 2002):

$$\text{WLC (mg/g)} = \frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{mice weight}}$$

2.4 Evans blue extravasation assay

The Evans Blue extravasation assay, a commonly used technique for pulmonary permeability evaluation after endothelial damage, was performed on thiourea-challenged mice. Briefly, animals were treated with PBS or R-L3 (4 μM, i.n.) before thiourea (5 mg/kg, i.p.) administration and finally, three and a half hour later, a solution of Evans Blue (30 mg/kg, Sigma) was injected by the tail vein (i.v.). After 30 min of blood circulation, mice were euthanized; lungs were perfused with PBS-EDTA (5 mM, 1 mL) *via* the pulmonary artery, collected, and washed in PBS baths. Lungs were then minced with scissors and incubated with formamide (Sigma) for 18 h at 37°C. The homogenate was centrifuged and the luminescence in the supernatant was measured at 620–740 nm, according to a standard curve of Evans Blue dye. Results were corrected for heme pigment with the following formula:

$$E620 \text{ (EBD corrected)} = E620 - (1.426 \times E740 + 0.030)$$

2.5 Histological analyses and immunostainings (pro-SPC and podoplanin) of cryomatrix-embedded frozen lung tissue sections

To prevent alveolar collapse, a solution of 4% paraformaldehyde (500 μl, Electron microscopy sciences, United States) was administered by intratracheal instillation (i.t.) before lung collection. Tissue samples were incubated in a sucrose gradient (24 h for each gradient of 5%, 10%, and 20%) in a solution of paraformaldehyde (.4%) and embedded in resin (Shandon Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific). After cryosections (5 μm) with a cryostat device (Leica Microsystems, CM1950110111 model), slides were then stained with hematoxylin and eosin (Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit, ThermoScientific, United States) and scanned with a Versa stand on a Leica® light microscope, before histological analysis.

For pro-SPC and podoplanin immunostainings, tissue sections were fixed with 4% paraformaldehyde, membranes were permeabilized with .01% Triton X-100 and then blocked with a solution of PBS +10% FBS (Saradigm, United States) + 10% BSA (Sigma-Aldrich) for 1 h. Slides were incubated overnight at 4°C with anti-pro-SPC (1:100, #AB3786 Millipore, United States) or anti-podoplanin (1:100, #Ab109059, Abcam) rabbit polyclonal

antibodies. The day after, tissues were blocked again and incubated with Alexa Fluor™ 568 conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies (1:200, Life Technologies, United States) for 1 h followed by a DAPI staining (1:1000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken with an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = .75) and analyzed with ICY software. Our analysis protocol allows a quantitative measurement of the intensity (in pixels) of the specific signal of each region of interest (ROI) (stained with each specific primary antibody), normalized to the total number of DAPI-positive cells (more than 10,000 cells have been analyzed for each staining). This ICY protocol also enables adjustment of the parameters of ROI detection to eliminate any potential background signal. However, our control assays (Supplementary Figure S1) showed an absence of background, confirming the specificity of all primary and secondary antibodies used in our assays.

2.6 AQP5 immunostaining on formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue sections

After mice euthanasia, an i.t. instillation of formalin (500 μl, Chaptec, Canada) was made before lung collection. Tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin, then in paraformaldehyde 4% (Electron microscopy sciences, United States), dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentrations, cleared in xylene (Chaptec), and embedded in paraffin (Leica Biosystems, United States). Tissue sections (5 μm) were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of ethanol solutions of decreasing concentrations. For AQP5 detection by immunostaining, tissue sections were processed for heat-induced antigenic retrieval (with citrate buffer, pH 3.45) and then blocked with a solution of PBS +10% FBS (Saradigm, United States) + 10% BSA (Sigma-Aldrich) + .01% Triton X-100 (Amersham Biosciences, Sweden) for 1 h. Slides were then incubated overnight at 4°C with an anti-AQP5 rabbit polyclonal antibody (1:100, #AQP-005, Alomone Labs, Israël). The day after, they were blocked again and incubated with an Alexa Fluor™ 568 conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:200, Life Technologies, United States) for 1 h followed by a DAPI staining (1:1000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken with an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = .75) and analyzed with ICY Software (see Section 2.5).

2.7 Lung function measurements

The mechanical properties of the respiratory system were assessed in live WT and KO mice, challenged, or not, with thiourea and treated or not with the KvLQT1 activator, R-L3, using the flexiVent FX system (SCIREQ, Montreal, QC, Canada), as previously described (Robichaud et al., 2017). Briefly, mice received an administration of xylazine hydrochloride (12 mg/mL, i.p) 5 min before being deeply anesthetized with sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.). They were then tracheotomized, cannulated (18-gauge metal cannula having a typical resistance of .22 cmH₂O.s/mL), and connected to a computer-controlled small animal ventilator for mechanical

ventilation. The following settings were used: a tidal volume of 10 mL/kg, frequency of 150 breaths/min, inspiratory to expiratory ratio (I:E) of 2:3, and positive end-expiratory pressure (PEEP) of three cmH₂O. Data acquisitions started after two deep lung inflations to 30 cmH₂O, to open closed lung areas as well as to standardize lung volumes, and following observation of a stable ventilation pattern without spontaneous effort. If needed, an additional dose (.25–.5 mg/kg, i.p.) of the anesthetic agent was administered and approximately 2 min of default ventilation was applied to allow for the drug effect to be reached. Four consecutive and different measurement perturbations were performed as one cycle, and the cycle was repeated until three acceptable measurements were recorded. The entire measurement sequence lasted on average 4–5 min per subject and lung function was assessed either under basal physiological conditions or 4 h after thiourea-induced lung edema. More specifically, pressure-volume (PV) curves were constructed by inflating the lungs by increments of pressure from PEEP up to 30 cm H₂O and then deflating in a similar manner. Pressure and volume signals were recorded at each increment following a brief plateau (1 s) and used to construct partial PV curves. The deflation limbs were analyzed as previously described (Robichaud et al., 2017) and used for the determination of quasi-static compliance (C_{st}). The area between the inflation and deflation limb (Area) was also calculated and the work-of-breathing was determined from the area under the inflation curve normalized to the volume at maximal pressure and expressed per liter to reflect a normalized inspiratory work of breathing (WOB_n) from a large amplitude maneuver (Phillips et al., 2012; Gremlich et al., 2020; Robichaud et al., 2021). The mechanical properties of the respiratory system were also determined, using both single (SnapShot-150) and broadband (Quick Prime-3) forced oscillation perturbations. The overall resistance (R_{rs}), elastance (E_{rs}) and compliance (C_{rs}) of the respiratory system were obtained, as previously described (Robichaud et al., 2017), from the fitting of the classic single compartment model to the experimental signals of a single forced oscillation measurement. Similarly, the constant-phase model (Hantos et al., 1992) was fit to the respiratory input impedance data from the broadband forced oscillation perturbation to describe the mechanical properties of the subject's respiratory system using parameters such as the Newtonian resistance (R_N) which is dominated by the airway resistance as well as tissue elastance (H) and tissue damping (G) to respectively express the stiffness of the respiratory tissues and the tissue resistance which contains a contribution from the small peripheral airways. Finally, an assessment of the subject's inspiratory capacity was obtained from the deep lung inflation maneuver to 30 cm H₂O, as previously described (Robichaud et al., 2017). At the end of the experiment, averages of the collected datasets were calculated, first for each subject and parameter and then for each experimental group.

2.8 Isolation of mouse airway epithelial cells

Mouse airway epithelial cells were isolated from non-treated WT and KO mice. After dissection, the trachea was cut lengthwise and incubated for the night at 4°C in minimal essential medium (MEM, Life Technologies) supplemented with 7.5% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Ontario, Canada), 10 mM HEPES (Thermo-Fisher Scientific Inc., #SH3023701), .05 mg/mL

gentamycin (Life Technologies), 50 U/mL penicillin-streptomycin (ThermoScientific), and containing a mix of .1% Protease E (from *Streptomyces griseus*; Sigma-Aldrich) and 10 µg/ml DNase (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas; Roche, United States). The cells were then gently scraped off the cartilaginous structure and the activity of protease/DNase was neutralized by adding FBS. The collected cell suspension was then centrifuged, counted, and seeded into Transwell® (.4 µm pore size, Corning, United States) coated with Purecol® (Cedarlane, Burlington, Canada). Cells were cultured in CnT-17 medium (CELLnTEC Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland) + 20% FBS for 13 days. Then, the medium bathing the apical side of the airway epithelium was removed to create an air-liquid interface. Forty-8 h later, the medium from the basolateral compartment was replaced by complete SAGM™ (LHC basal medium supplemented with the SAGM™ kit, Clonetics, Walkersville, MD) added with 25 ng/mL EGF (Sigma-Aldrich), 100 U/mL of penicillin-streptomycin (ThermoScientific), .07 µg/ml phosphorylethanolamine (Sigma-Aldrich), 1.86 ng/ml ethanolamine (Sigma-Aldrich), .05 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich), electrolytes and trace elements (kindly provided by Dr. Scott Randell, University of North Carolina) for 2 days, before electrophysiological experiments in Ussing chambers.

2.9 Measurement of short-circuit currents in Ussing chambers

Short-circuit currents (I_{sc}) were measured through polarized cultures of airway epithelial cells (isolated from WT and KO mice) grown on permeant filters at the air-liquid interface. After stabilization of the short-circuit current, the total basolateral K⁺ current was determined after permeabilization of the apical membrane with amphotericin B (7.5 µM, Sigma-Aldrich) and establishment of an apical-to-basolateral K⁺ gradient. The apical side was bathed with a high K⁺ physiological solution containing: 81 mM NaCl, 65.4 mM KCl, .78 mM NaH₂PO₄, .8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM glucose, and 15 mM HEPES, pH 7.4, whereas for the basolateral side, 60 mM of KCl was replaced by an equivalent amount of *N*-methyl-D-glucamine chloride. Therefore, all ion concentrations, except K⁺, were symmetrical in solutions bathing both sides of the membrane, meaning that only K⁺ ions can be conducted through the basolateral membrane. In these experimental conditions, the difference between total K⁺ basolateral currents in cell cultures from WT and KO mice corresponds to the current driven by KvLQT1 channels. After stabilization of the current, 20 µM chromanol was added to the basolateral medium, to determine the chromanol-sensitive basolateral K⁺ current through KvLQT1 channels.

2.10 Isolation of alveolar type II (ATII) epithelial cells

ATII cells were isolated from WT mouse lungs in the control condition and after thiourea-induced acute lung edema treated or not with R-L3. After collection, the lungs were washed with a physiological solution to remove excess blood cells and alveolar macrophages. Then, the lungs were digested within an elastase solution (30 U/mice, Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. United States, 30–45 min), minced, and the resulting cell

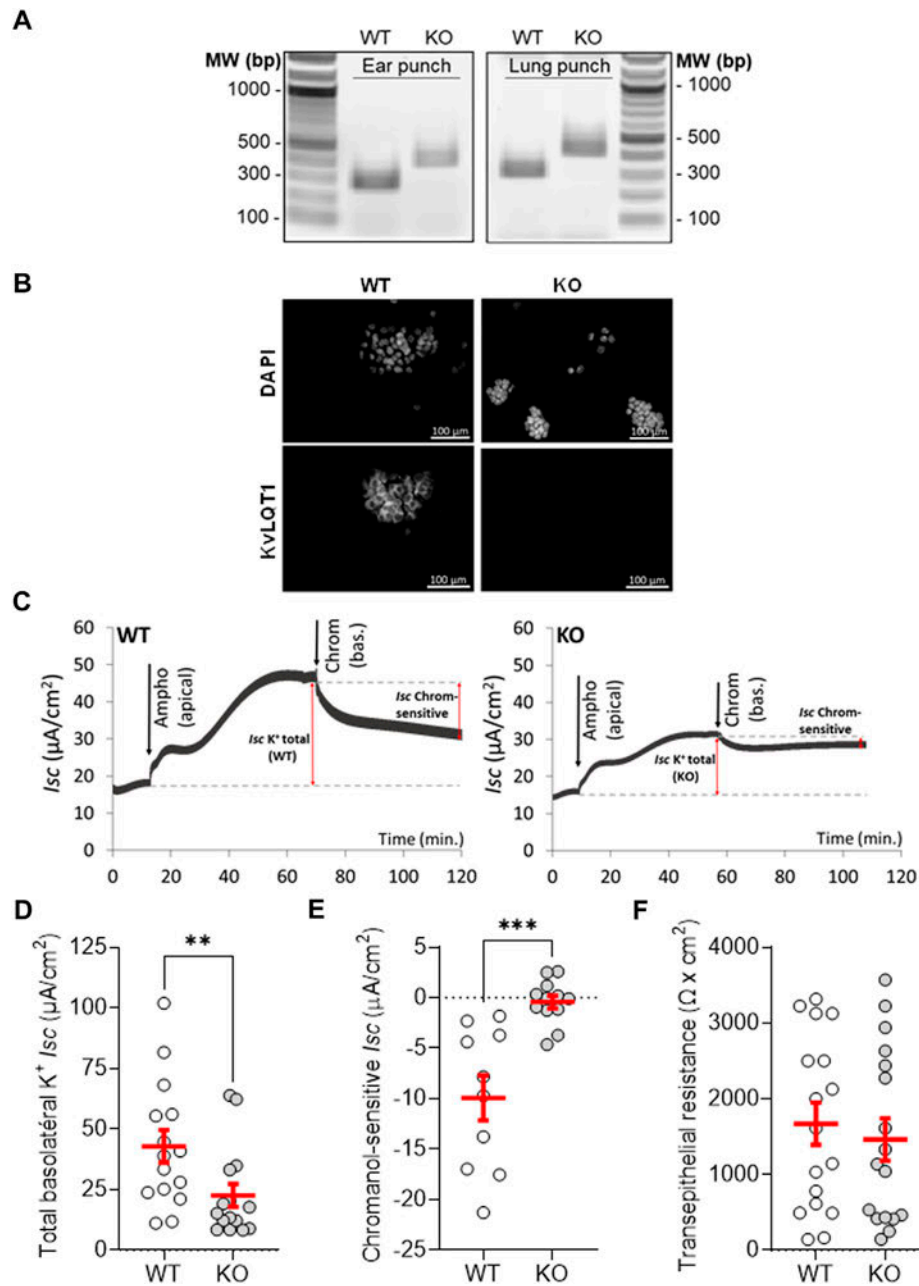


FIGURE 1

Validation of KvLQT1 extinction in mouse lungs. (A) Detection of the 240 and 370-pb products, specific to the WT and mutant alleles, amplified by PCR from genomic DNA of ear punches and lung tissues from WT and KO mice. Representative immunofluorescence images of KvLQT1 channel protein staining performed on freshly isolated mouse airway epithelial cells (B), $n = 4$, Magnification: $\times 200$ Scale: 100 μ m). (C) Representative short-circuit current traces, measured in Ussing chamber, of primary cultures of airway epithelial cells, isolated from WT (left panel) and KO mice (right panel). After current stabilization, 7.5 μ M amphotericin B was added and an apical-to-basolateral K⁺ gradient was established, before addition of 20 μ M chromanol (at the basolateral side). Total basolateral (D) and chromanol-sensitive (E) K⁺ currents (I_{sc} μ A/cm²) as well as transepithelial resistance F (Ω x cm²) of WT and KvLQT1-KO cell cultures ($n = 10$ –17). Values are means \pm SEM. Non-parametric Mann-Whitney t-test (Agostino/Pearson normality test: negative, panels (D, E) and unpaired t-test (Agostino/Pearson normality test: positive, panel (F)). ** $p < .01$, *** $p < .001$ vs. WT mice.

suspension was filtered. Alveolar epithelial cells were purified using a differential adherence technique (Dobbs et al., 1986), which enhances the purity of the ATII cell pool by up to 86% (Brochiero et al., 2004). Cells were counted and the cell suspension was resuspended in PBS to reach a density of 80,000 cells (in 200 μ l PBS/slide) after cytocentrifugation with Cytospin 4 (Thermo Fisher, UK) for immediate immunofluorescence assay.

2.11 α -ENaC and Na⁺/K⁺-ATPase immunostaining of ATII cells

Cycentrifuged, freshly isolated ATII cells were fixed with 4% paraformaldehyde, membranes were permeabilized with .01% Triton X-100 (for Na⁺/K⁺-ATPase staining) and then blocked with a solution of PBS +10% FBS (Saradigm, United States) + 10% BSA (Sigma-

Aldrich) (before α -ENaC staining) or with a solution of PBS +1% BSA + 5% goat serum (Life Technologies, United States) (before Na^+/K^+ -ATPase staining). Slides were incubated overnight at 4°C with anti- α -ENaC rabbit polyclonal (1:100, #AB2184369, Invitrogen, United States) or anti- Na^+/K^+ -ATPase mouse monoclonal (1:100, clone C464.6, Millipore, United States) antibodies. The day after, they were blocked again, incubated with Alexa Fluor™ 568 conjugated donkey anti-rabbit secondary (α -ENaC staining) or Alexa Fluor™ 568 conjugated goat anti-mouse secondary antibodies [Na^+/K^+ -ATPase staining], 1:200, Life Technologies, United States] for 1 h, followed by a DAPI staining (1:1000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken with an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = .75) and analyzed with ICY software (see Section 2.5).

2.12 Statistical analyses

The data are presented in dot plot graphs with mean \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses were performed with GraphPad Prism version eight for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). First, normality tests (Agostino/Pearson) were performed followed by the appropriate statistical tests, as described for each figure legend. Differences were considered significant when $p < .05$.

3 Results

Effective *kcnq1* extinction in lung tissues of constitutive *kcnq1*^{-/-} (KO) mice was first validated. As expected, amplification by PCR of genomic DNA extracted from ear and lung tissues of WT and KO mice generated 240 and 370-bp products specific to the WT and mutant alleles (Casimiro et al., 2001), respectively (Figure 1A). Moreover, immunofluorescence assays confirmed KvLQT1 protein extinction in airway epithelial cells collected from KO mice, compared to WT (Figure 1B).

Short-circuit current measurements in Ussing chamber (see representative traces in Figure 1C) showed that the total basolateral K^+ current in cell cultures from WT mice ($42.8 \pm 6.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, Figure 1D, WT) was significantly higher than in cultures from KO mice ($22.6 \pm 4.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, Figure 1D, KO), i.e. a difference of $20.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, corresponding to the current driven by KvLQT1 channels (47% of the total basolateral currents). We also showed that chromanol-sensitive KvLQT1 currents were abolished ($-4 \pm .7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) through primary cultures of airway epithelial cells, collected from KO mice (Figure 1E). It has to be noted that transepithelial resistances of WT and KO cell cultures were similar (Figure 1F).

The impact of KvLQT1-KO has already been studied in several organs (Casimiro et al., 2001; Knollmann et al., 2004; Boini et al., 2009; Song et al., 2009; Wang et al., 2009), but, to the best of our knowledge, the lung phenotype has not been defined yet. The observed reduction (47%, $p < .01$) in total basolateral K^+ currents in KO mice indicated the large contribution of KvLQT1 channels (Figure 1D), while remaining K^+ currents can be conducted by other classes of K^+ channels also expressed in the lung (Bardou et al., 2009). KvLQT1-KO was associated with a small but statistically significant rise in water lung content, compared to WT (Figure 2A). However, lung function analyses

showed that the PV curves (Figure 2B) constructed with the flexiVent system, as well as static compliance (C_{st} , Figure 2C) from the two experimental groups were similar. Slight but significant changes were measured in overall respiratory system resistance (Rrs), elastance (Ers), and compliance (Crs) as well as tissue damping (G), related to alterations of the peripheral tissues. No difference was observed for the other respiratory mechanic parameters measured, including airway resistance (R_N) (Supplementary Figure S2). Also, no histological differences were noticeable between lungs from WT and KO mice (Figure 2D). These results indicate that the KvLQT1 deletion did not elicit major functional and structural impairments under basal physiological conditions.

We then evaluated the role of KvLQT1 channels using a well-established acute model of thiourea-induced lung edema, peaking at 4 h (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004). As expected, increased water lung content was observed in WT mice challenged with thiourea (WT/PBS/TU, Figure 3A). In KO mice, similar levels of lung edema were measured indicating a comparable response to thiourea (WT/PBS/TU vs KO/PBS/TU groups, Figure 3A). The impact of KvLQT1 pharmacological inhibition in thiourea-challenged mice was also assessed. Chromanol administration to the lungs (by intranasal instillation) did not worsen the edema index of thiourea-challenged WT mice (WT/PBS/TU vs WT/Chrom/TU groups, Figure 3A).

In addition to the lung edema, a shift in the shape of the PV curve (Figure 3B, left panel), as reflected by a slight but statistically significant decrease in the static compliance (C_{st} ; Figure 3B, right panel) was observed after the thiourea challenge in WT mice. As shown in Supplementary Figure S3, other parameters (Ers , Crs , A , IC , and H) are also modified after thiourea-induced lung edema (PBS/TU).

Consistent with the water lung content results, no worsening of the lung function parameters (Figure 3C; Supplementary Figure S4) was observed in KO animals which exhibited similar sensitivity to thiourea. Moreover, similar histological features were seen in WT and KO thiourea mice (Figure 3D).

Interestingly, the pharmacological activation of KvLQT1 with R-L3 induced a statistically significant reduction of the water lung content in WT mice treated with thiourea (R-L3/TU mice, compared to the PBS/TU group, Figure 4A, left panel). This beneficial effect of R-L3 was abolished in KvLQT1-KO mice (R-L3/TU KO mice, Figure 4A, middle panel) as well as in WT mice co-treated with the KvLQT1 inhibitor chromanol (R-L3+Chrom/TU (R + C/TU) group, Figure 4A, right panel), thus confirming that the observed decrease in lung edema in R-L3-treated WT mice (R-L3/TU group) is mediated by KvLQT1 channels.

Exposure to thiourea is associated with alveolar capillary injury and a secondary increase in vascular permeability (Giri et al., 1991), as confirmed by the increased Evans Blue dye extravasation from the blood in lung homogenates from thiourea-challenged WT mice (Figure 4B). We thus tested the hypothesis that the beneficial effect of the KvLQT1 activator R-L3 on the edema index could be due to endothelial barrier preservation. Nonetheless, the observed increase in endothelial permeability in thiourea-challenged mice was not prevented by the R-L3 treatment (Figure 4B). Moreover, the treatment with R-L3 did not improve the shape of the PV curve, the static compliance (C_{st} , Figure 4C), and other respiratory mechanic parameters at the dose tested (Supplementary Figure S3). Hematoxylin-eosin staining of lung sections from WT mice after thiourea-induced lung edema, treated (R-L3/TU) or not (PBS/TU) with R-L3 (Figure 4D) did not reveal any major changes in alveolar epithelial structure.

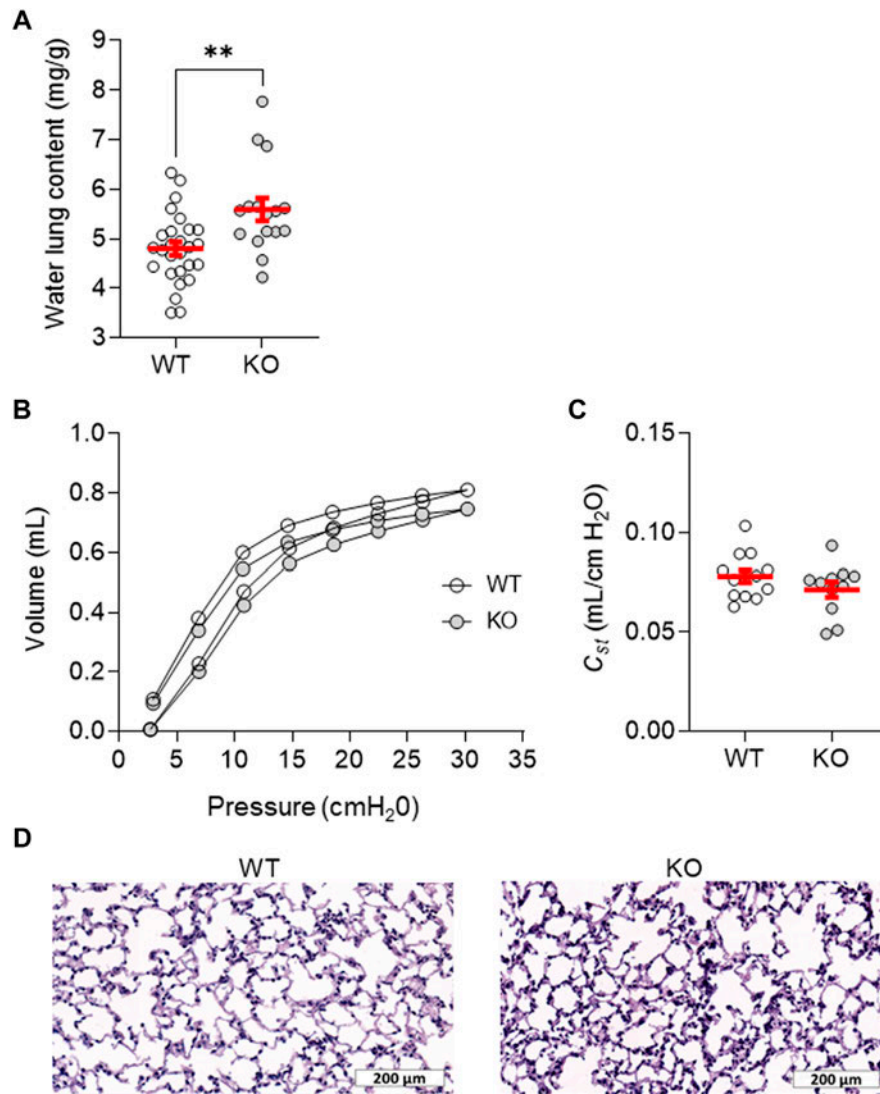


FIGURE 2

Lung phenotype assessment of the KvLQT1-KO mouse model. (A) Water lung content (mg/g) from control (non-treated) WT and KO mice ($n = 16-27$). Mean pressure-volume loops, (B) and C_{st} (quasi-static compliance at $5 \text{ cmH}_2\text{O}$, (C) were measured with flexiVent among control (non-treated) WT and KO mice ($n = 11-13$). Representative images of histological sections from WT and KO mouse lungs stained with hematoxylin-eosin (D), Scale: $200 \mu\text{m}$). Values are presented as means \pm SEM. Unpaired t-test (Agostino/Pearson normality test: positive) was practiced for panel (A-C). $**p < .01$ vs. WT mice.

We then postulated that the benefits of KvLQT1 activation on edema resolution could be mediated through an improvement in alveolar epithelial integrity and/or function. To test this hypothesis, we performed immunofluorescence assays with specific markers of alveolar epithelial cells as well as proteins involved in Na^+ , and secondary liquid, absorption (Figures 5,6). Because type I alveolar epithelial (ATI) cells are especially vulnerable to injury, we further assessed the expression of two ATI markers; podoplanin (Figure 5A) and AQP5 (Figure 5B). A statistically significant decrease in podoplanin and AQP5 was observed after the thiourea challenge (PBS/TU). Importantly, KvLQT1 activation with R-L3 (R-L3/TU group) partially restored aquaporin 5 (AQP5) expression; this effect is statistically significant (Figure 5B). We then observed that the staining intensity of the pro-SPC protein (ATII marker, Figure 5C) was significantly reduced in lung sections from thiourea-challenged mice, but treatment with R-L3 failed to reverse this deleterious effect.

Finally, the expression of ENaC channels and Na^+/K^+ -ATPase was assessed (Figure 6), given their major contribution in Na^+ , and secondarily liquid, absorption through the alveolar epithelium. Immunostainings of primary alveolar epithelial cells, freshly isolated from WT mice, indicated that the intensity of ENaC expression per cell tends to decrease after thiourea-induced lung edema (PBS/TU, compared to PBS/PBS) (Figure 6A), while the R-L3 treatment (R-L3/TU) allows to recover ENaC expression levels to a value slightly above the control (without thiourea) (Figure 6A). Exposure to thiourea (PBS/TU) did not significantly alter the Na^+/K^+ -ATPase level of intensity (Figure 6B) but significantly reduced the number of Na^+/K^+ -ATPase marked regions (ROI, not shown). Importantly, KvLQT1 activation with R-L3 (R-L3/TU) upregulated the intensity of Na^+/K^+ -ATPase expression per DAPI-positive cell (Figure 6B).

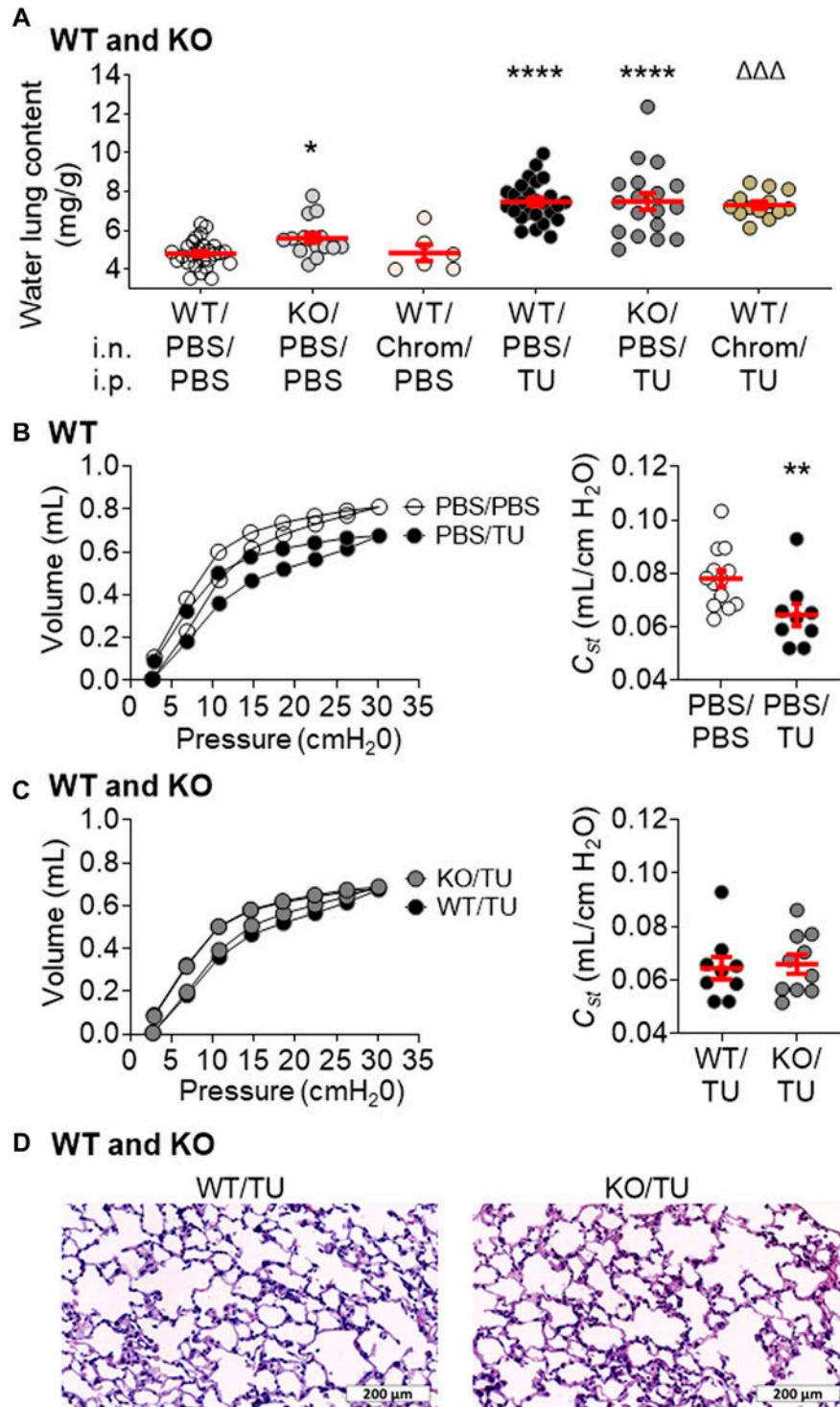


FIGURE 3

Impact of KvlQT1 extinction and pharmacological inhibition on thiourea-induced acute lung edema and function in mice. (A) WT mice were pretreated with PBS (i.n.) or with the KvlQT1 inhibitor chromanol (Chrom, 20 μ M, i.n.) 1 h before i.p. injection (150 μ l) of PBS (control condition) or thiourea (TU, 5 mg/kg). KO mice also received PBS (i.n.) prior to PBS or thiourea injection. 4 h later, lungs were collected for measurement of the water lung content within the six experimental groups in WT mice (i.n./i.p.): PBS/PBS, Chrom/PBS, PBS/TU, and Chrom/TU and KO mice: PBS/PBS and PBS/TU, $n = 6-27$. Mean pressure-volume loops and C_{st} were also measured in separate WT control (PBS/PBS) and thiourea-treated (PBS/TU) mice (B), $n = 9-13$ with the flexiVent system as well as in WT and KO thiourea-treated mice (C), WT/TU vs. KO/TU, $n = 9-10$. Representative images of histological sections from WT and KO thiourea-treated mouse lungs stained with hematoxylin-eosin (D). Scale: 200 μ m. Values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test were practiced (normality Agostino/Pearson test: positive) and One-way ANOVA non-parametric comparison test (normality Agostino/Pearson test: negative) were applied to panel (A). Non-parametric Mann-Whitney t-test (Agostino/Pearson normality test: negative) was practiced for panel (B, C). * $p < .05$, ** $p < .01$, **** $p < .0001$ vs. PBS/PBS, $\Delta\Delta\Delta p < .001$ vs. Chrom/PBS.

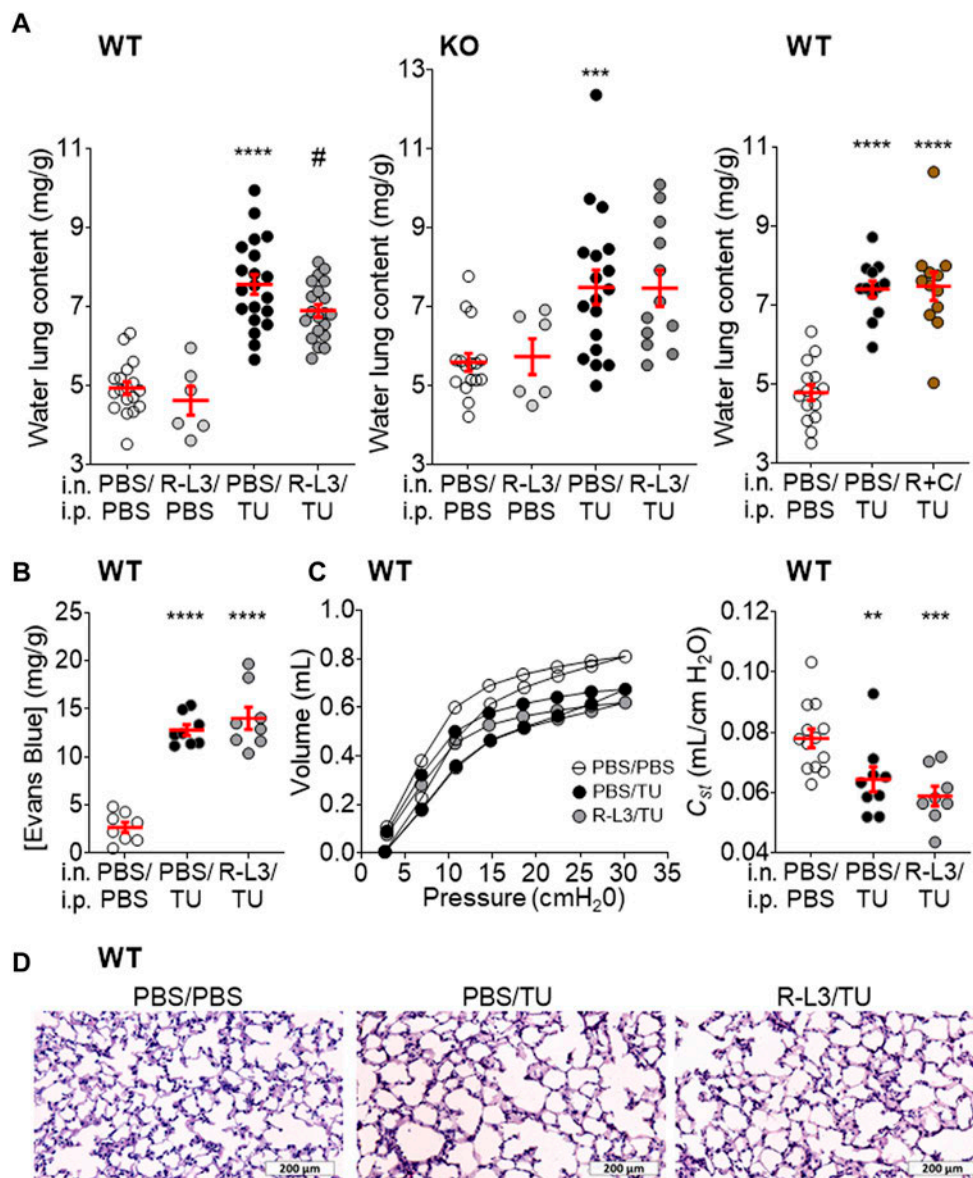


FIGURE 4

Beneficial impact of KvLQT1 activation on thiourea-induced acute lung edema in WT mice. (A) After treatment with the pharmacological KvLQT1 activator R-L3 (4 μ M, i.n.) or PBS (i.n.), a group of WT (left panel, $n = 6-20$) or KO (middle panel, $n = 6-18$) mice were challenged with thiourea (TU, 5 mg/kg, i.p.) or PBS (i.p.). 4 h after, lungs were collected for measurement of the water lung content within the four experimental groups (i.n./i.p.: PBS/PBS, R-L3/PBS, PBS/TU, and R-L3/TU). Also, WT mice were treated with a combination of R-L3+chromanol (R + C, 4 μ M and 20 μ M respectively, i.n.) or PBS before the challenge with thiourea (TU, 5 mg/kg, i.p.) or PBS (i.p.) and the water lung content was compared among the three experimental groups (i.n./i.p.: PBS/PBS, PBS/TU, and R + C/TU, $n = 12-15$) (right panel). Endothelial permeability (B), $n = 8$, assessed by Evans blue (20 mg/kg, 100 μ L, i.v.) extravasation from the circulation to the lungs, was measured in the control condition (i.n./i.p.: PBS/PBS) and after the thiourea challenge (i.p.: TU, 5 mg/kg) in WT mice treated with the KvLQT1 activator R-L3 (i.n./i.p.: R-L3/TU) or not (PBS/TU). Mean pressure-volume loops (C), middle panel and C_{st} (C), right panel ($n = 8-13$) in WT control animals (PBS/PBS) and mice treated with R-L3 (i.n./i.p.: R-L3/TU) or not (PBS/TU) were measured with the flexiVent system. Representative images of histological sections from WT thiourea mouse lungs treated or not with the KvLQT1 activator stained with hematoxylin-eosin (D). Scale: 200 μ m). Values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test were practiced (normality Agostino/Pearson test: positive) for panels (A–C). ** $p < .01$ *** $p < .001$ **** $p < .0001$ vs. PBS/PBS and # $p < .05$ vs. PBS/TU.

4 Discussion

The goal of this study was to investigate the function of KvLQT1 channels using *in vivo* complementary molecular and pharmacological approaches in mice, both under physiological conditions as well as following acute lung edema induced by thiourea. We found that the deletion of KvLQT1 channels, which

account for approximately 50% of the total basolateral K⁺ current, was associated, in physiological conditions, with a slight rise in water lung content, whereas neither histological changes nor major alterations in respiratory function were observed. Moreover, neither KvLQT1-KO nor its pharmacological inhibition (with chromanol) worsened the lung edema induced by thiourea. However, lung administration of the KvLQT1 activator R-L3 significantly reduced

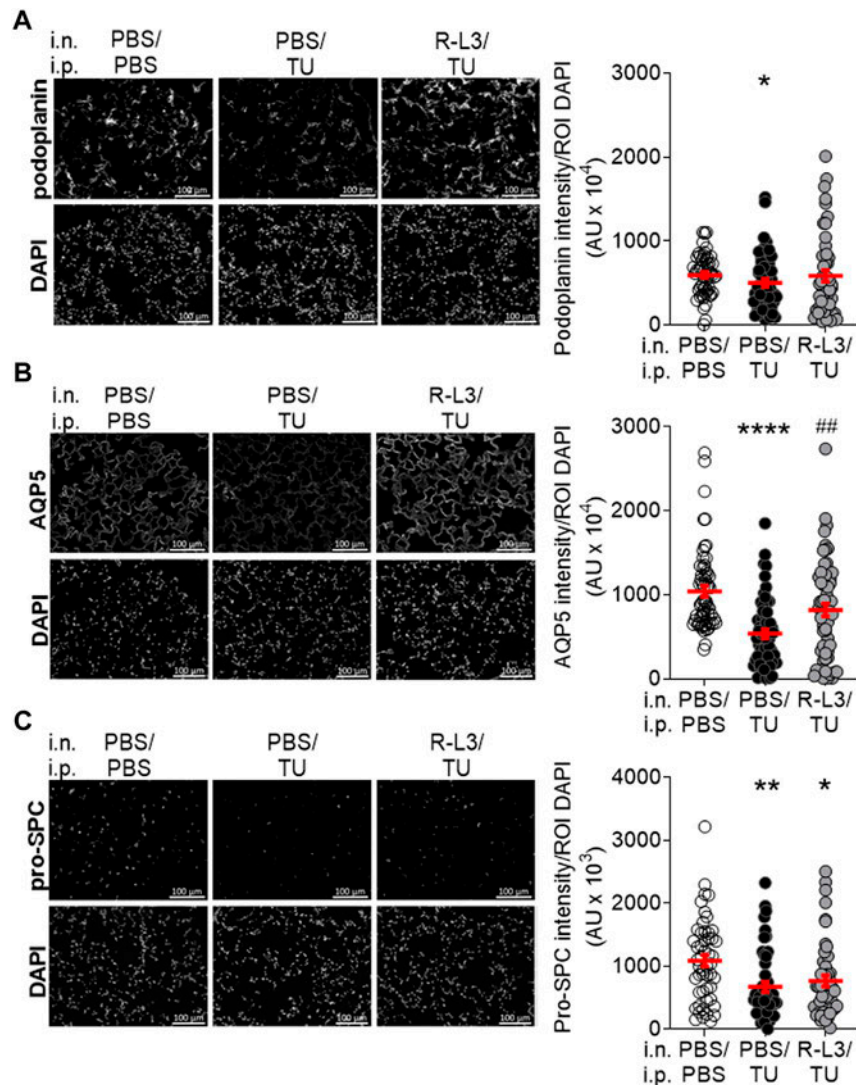


FIGURE 5

Impact of KvLQT1 activation on alveolar type I (AT1) and II (ATII) epithelial cell markers in thiourea-challenged WT mice. Representative immunofluorescence images (left panels) of lung sections (5 μ m, Scale: 100 μ m) from WT control mice (PBS/PBS), and WT mice challenged with thiourea (TU, 5 mg/kg i.p., PBS/TU) and treated or not (PBS) with the KvLQT1 activator R-L3 (R-L3/TU) stained with the AT1 markers podoplanin (A), $n = 50$ images, AQP5 (B), $n = 59-60$ or ATII marker pro-SPC (C), $n = 48-51$. Nuclei were stained by DAPI. Quantification (right panels) of podoplanin, AQP5, and pro-SPC marker intensities was made with a protocol exploited by ICY software. Values are presented as means \pm SEM. Non-parametric Mann-Whitney t-test (Agostino/Pearson normality test: negative) for panel (A). One-way ANOVA non-parametric comparison test (normality Agostino/Pearson test: negative) for panel (B, C). * $p < .05$, ** $p < .01$ or **** $p < .0001$ vs. PBS/PBS, ## $p < .01$ vs. PBS/TU.

the thiourea-induced pulmonary edema in WT mice. This beneficial effect was prevented in KO and chromanol-treated WT mice, confirming a KvLQT1-dependent mechanism. R-L3 treatment in WT mice also reversed the thiourea-induced decrease in aquaporin channel AQP5 and ENaC expression and enhanced the Na^+/K^+ -ATPase levels, which may favor lung edema clearance, as observed.

Kcnq1^{-/-} KO mice used in our study were originally generated as a model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome, a disorder featuring profound bilateral deafness and a cardiac phenotype (Casimiro et al., 2001). As expected, we noted that KO mice exhibited head bobbing and intermittent bidirectional circling, a behavior symptomatic of inner ear defects, usually referred to as the shaker/waltzer phenotype. Altered inner ear, cardiac, and thyroid gland phenotypes have already been reported in these KO mice (Casimiro et al., 2001; Tosaka et al.,

2003; Knollmann et al., 2004, 2007; Fröhlich et al., 2011). A study on insulin sensitivity also showed an impact of KCNQ1 disruption on glucose uptake in various tissues including lungs (Boini et al., 2009). However, the lung morphological and functional phenotype associated with KvLQT1 disruption has, to the best of our knowledge, never been investigated before, neither in physiological nor pathological conditions.

According to our histological observations of lung sections, the deletion of the KvLQT1 α -subunit KCNQ1 did not cause any morphological changes in the lungs. In agreement with our data, previous work showed that disruption of the KvLQT1 β -subunit (KCNE3) did not alter the morphology of small intestine, colon, tracheal, and lung epithelia, while ion transport properties through the intestinal and tracheal epithelia were dramatically affected

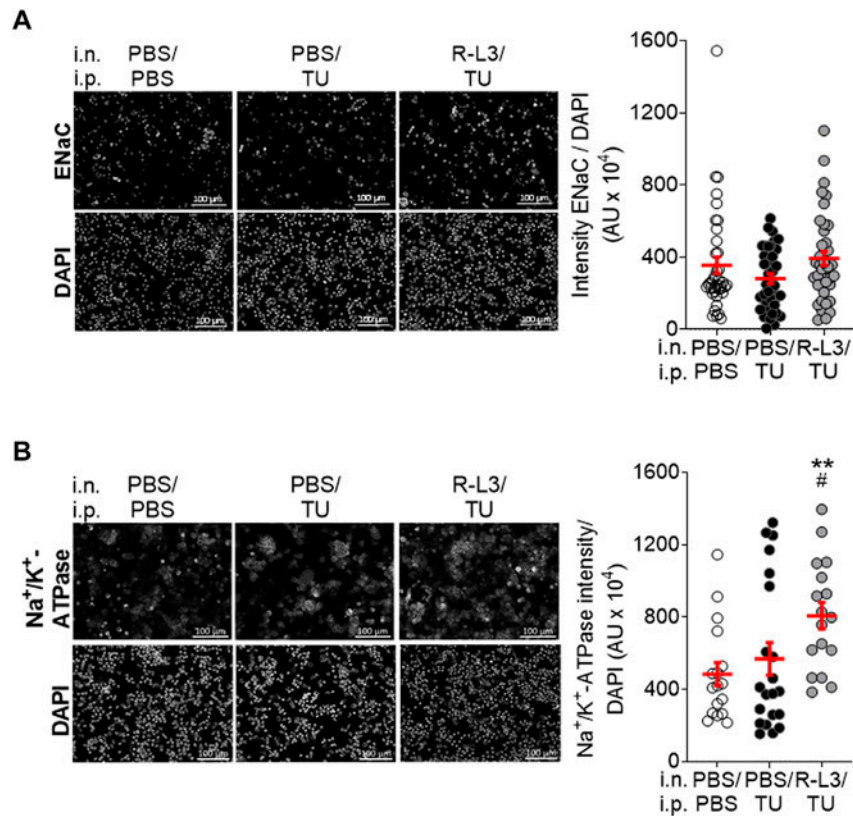


FIGURE 6

Impact of KvLQT1 activation on α -ENaC and Na⁺/K⁺-ATPase protein expression in alveolar epithelial cells after thiourea-induced lung edema in WT mice. Representative immunofluorescence images (left panels, Scale: 100 μ m) of the α -ENaC subunit (A), $n = 3$ experiments, including a pool of 14 mice) and Na⁺/K⁺-ATPase (B), $n = 3$ experiments, including a pool of 14 mice staining performed on ATII cells freshly isolated from lungs from WT control mice (i.n/i.p.: PBS/PBS) and WT mice challenged with thiourea (i.p.: TU, 5 mg/kg) and treated or not (PBS) with the KvLQT1 activator (i.n./i.p.: R-L3/TU and PBS/TU, respectively). Nuclei were stained by DAPI. Quantification (right panels) of marker intensity was made with a protocol exploited by ICY software. Values are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA non-parametric comparison test (normality Agostino/Pearson test: negative) for panel (A). One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test were practiced (normality Agostino/Pearson test: positive) for panel (B). ** $p < .01$, vs. PBS/PBS and # $p < .05$ vs. PBS/TU for Na⁺/K⁺-ATPase.

(Preston et al., 2010). Structural changes associated with KvLQT1 dysfunction have however been observed in other organs. Indeed, gross morphological anomalies in inner ear structures and severe histological alterations of the gastric mucosa, accompanied by deafness and impaired acid secretion, respectively, have been reported using KCNQ1-KO mice models (Lee et al., 2000; Casimiro et al., 2001).

Functional electrophysiological analyses in Ussing chamber revealed that total basolateral K⁺ currents were reduced by 20.2 μ A/cm² (i.e. a 47% decrease) in airway epithelial cells from KO mice, compared to WT (Figure 1D). These data are in agreement with previous reports, including from our laboratory, indicating a major contribution of KvLQT1 channels to the total basolateral K⁺ conductance in murine tracheal and alveolar epithelial cells (Grahammer et al., 2001; Leroy et al., 2004; Trinh et al., 2007) as well as human airway epithelial cell models (Cowley and Linsdell, 2002; Trinh et al., 2008). Our measurements also confirmed that KCNQ1 extinction in KO mice abolished the chromanol-sensitive basolateral K⁺ currents (Figure 1E). We noted however that the amplitude of the K⁺ current sensitive to 20 μ M chromanol in WT mice was lower (10 μ A/cm²) than the decrease (20.2 μ A/cm²) in total K⁺ current induced by the full extinction of KvLQT1 in KO mice. Higher chromanol concentrations would probably have elicited a

larger inhibition, but non-specific effects at a high dose could not have been ruled out.

As illustrated by the individual data reported in Figures 1D, E, the amplitude of the chromanol-sensitive KvLQT1 currents and the impact of KvLQT1 extinction on the total basolateral K⁺ current are variable among animals, suggesting that the relative contribution of KvLQT1 channels may vary in resting conditions. Actually, more than 30 different K⁺ channels, from different classes, have been detected in the respiratory epithelium (Bardou et al., 2009). Although the function of many of these lung K⁺ channels is still unknown, some of them [including K_{Ca} and K_{ATP} channels (Cowley and Linsdell, 2002; Bernard et al., 2003; Leroy et al., 2004; Trinh et al., 2008)] may contribute to the remaining K⁺ current observed in KvLQT1-KO cells, in basal conditions.

A small, but significant, increase in basal water lung content was observed in the lungs of KvLQT1-KO mice, compared to WT, under basal physiological conditions (Figure 2A). This observation may be explained, at least in part, by the impact of KvLQT1 disruption on alveolar fluid homeostasis. Indeed, our previous work unveiled that KvLQT1 channel chronic inhibition impaired liquid absorption through primary alveolar cell cultures (Leroy et al., 2006; Bardou et al., 2012). No increase in water lung content was however observed

after a short treatment with chromanol in the basal condition in WT mice (Figure 3A, Chrom/PBS). Lung function in KO mice was mostly preserved with only minor changes in some mechanical parameters (*Rrs*, *Ers*, *Crs*, *G*) of the overall respiratory system (Supplementary Figure S2). While the rise in water lung content may contribute to the observed increase in tissue damping and overall respiratory resistance, either by fluid accumulation or compression of the airways, the involvement of other parameters (e.g., alteration in lung surfactant production) cannot be ruled out.

The role of KvLQT1 channels was also studied under conditions inducing edema in the lung. In WT mice, acute exposure to thiourea (4 h) resulted in a change in the shape of the PV curves, with a statistically significant decrease in static compliance and lung edema flooding, indicated by a >50% increase in water lung content (Figures 3A, B). This observation is in agreement with previous reports (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004) showing the development of lung edema, peaking at ~4 h. We are aware that this water lung content elevation could be secondary, at least in part, to interstitial fluid accumulation. Indeed, the presence of alveolar fluids was not visible on our histological images of lung sections from thiourea-challenged mice. This could be due to a limitation related to our protocol of hematoxylin and eosin staining of 5 μm sections of embedded tissues, observed with a light microscope with a $\times 20$ objective, which is not well adapted for the observation of alveolar liquid, as confirmed by the CRCHUM pathologist we consulted. Nevertheless, the flooding of lung edema within both the interstitial and alveolar compartments has been previously well described (Hesse and Loosli, 1949; Cunningham and Hurley, 1972; Havill and Gee, 1987; Egli et al., 2004). Using 1 μm sections of Araldite-embedded lung tissues, Cunningham *et al.* (Cunningham and Hurley, 1972) observed the first signs of developing edema in the perivascular space, at 2 h after thiourea injection, followed at 3–4 h by edema fluid infiltration within alveoli. Similarly, histological examination of 1 μm sections of Epon-embedded lungs stained with toluidine blue revealed alveolar edema 4 h after thiourea administration (Egli et al., 2004). Havill *et al.* (Havill and Gee, 1987) also reported the flooding of edema fluids in the perivascular and alveolar compartments of thiourea animals, peaking at 2–4 h, and which initial rapid removal was preferentially driven through alveolar reabsorption.

Although the KO mice exhibited elevated basal water lung content in physiological conditions, the lung weight analyses following thiourea exposure demonstrated a similar edema index as the WT control mice (exhibiting functional KvLQT1 channels) or the WT ones treated with the KvLQT1 inhibitor. Similarly, lung function parameters were not worsened in KO mice (Supplementary Figure S4). A compensatory effect through other types of K^+ channels (indicated by the remaining K^+ conductance in KO mice) may explain this observation.

Importantly, lung treatment with R-L3 significantly reduced the lung edema induced by thiourea in WT mice (Figure 4A left panel). This beneficial effect of R-L3 was prevented by a co-treatment with the chromanol inhibitor or in KO mice lacking the KCNQ1 α -subunit middle and right panels, confirming the specificity of the R-L3 effect through KvLQT1 channels. To the best of our knowledge, this is the first evidence of KvLQT1 channel involvement in lung edema resolution using an *in vivo* model. Nevertheless, Sakuma *et al.* previously reported that an opener of another type of K^+ channel (i.e. K_{ATP}) enhanced the K^+ transport and alveolar fluid clearance in human resected lungs (Sakuma *et al.*, 1998). These data are in agreement with our previous *in vitro* studies (Leroy *et al.*, 2006;

Bardou *et al.*, 2012) showing improved fluid absorption through polarized primary cultures of alveolar epithelial cells after treatment with K_{ATP} and/or KvLQT1 activators.

The measurements of respiratory mechanics done in the present study showed that lung administration of the KvLQT1 activator did not reverse the effect of thiourea on the shape of the PV loop and quasi-static compliance (C_{st}) at the dose and time studied (Figure 4C).

As expected, our data (Figure 4B) confirmed that the thiourea challenge was associated with an increase in lung vascular permeability, due to endothelial barrier damage (Cunningham and Hurley, 1972; Giri *et al.*, 1991). Evans blue extravasation was similar in R-L3/TU mice, indicating that the benefits of KvLQT1 activation on lung edema were not due to a protective effect on the endothelial barrier. Expression and function of various types of KCa, K_{ATP} , and Kv channels, including members of the Kv7/KCNQ family, have been observed in endothelial and/or vascular smooth cells (Chatterjee *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2010; Haick and Byron, 2016; Simonsen *et al.*, 2017). However, direct evidence of KvLQT1 function in endothelial integrity, using specific pharmacological drugs, has, to the best of our knowledge, never been reported. Nevertheless, inhibition of vascular Kv7 channels, after intravenous administration of the broad KCNQ blocker linopirdine reduced fluid resuscitation requirements and tissue edema formation after hemorrhagic shock (Nassoiy *et al.*, 2018). On the contrary, Khimenko *et al.* showed that K_{ATP} activation both protected against, and reversed, the increase in endothelial permeability associated with ischemia-reperfusion injury in a model of isolated rat lungs (Khimenko *et al.*, 1995).

Although previous ultrastructural examination under electron microscopy after thiourea exposure (Michel, 1985) showed lung microvascular abnormalities, these are not detectable under light microscopy. Our histological analyses of lung parenchymal sections neither revealed any differences in alveolar structures between our experimental groups (PBS/PBS, PBS/TU, and R-L3/TU conditions, Figure 4D). Immunofluorescence assays however showed a significant reduction in ATI (podoplanin and AQP5) and ATII (pro-SPC) specific cell markers as well as a trend in ENaC reduction (Figures 5A–C, Figure 6A). These results indicate an alteration of alveolar epithelial integrity and/or functionality after the thiourea challenge. It might be postulated that the decrease in water channel AQP5 expression may contribute to lung liquid accumulation in thiourea-treated mice. However, models of acute lung injury (including the one induced by thiourea) in AQP-KO mice, indicated that these water channels are not essential for lung liquid clearance (Song *et al.*, 2000). The decrease in pro-SPC levels, as well as lung edema formation, could both contribute to the altered compliance observed in thiourea-treated mice (Figure 3B).

Despite the R-L3 treatment, pro-SPC levels remained low in thiourea-challenged mice (Figure 5C). A relationship between alveolar surfactant protein expression and the function of another class of K^+ channel (K2P) has however been shown in a model of lung injury induced by a combination of hyperoxia and mechanical ventilation (Schwingshackl *et al.*, 2017). Importantly, KvLQT1 activation with R-L3 reversed the decrease in AQP5 expression induced by thiourea (Figure 5B). The same pattern was also observed in ENaC levels (although the difference was not statistically significant, Figure 6A). KvLQT1 activation also induced a significant up-regulation of Na^+/K^+ -ATPase expression in alveolar cells isolated from R-L3/TU-treated mice (Figure 6B). In control experiments, we also defined the level of expression of

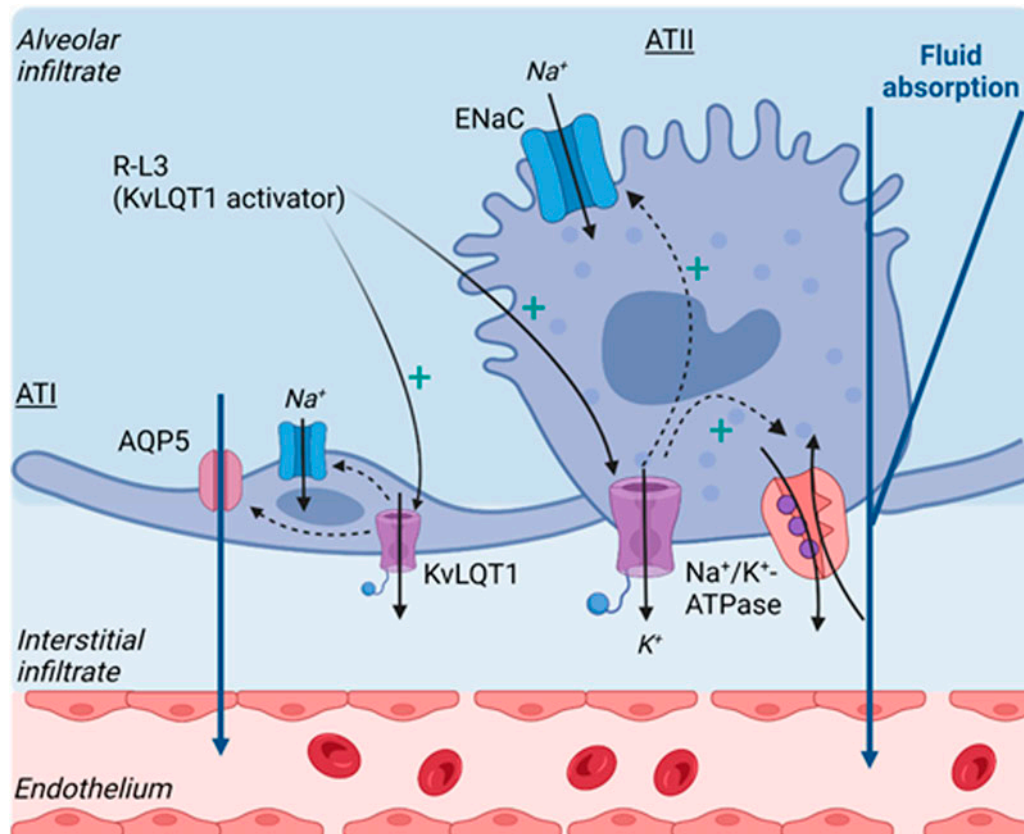


FIGURE 7

Schematic model describing the beneficial effect of KvLQT1 activation, by R-L3, on lung edema resorption after thiourea challenge, through the observed up-regulation of ion/water channels/transporter involved in sodium and fluid absorption by the alveolar epithelium. Created by Biorender.com.

podoplanin, AQP5, ENaC, and Na^+/K^+ -ATPase in alveolar cells isolated from mice treated with R-L3, without any thiourea challenge. As shown in [Supplementary Figure S5](#), quantitative ICY analyses of immunostaining assays did not reveal any changes in podoplanin and AQP5 levels, whereas a rising trend in Na^+/K^+ -ATPase and a significant increase in ENaC were observed. In agreement with our results, one of our previous *in vitro* studies showed that KvLQT1 activation was associated with an increase in α -ENaC promoter activity (through regulation of MAPK activity), a rise in ENaC expression and function, and subsequently, improved liquid absorption through primary alveolar epithelial cell cultures ([Leroy et al., 2006](#); [Bardou et al., 2012](#)). Sakuma et al. also reported an increase in alveolar fluid clearance after K_{ATP} channel activation, mediated by amiloride-sensitive sodium channels ([Sakuma et al., 1998](#)). Moreover, a rise in Na^+/K^+ -ATPase expression, after gene transfer, was shown to reduce the wet-to-dry ratio in thiourea-treated mice ([Stern et al., 2000](#)). Altogether, the up-regulation of AQP5, α -ENaC, and Na^+/K^+ -ATPase alveolar expression, secondary to KvLQT1 activation, may contribute to the liquid clearance after thiourea-induced lung edema. It could be thus postulated that the beneficial effect of the KvLQT1 activator on the resolution of lung edema may mainly be driven by the action of alveolar cells, rather than interstitial fluid removal, as indicated by an absence of endothelial preservation by the R-L3 treatment.

In summary, our study demonstrated that KvLQT1 extinction slightly altered alveolar liquid homeostasis in physiological conditions

but did not worsen lung edema in thiourea-treated mice. The relative contribution, and compensatory effects, of other classes of K^+ channels (e.g., K_{ATP} , K_2P , KCa) would need further investigations. Nevertheless, our data indicated a beneficial effect of KvLQT1 activation on lung edema clearance, most probably through the observed up-regulation of channels/transporters involved in alveolar ion/water absorption (as represented in the schematic model in [Figure 7](#)).

We are aware that the model of thiourea-induced lung edema recapitulates only part of the main features of acute respiratory distress syndrome (characterized by endothelial vascular and epithelial alveolar damage, exacerbated inflammatory response, and lung edema). Therefore, the role of KvLQT1 channels in the resolution of ARDS parameters remains to be confirmed using complementary models of acute lung injury mimicking direct or extra-pulmonary causes of ARDS. Moreover, other types of K^+ channels, including stretch-activated channels, have been proposed as therapeutic targets for ARDS ([Schwingshackl, 2016](#)). Combined treatments, targeting KvLQT1, K_{ATP} , and/or K_2P channels, might also be considered.

Contribution to the field

The importance of ion transport, in particular Na^+ absorption through ENaC and Na^+/K^+ -ATPase, for the maintenance of alveolar fluid homeostasis has been well established in physiological conditions

as well as after lung edema. There is also some evidence that another class of ion channels, i.e. K^+ channels participate in the control of ion and liquid transport through the alveolar epithelium. However, the function of K^+ channels, especially of KvLQT1, has not been studied before *in vivo*. We thus decided to employ complementary approaches using pharmacological drugs, as well as KvLQT1 KO mice, to assess KvLQT1 function in naïve animals and in a model of thiourea-induced lung edema. Our data did not reveal any major lung phenotypic changes in KvLQT1 KO mice in physiological conditions, except for a small accumulation in water lung content. In the thiourea model, KvLQT1 activation favored lung edema resolution and enhanced the expression of ion and liquid channels and transporters (ENaC, Na^+ / K^+ -ATPase, and AQP5) involved in the control of alveolar fluid clearance. These findings highlighted the role of KvLQT1 in lung homeostasis and indicated that these channels may be therapeutic targets after lung edema.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the CRCHUM.

Author contributions

MAV, AG, DA, and EB were involved in the conception and design of the study. All authors participate in the experimentation and data collection. Data analysis and interpretation were performed by MAV, AG, DA, AR, and EB. MAV, AG, DA, AR, and EB drafted the manuscript, other authors participate in the critical revision of the article. All authors approved the final version of the paper.

Funding

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, discovery

grant RGPIN-2016-04378 to EB), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grants MOP-111054, PJT153406 and PJT166004 to EB), CRCHUM and Université de Montréal (scholarship to EB). MAV, AG, DA, and JC also acknowledge studentships from the NSERC (MAV), the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S, MAV, AG, DA, JC), the Respiratory Health Research Network of Quebec (AG). The CRCHUM is supported by a Centre grant from FRQ-S. The funders have no role in study design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgments

We thank the molecular pathology core facility for access and formation for the cryostat and microtome use, Aurelie Cleret-Buhot from the cell imaging core facility as well as the animal care facility of CRCHUM. We also acknowledge K. Pfeifer for kindly providing the J800 mice.

Conflict of interest

AR is employed by SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.1069466/full#supplementary-material>

References

- Aubin Vega, M., Chupin, C., Massé, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E. (2021). Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin. *Exp. Physiol.* 106, 1110–1119. doi:10.1113/EP089060
- Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., et al. (2012). K^+ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 1682–1690. doi:10.1016/j.bbmem.2012.02.025
- Bardou, O., Trinh, N. T. N., and Brochiero, E. (2009). Molecular diversity and function of K^+ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 296, L145–L155. doi:10.1152/ajplung.90525.2008
- Barkauskas, C. E., Cronce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., et al. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 123, 3025–3036. doi:10.1172/JCI68782
- Basset, G., Crone, C., and Saumon, G. (1987). Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: A study on isolated rat lung. *J. Physiol.* 384, 311–324. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016456
- Bernard, K., Bogliolo, S., Soriani, O., and Ehrenfeld, J. (2003). Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *J. Membr. Biol.* 196, 15–31. doi:10.1007/s00232-003-0621-3
- Berthiaume, Y., Staub, N. C., and Matthay, M. A. (1987). Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J. Clin. Invest.* 79, 335–343. doi:10.1172/JCI112817
- Boini, K. M., Graf, D., Hennige, A. M., Koka, S., Kempe, D. S., Wang, K., et al. (2009). Enhanced insulin sensitivity of gene-targeted mice lacking functional KCNQ1. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1695–R1701. doi:10.1152/ajpregu.90839.2008

- Brochiero, E., Dagenais, A., Privé, A., Berthiaume, Y., and Grygorczyk, R. (2004). Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L382–L392. doi:10.1152/ajplung.00320.2002
- Casimiro, M. C., Knollmann, B. C., Ebert, S. N., Vary, J. C., Greene, A. E., Franz, M. R., et al. (2001). Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2526–2531. doi:10.1073/pnas.041398998
- Chatterjee, S., Chapman, K. E., and Fisher, A. B. (2008). Lung ischemia: A model for endothelial mechanotransduction. *Cell. Biochem. Biophys.* 52, 125–138. doi:10.1007/s12013-008-9030-7
- Cowley, E. A., and Linsdell, P. (2002). Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J. Physiol.* 538, 747–757. doi:10.1113/jphysiol.2001.013300
- Cunningham, A., and Hurley, J. (1972). Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: A topographical and electron-microscope study. *J. Pathol.* 106, 25–35. doi:10.1002/path.1711060103
- Dobbs, L. G., Gonzalez, R., and Williams, M. C. (1986). An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 141–145. doi:10.1164/arrd.1986.134.1.141
- Egji, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., et al. (2004). Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J. Physiol.* 5603, 857–865. doi:10.1113/jphysiol.2004.066704
- Fang, X., Song, Y., Zemans, R., Hirsch, J., and Matthay, M. A. (2004). Fluid transport across cultured rat alveolar epithelial cells: A novel *in vitro* system. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, 104–110. doi:10.1152/ajplung.00176.2003
- Fröhlich, H., Boini, K. M., Seeböhm, G., Strutz-Seeböhm, N., Ureche, O. N., Föllner, M., et al. (2011). Hypothyroidism of gene-targeted mice lacking *Kcnq1*. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 461, 45–52. doi:10.1007/s00424-010-0890-5
- Giri, S. N., Hollinger, M. A., and Rice, S. A. (1991). Effects of thiourea on pulmonary vascular permeability and on lung and plasma histamine levels in rats. *Toxicol. Lett.* 57, 283–290. doi:10.1016/0378-4274(91)90202-H
- Grahammer, F., Warth, R., Barhanin, J., Bleich, M., and Hug, M. J. (2001). The Small Conductance K⁺ Channel, *KCNQ1*. Expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J. Biol. Chem.* 276, 42268–42275. doi:10.1074/jbc.M105014200
- Gremlich, S., Roth-Kleiner, M., Equey, L., Fytianos, K., Schittny, J. C., and Cremona, T. P. (2020). Tenascin-C inactivation impacts lung structure and function beyond lung development. *Sci. Rep.* 10, 5118–5213. doi:10.1038/s41598-020-61919-x
- Haick, J. M., and Byron, K. L. (2016). Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels. *Pharmacol. Ther.* 165, 14–25. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.05.002
- Han, D. Y., Nie, H. G., Gu, X., Nayak, R. C., Su, X. F., Fu, J., et al. (2010). K⁺ channel openers restore verapamil-inhibited lung fluid resolution and transepithelial ion transport. *Respir. Res.* 11, 65–17. doi:10.1186/1465-9921-11-65
- Hantos, Z., Daroczy, B., Suki, B., Nagy, S., and Fredberg, J. J. (1992). Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J. Appl. Physiol.* 72, 168–178. doi:10.1152/jappl.1992.72.1.168
- Havill, A. M., and Gee, M. H. (1987). Resolution of increased permeability pulmonary edema in rats. *Am. J. Pathol.* 127, 441–446.
- Hesse, F. E., and Loosli, C. G. (1949). The lining of the alveoli in mice, rats, dogs, and frogs following acute pulmonary edema produced by ANTU poisoning. *Anat. Rec.* 105, 299–323. doi:10.1002/ar.1091050207
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., et al. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* 12, 325–328. doi:10.1038/ng0396-325
- Kabir, K., Gelinas, J. P., Chen, M., Chen, D., Zhang, D., Luo, X., et al. (2002). Characterization of a murine model of an adrenergic-induced acute lung injury. *Shock* 17, 300–303. doi:10.1097/00024382-200204000-00010
- Khimenko, P. L., Moore, T. M., and Taylor, A. E. (1995). ATP-sensitive K⁺ channels are not involved in ischemia-reperfusion lung endothelial injury. *J. Appl. Physiol.* 79, 554–559. doi:10.1152/jappl.1995.79.2.554
- Knollmann, B. C., Casimiro, M. C., Katchman, A. N., Sirenko, S. G., Schober, T., Rong, Q., et al. (2004). Isoproterenol exacerbates a long QT phenotype in *Kcnq1*-deficient neonatal mice: Possible roles for human-like *Kcnq1* isoform 1 and slow delayed rectifier K⁺ current. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 311–318. doi:10.1124/jpet.103.063743
- Knollmann, B. C., Sirenko, S., Rong, Q., Katchman, A. N., Casimiro, M., Pfeifer, K., et al. (2007). *Kcnq1* contributes to an adrenergic-sensitive steady-state K⁺ current in mouse heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 212–218. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.038
- Lee, M. P., Ravenel, J. D., Hu, R. J., Lustig, L. R., Tomaselli, G., Berger, R. D., et al. (2000). Targeted disruption of the *Kvqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J. Clin. Invest.* 106, 1447–1455. doi:10.1172/JCI10897
- Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E. (2004). Molecular identity and function in transepithelial transport of K_(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286, L1027–L1037. doi:10.1152/ajplung.00249.2003
- Leroy, C., Privé, A., Bourret, J.-C., Berthiaume, Y., Ferraro, P., and Brochiero, E. (2006). Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L1207–L1219. doi:10.1152/ajplung.00376.2005
- Li, T., and Folkesson, H. G. (2006). RNA interference for α -ENaC inhibits rat lung fluid absorption *in vivo*. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L649–L660. doi:10.1152/ajplung.00205.2005
- Matthay, M. A. (2014). Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1301–1308. doi:10.1164/rccm.201403-0535OE
- Michel, R. P. (1985). Lung microvascular permeability to dextran in alpha-naphthylthiourea-induced edema. Sites of filtration, patterns of accumulation, and effects of fixation. *Am. J. Pathol.* 119, 474–484.
- Nassoï, S. P., Babu, F. S., LaPorte, H. M., Byron, K. L., and Majetschak, M. (2018). Effects of the Kv7 voltage-activated potassium channel inhibitor linopirdine in rat models of haemorrhagic shock. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 45, 916–926. doi:10.1111/1440-1681.12958
- Ng, F. L., Davis, A. J., Jepps, T. A., Harhun, M. I., Yeung, S. Y., Wan, A., et al. (2010). Vascular KCNQ channels in humans: The sub-threshold brake that regulates vascular tone? *Br. J. Pharmacol.* 162, 38–41. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01065.x
- O'Brodoovich, H., Hannam, V., Seear, M., and Mullen, J. B. M. (1990). Amiloride impairs lung water clearance in newborn Guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 68, 1758–1762. doi:10.1152/jappl.1990.68.4.1758
- Olivera, W., Ridge, K., Wood, L. D. H., and Sznajder, J. I. (1994). Active sodium transport and alveolar epithelial Na-K-ATPase increase during subacute hyperoxia in rats. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 266, L577–L584. doi:10.1152/ajplung.1994.266.5.L577
- Phillips, J. E., Peng, R., Burns, L., Harris, P., Garrido, R., Tyagi, G., et al. (2012). Bleomycin induced lung fibrosis increases work of breathing in the mouse. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 25, 281–285. doi:10.1016/j.pupt.2011.10.001
- Preston, P., Wartosch, L., Günzel, D., Fromm, M., Kongsuphol, P., Ousingawat, J., et al. (2010). Disruption of the K⁺ channel β -subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *J. Biol. Chem.* 285, 7165–7175. doi:10.1074/jbc.M109.047829
- Robichaud, A., Fereydoon, L., Collins, S. L., Loube, J. M., Ishii, Y., Horton, M. R., et al. (2021). Airway compliance measurements in mouse models of respiratory diseases. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 321, 204–212. doi:10.1152/AJPLUNG.00470.2020
- Robichaud, A., Fereydoon, L., Limjunyawong, N., Rabold, R., Allard, B., Benedetti, A., et al. (2017). Automated full-range pressure-volume curves in mice and rats. *J. Appl. Physiol.* 123, 746–756. doi:10.1152/japplphysiol.00856.2016
- Sakuma, T., Takahashi, K., Ohya, N., Nakada, T., and Matthay, M. A. (1998). Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 16–22. doi:10.1111/j.1600-0773.1998.tb01436.x
- Saldías, F., Lecuona, E., Friedman, E., Barnard, M. L., Ridge, K. M., and Sznajder, J. I. (1998). Modulation of lung liquid clearance by isoproterenol in rat lungs. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 274, L694–L701. doi:10.1152/ajplung.1998.274.5.L694
- Schwingshackl, A., Lopez, B., Teng, B., Luellen, C., Lesage, F., Belperio, J., et al. (2017). Hyperoxia treatment of TREK-1/TREK-2/TRAAK-deficient mice is associated with a reduction in surfactant proteins. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L1030–L1046. doi:10.1152/ajplung.00121.2017
- Schwingshackl, A. (2016). The role of stretch-activated ion channels in acute respiratory distress syndrome: Finally a new target? *J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 311, 639–652. doi:10.1152/ajplung.00458.2015
- Simonsen, U., Wandall-Frostholm, C., Oliván-Viguera, A., Köhler, R., and Oliván-Viguera, A. (2017). Emerging roles of calcium-activated K channels and TRPV4 channels in lung oedema and pulmonary circulatory collapse. *Acta Physiol.* 219, 176–187. doi:10.1111/apha.12768
- Smedira, N., Gates, L., Hastings, R., Jayr, C., Sakuma, T., Pittet, J. F., et al. (1991). Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits. *J. Appl. Physiol.* 70, 1827–1835. doi:10.1152/jappl.1991.70.4.1827
- Song, P., Groos, S., Riederer, B., Feng, Z., Krabbenhöft, A., Smolka, A., et al. (2009). *KCNQ1* is the luminal K⁺ recycling channel during stimulation of gastric acid secretion. *J. Physiol.* 587, 3955–3965. doi:10.1113/jphysiol.2009.173302
- Song, Y., Fukuda, N., Bai, C., Ma, T., Matthay, M. A., and Verkman, A. S. (2000). Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: Studies in transgenic aquaporin null mice. *J. Physiol.* 525, 771–783. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00771.x
- Stern, M., Ulrich, K., Robinson, C., Copeland, J., Griesenbach, U., Masse, C., et al. (2000). Pretreatment with cationic lipid-mediated transfer of the Na⁺-K⁺/ATPase pump in a mouse model *in vivo* augments resolution of high permeability pulmonary oedema. *Gene Ther.* 7, 960–966. doi:10.1038/sj.gt.3301193
- Tosaka, T., Casimiro, M. C., Rong, Q., Tella, S., Oh, M., Katchman, A. N., et al. (2003). Nicotine induces a long QT phenotype in *Kcnq1*-deficient mouse hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 980–987. doi:10.1124/jpet.103.053017
- Trinh, N. T. N., Privé, A., Kheir, L., Bourret, J.-C., Hijazi, T., Amraei, M. G., et al. (2007). Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L870–L882. doi:10.1152/ajplung.00362.2006
- Trinh, N. T. N., Privé, A., Maillé, E., Noël, J., and Brochiero, E. (2008). EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L866–L880. doi:10.1152/ajplung.90224.2008
- Wang, H., Iguchi, N., Rong, Q., Zhou, M., Ogunkorode, M., Inoue, M., et al. (2009). Expression of the Voltage-Gated potassium channel *KCNQ1* in mammalian taste bud cells and the effect of its null-mutation on taste preferences. *J. Comp. Neurol.* 23, 1–7. doi:10.1038/jid.2014.371

Annexe D : Article #4

Titre : **Function of KvLQT1 potassium channels in a mouse model of bleomycin-induced acute lung injury**

Statut: Publié dans *Frontiers in Physiology section Respiratory Physiology and Pathophysiology* en 2024



OPEN ACCESS

EDITED BY

Pooja Shivshankar,
University of Texas Health Science Center at
Houston, United States

REVIEWED BY

Rudolf Lucas,
Augusta University, United States
Nagaraja Nagre,
Eastern Virginia Medical School, United States

*CORRESPONDENCE

Emmanuelle Brochiero,
✉ emmanuelle.brochiero@umontreal.ca

RECEIVED 27 November 2023

ACCEPTED 30 January 2024

PUBLISHED 20 February 2024

CITATION

Aubin Vega M, Girault A, Meunier É, Chebli J,
Privé A, Robichaud A, Adam D and Brochiero E
(2024), Function of KvLQT1 potassium channels
in a mouse model of bleomycin-induced acute
lung injury.

Front. Physiol. 15:1345488.

doi: 10.3389/fphys.2024.1345488

COPYRIGHT

© 2024 Aubin Vega, Girault, Meunier, Chebli,
Privé, Robichaud, Adam and Brochiero. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Function of KvLQT1 potassium channels in a mouse model of bleomycin-induced acute lung injury

Mélissa Aubin Vega^{1,2}, Alban Girault^{1,2,3}, Émilie Meunier^{1,2},
Jasmine Chebli^{1,2}, Anik Privé¹, Annette Robichaud⁴,
Damien Adam^{1,2} and Emmanuelle Brochiero^{1,2*}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada, ²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, ³Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire (LPCM UR UPJV 4667), Amiens, France, ⁴SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc., Montréal, QC, Canada

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by an exacerbated inflammatory response, severe damage to the alveolar-capillary barrier and a secondary infiltration of protein-rich fluid into the airspaces, ultimately leading to respiratory failure. Resolution of ARDS depends on the ability of the alveolar epithelium to reabsorb lung fluid through active transepithelial ion transport, to control the inflammatory response, and to restore a cohesive and functional epithelium through effective repair processes. Interestingly, several lines of evidence have demonstrated the important role of potassium (K⁺) channels in the regulation of epithelial repair processes. Furthermore, these channels have previously been shown to be involved in sodium/fluid absorption across alveolar epithelial cells, and we have recently demonstrated the contribution of KvLQT1 channels to the resolution of thiourea-induced pulmonary edema *in vivo*. The aim of our study was to investigate the role of the KCNQ1 pore-forming subunit of KvLQT1 channels in the outcome of ARDS parameters in a model of acute lung injury (ALI). We used a molecular approach with KvLQT1-KO mice challenged with bleomycin, a well-established ALI model that mimics the key features of the exudative phase of ARDS on day 7. Our data showed that KvLQT1 deletion exacerbated the negative outcome of bleomycin on lung function (resistance, elastance and compliance). An alteration in the profile of infiltrating immune cells was also observed in KvLQT1-KO mice while histological analysis showed less interstitial and/or alveolar inflammatory response induced by bleomycin in KvLQT1-KO mice. Finally, a reduced repair rate of KvLQT1-KO alveolar cells after injury was observed. This work highlights the complex contribution of KvLQT1 in the development and resolution of ARDS parameters in a model of ALI.

KEYWORDS

potassium channels, acute lung injury, animal model, pulmonary inflammation, respiratory function, injury and repair, alveolar-capillary barrier

1 Introduction

Acute respiratory distress syndrome (ARDS; (ARDS Definition Task Force et al., 2012; Riviello et al., 2017; Matthay et al., 2024)) is one of the most severe forms of respiratory failure in the intensive care unit. Although the management of ARDS patients has greatly improved over the last decades, the mortality rate (over 30%–45%) remains unacceptably high and a better understanding of the pathophysiology of ARDS is still needed (Bellani et al., 2016). ARDS is a complex and heterogeneous syndrome that can occur after direct (e.g., pneumonia, aspiration) or indirect (e.g., sepsis) pulmonary insult and develops in three overlapping phases described as exudative, proliferative, and fibrotic (Bos and Ware, 2022). The acute exudative phase is characterized by severe epithelial alveolar and endothelial vascular damage leading to protein-rich edema infiltration, massive neutrophil recruitment, high cytokine/chemokine levels and decreased lung compliance (Matthay et al., 2019). The emergence of collagen deposition and fibroproliferation, which compete with epithelial repair, may progress toward irreversible pulmonary fibrosis. Therefore, the resolution of the reversible exudative phase prior to the establishment of fibrosis is a key determinant of ARDS recovery and patient survival (Matthay et al., 2019). Experimental studies in animal models of acute lung injury (ALI) and clinical trials in patients with ARDS have yielded conflicting results regarding the effect of therapeutic strategies that target the inflammatory response or aimed to improve edema resolution and lung compliance (Bosma et al., 2010; Fronius, 2013; Matthay, 2014; Mokra et al., 2019; Horie et al., 2020; Silva et al., 2020). Despite extensive research, there is still no effective pharmacological treatment approved for ARDS.

The resolution of ARDS is highly dependent on the ability of the alveolar epithelium to restore its integrity and function (Berthiaume et al., 1999; Gotts and Matthay, 2014). The alveolar epithelium maintains lung homeostasis through the function of alveolar cells, which are responsible for gas exchange (by alveolar type I (ATI) cells), surfactant production (by ATII cells), restoration of epithelial integrity after injury (by ATII progenitor cells) (Barkauskas et al., 2013), and alveolar fluid control (ATI and ATII cells), which is essential to keep the alveolar spaces virtually free of fluid for efficient gas exchange. Alveolar fluid clearance (AFC) is mainly driven by an active transepithelial sodium (Na^+) absorption through apical uptake by epithelial Na^+ channels (ENaC) (Egli et al., 2004; Hummler et al., 1996), active Na^+ efflux via the basolateral Na^+ / K^+ -ATPase pump, and subsequent potassium (K^+) recycling by basolateral K^+ channels (Basset et al., 1987).

K^+ channels, of which thirty different types have been identified in the respiratory epithelium, play a critical role in lung homeostasis (Bardou et al., 2009; Girault and Brochiero, 2013). One of the main functions of K^+ channels in epithelia is to control the membrane potential and thus to maintain an electrochemical gradient necessary for transepithelial ion and fluid transport (Markus and Qi-Xian, 2007; Bardou et al., 2009). In alveolar epithelial cell cultures, K_{ATP} and KvLQT1 channels contribute to the majority of the total basolateral K^+ currents and are involved in the control of Na^+ absorption (by regulating the ENaC channel) and, secondarily, in fluid clearance (Leroy et al., 2004; 2006; Bardou et al., 2012). In resected human lung, Sakuma et al. showed that a K_{ATP} channel opener favors fluid absorption across the alveolar epithelium, by a

mechanism secondarily mediated by amiloride-sensitive Na^+ channels (Sakuma et al., 1998). Furthermore, in one of our recent studies (Aubin Vega et al., 2023), we showed that KvLQT1 knockout (KO) in mice was associated with a small but significant increase in water lung content under physiological conditions, compared to wild-type (WT) mice, while both the lung function and histological structures were generally preserved in KvLQT1-KO mice. Our data then showed that pharmacological activation of KvLQT1 in WT mice favors the resolution of thiourea-induced lung edema, suggesting a role for KvLQ1 in fluid clearance (Aubin Vega et al., 2023).

A few studies have also examined K^+ channel function in models of ALI. Although no changes in lung structure or function were observed between WT and KO mice for TREK-1 (a mechanosensitive two-pore domain (K2P) K^+ channel) at baseline, TREK-1-KO mice exposed to hypoxia and mechanical ventilation showed worse lung compliance, increased cellular apoptosis, but lower levels of pro-inflammatory cytokines than WT mice (Schwingshackl et al., 2014). There is further evidence that the alveolar inflammatory response *in vivo* and *in vitro* can be influenced by K^+ channels (Schwingshackl et al., 2013a; Schwingshackl et al., 2013b; Schwingshackl et al., 2015; Schwingshackl et al., 2017; Zhou et al., 2019; Zyrianova et al., 2020; Petersen et al., 2022). For example, the role of the regulatory (β) subunit of KvLQT1 channels was investigated by Zhou et al. using KCNE2 knockout mice (Zhou et al., 2019), which exhibited increased levels of inflammatory mediators and altered lung function at baseline, as well as impaired response to ischemia-reperfusion injury. To our knowledge, the effect of deleting the pore-forming subunit (KCNQ1) of KvLQT1 has never been investigated in an animal model of ALI. Nevertheless, our laboratory has previously reported that the pharmacological modulation of K^+ channels (specifically KvLQT1 and K_{ATP}) affects alveolar repair processes after injury *in vitro* (Trinh et al., 2007).

Based on all this evidence, it can be postulated that K^+ channel modulation may have an impact on the development and resolution of ARDS parameters. Therefore, the aim of our study was to evaluate the function of KvLQT1 channels on the outcome of ALI, using an animal model of severe alveolar damage. We used a molecular approach with KO mice carrying a targeted mutation in the gene encoding the pore-forming α -subunit (KCNQ1) of the KvLQT1 channel. We chose the well-characterized model of acute lung injury induced by bleomycin. Although no single animal model perfectly recapitulates all the features of ARDS in humans, the bleomycin-induced model (Izbicki et al., 2002; Matute-Bello et al., 2008) exhibits key characteristics of ARDS, according to the American Thoracic Society report (Matute-Bello et al., 2011; Kulkarni et al., 2022). Focusing on the acute exudative phase (on day 7), we compared lung function parameters, alveolar barrier function, inflammatory profile, and performed histological and immunofluorescence analyses of lung sections from WT and KO mice. Our results suggest that KvLQT1 ablation exacerbates the deleterious outcomes of bleomycin on lung function. Further analysis highlighted the complex function of KvLQT1, whose deletion is associated with changes in the profile of infiltrating immune cells and reduced interstitial and/or alveolar inflammatory response, whereas the repair capacity of KvLQT1-KO AT2 cells was slowed after injury.

2 Material and methods

2.1 Animals and ethical statements

Mice with a targeted disruption of the *kcnq1* gene (constitutive *kcnq1*^{-/-} knock-out (KO) mice), encoding the KCNQ1 protein (pore-forming, α -subunit of the KvLQT1 K⁺ channel) were originally generated by insertion of a neomycin cassette in exon 2 by Dr. K. Pfeifer's group (Laboratory of Mammalian Genes and Development, NICHD/National Institutes of Health, Bethesda, United States of America), as described previously (Casimiro et al., 2001). The initial breeding pairs (on a C57BL/6J background) were kindly provided by Dr. K. Pfeifer. The mouse colony was then maintained by breeding heterozygous mice (male *kcnq1*^{+/-} × female *kcnq1*^{+/-}) at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) animal care facility and backcrossing with C57BL/6J wild-type mice (purchased from The Jackson Laboratory) every 10 generations (Aubin Vega et al., 2023). Mice were maintained in a controlled environment with *ad libitum* access to water and food (2018 Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo, United States). Pups were ear punched at weaning for genotyping by PCR (using G-KOF (5'-CCA GGA GTG GGT GGT TCT AC - 3'), G-KONF (5'-CGC TTC CTC GTG CTT TAC G-3') and G-KOR (5'-GCC AGC ACT AAA GAT CTT GC-3') primers (Integrated DNA Technologies, US) amplifying 240- and 370-bp products, for WT and mutant alleles, respectively) and were recognized as WT or KO mice (Aubin Vega et al., 2023). All animal procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the CRCHUM, in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care (CCAC).

2.2 *In vivo* experimental conditions

In vivo experiments were performed on 6- to 10-week-old mice randomly assigned to the experimental groups described below (matched for weight and sex). WT and KO mice were compared at baseline (in control conditions, PBS) and after bleomycin-induced acute lung injury (Bleo). Bleomycin (3 U/kg, Fresenius Kabi, Canada) was administered by intranasal instillation (i.n., 50 μ L) on day 0; the control group received the same volume of PBS (i.n.). This route of administration was chosen over the intratracheal technique because it is non-invasive, rapid (requiring only a few seconds of isoflurane anesthesia from which the animals regain consciousness very quickly), and spontaneous nasal aspiration allows for a more homogeneous distribution of the administered fluid throughout the lungs. The dose of 3 U/kg of bleomycin was chosen to induce severe lung injury without significant mortality. Only a negligible number of mice had to be euthanized because they had reached the endpoints and were therefore excluded from the outcome measurements. The following 4 experimental groups (genotype/i.n.) were then compared: WT/PBS, WT/Bleo, KO/PBS, and KO/Bleo, as indicated in each figure legend. On day 7, mice were anesthetized for blood gas, electrolyte and metabolite analysis, or lung function measurements, or euthanized with an overdose of pentobarbital (intraperitoneal injection, i. p.) prior to lung collection. Samples were then used for water lung content assays, histology/immunofluorescence analyses, or isolation of

primary alveolar epithelial cells before primary culture and wound-healing assays (see below).

2.3 Measurement of blood gases, electrolytes, and metabolites with the epoc[®] blood analysis system

On day 7, mice were first anesthetized with isoflurane (3% mixed with 21% O₂ and medical air, to mimic environmental conditions). The abdomen was then cut open to access the inferior vena cava, and venous blood was collected using a 1 mL syringe and a 25 G heparinized needle (Fresenius Kabi). The collected blood was placed in the epoc[®] Blood Analysis System (Siemens Healthineers Canada), which allows measurement of blood gases (pH, pCO₂), electrolytes (HCO₃⁻, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻), and metabolites (glucose, lactate, and urea). Mice were then euthanized by cervical dislocation and the lungs were snap frozen for mRNA extraction or embedded for histological analysis.

2.4 Measurements of lung function *in vivo*

Mechanical properties (resistance, elastance, and compliance) of the respiratory system were assessed in live WT and KO mice, challenged or not (i.n. PBS) with bleomycin (Bleo, 3 U/kg) using the flexiVent FX system (SCIREQ, Montreal, QC, Canada), as previously described (Robichaud et al., 2017; Aubin Vega et al., 2023). Briefly, mice received an administration of xylazine hydrochloride (12 mg/mL, i. p.) 5 min before being deeply anesthetized with sodium pentobarbital (70 mg/kg, i. p.). They were then tracheotomized, cannulated (18-gauge metal cannula with a typical resistance of 0.22 cmH₂O.s/mL), and connected to a computerized small animal ventilator for mechanical ventilation. Details of flexiVent settings, data acquisition, and measurement maneuvers were as previously described in a previous study (Aubin Vega et al., 2023). Briefly, data acquisition was started after two deep lung inflations to 30 cmH₂O, to open closed lung areas and standardize lung volumes. A total of four consecutive and different measurement perturbations were performed as one cycle, and the cycle was repeated until at least three acceptable measurements were recorded (the average of these triplicates is shown as a single dot in each of the graphs).

The mechanical properties of the respiratory system were determined by using both single (SnapShot-150) and broadband (Quick Prime-3) forced oscillation perturbations, and the overall resistance of respiratory system (R_{rs}), elastance (E_{rs}), and compliance (C_{rs}) were obtained by fitting the classical single compartment model to the experimental signals of the single forced oscillation measurement. The constant-phase model also allowed us to determine Newtonian resistance (R_N), tissue elastance (H), and tissue damping (G) parameters from the broadband forced oscillation signals (Quick Prime-3).

Pulmonary compliance was characterized using pressure-volume (PV) curves constructed by inflating the lungs with pressure increments from PEEP to 30 cmH₂O and then deflating

in a similar manner. The deflation limbs were analyzed as previously described (Robichaud et al., 2021) and used to determine the quasi-static compliance (C_{st}).

2.5 Pulmonary edema index

After euthanasia on day 7, the vena cava was cut; the lungs were removed and weighed directly (wet weight) (Aubin Vega et al., 2019; Aubin Vega et al., 2021; Aubin Vega et al., 2023). The lungs were then heated at 95°C for 24 hours to measure the dry weight. The water content of the lungs, as an index of pulmonary edema, was then calculated using the following formula (Kabir et al., 2002):

$$WLC (mg/g) = (wet\ weight - dry\ weight) / mice\ weight$$

2.6 Evans blue extravasation assay

The Evans Blue extravasation assay, a commonly used technique to evaluate pulmonary permeability after endothelial damage, was performed on mice (WT and KO) under control conditions (WT/PBS and KO/PBS) or 7 days after bleomycin challenge (Bleo, 3 U/kg). Briefly, a solution of Evans Blue (50 mg/kg, Sigma) was injected into the tail vein (intravenous injection, i. v.), and after 3 hours of blood circulation, the mice were euthanized; the lungs were perfused with PBS-EDTA (5 mM, 1 mL) via the pulmonary artery and then washed with subsequent baths of PBS, as previously described (Aubin Vega et al., 2023). Lungs were minced with scissors and incubated with formamide (Sigma) at 37°C for 18 h. The resulting homogenate was centrifuged and the luminescence of the supernatant was measured at 620 and 740 nm to determine the concentration of Evans Blue according to a standard curve. The results were then corrected for heme pigment using the following formula:

$$E620 (EBD\ corrected) = E620 - (1.426 \times E740 + 0.030)$$

2.7 Analysis of broncho-alveolar lavage (BAL) fluid

In another set of experiments, BALs were obtained after mouse euthanasia on day 7 post-bleomycin challenge by instillation of saline (1 mL) through a catheter. Three replicate BALs (from the same mouse) were pooled on ice prior to centrifugation (700 g, 4°C, 8 min). Supernatants were aliquoted and stored at -80°C until used to determine protein concentration by the Bradford method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON, Canada).

Cell pellets were resuspended in PBS (400 µL) for total immune cell count quantification in a hemocytometer. Cell suspensions were then diluted to a density of 80,000 cells (in 200 µL PBS/slide) before cytocentrifugation (750 rpm, 5 min, Thermo Scientific Cytospin 4 Cytocentrifuge, Block Scientific, NY, United States) onto glass slides and staining with Hema 3™ Stat Pack (Fisher Healthcare, United States). The immune differential cell count was then determined and reported as the percentage of neutrophils,

macrophages and lymphocytes among a total of 400 leukocytes/slide counted.

2.8 RNA extraction and real-time quantitative PCR

After harvesting, the lungs were immediately snap frozen in 2-methylbutane on dry ice and stored at -80°C until needed. One of the lungs was crushed in liquid nitrogen and the total RNA was extracted using RNeasy mini kits (QIAGEN, Toronto, Canada). RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop™ One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madison, United States). Samples without $OD_{260/280} \geq 1.8$, $OD_{260/230} \geq 1.8$, were disqualified. RNA integrity was also verified by migrating the samples onto an agarose gel (1%) containing SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, Canada) and visualized with the Typhoon Gel Imager (Typhoon TRIO variable mode imager, General Electric Healthcare). RNA extracts were then treated with DNase (DNA-free™ DNA Removal Kit, Invitrogen) before reverse transcription of RNA (1 µg) to cDNA using the iScript Reverse Transcription SuperMix Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) and the DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Woodbridge, Canada).

For PCR amplification and quantitative analysis of TNF-α, IL-1β, IL-6, KC (the murine equivalent of human IL-8), and MCP-1 gene expression levels, 1.25–50 ng of cDNA, depending on the dilution factor specific to each gene of interest, was amplified using the SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix Kit (Bio-Rad) with the QuantStudio™ 5 System (Thermo Fisher Scientific) in the presence of 337.5 nM of forward and reverse primers designed on the National Center for Biotechnology Information Primer Blast website and synthesized by Integrated DNA Technologies Canada based (see sequences in Table 1). All kits were used according to the manufacturer's instructions. The delta-delta Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) was used to calculate the relative expressions compared to the control groups, and the expression level of the housekeeping gene β-actin was used for normalization. Data are expressed as \log_2 ($\Delta\Delta Ct$).

2.9 Histological analysis

To prevent alveolar collapse, a fixative solution of 4% paraformaldehyde (500 µL, Electron microscopy sciences, United States) was carefully administered by intratracheal instillation (i.t.) prior to lung harvesting. Tissue samples were incubated in a sucrose gradient (24 h for each gradient of 5%, 10%, and 20%) in a solution of paraformaldehyde (0.4%) and embedded in resin (Shandon Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific). After cryosectioning (5 µm) with a cryostat device (Leica Microsystems, model CM1950110111), slides were stained with hematoxylin and eosin (Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit, ThermoScientific, United States) and scanned with a Versa stand at ×20 objective on a Leica® light microscope, prior to histological analysis or frozen until immunostaining.

We first established a lung injury score by computational analysis using Visiomorph™ software (Visiopharm, Hoersholm,

TABLE 1 Primer sequences and RT-qPCR conditions.

| Gene | Forward primer | Reverse primer | Cycling conditions |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---|
| TNF- α | 5'-CCC CAA AGG GAT GAG AAG TT-3' | 5'-CAC TTG GTG GTT TGC TAC GA-3' | 95°C-5min 40x (95°C - 15s +60°C - 30 s) |
| IL-1 β | 5'-GTT GAC GGA CCC CAA AAG-3' | 5'-GTG CTG CTG CGA GAT TTG-3' | |
| IL-6 | 5'-TCT CTG GGA AAT CGT GGA A-3' | 5'-TCT GCA AGT GCA TCA TCG T-3' | |
| KC | 5'-TGA AGC TCC CTT GGT TCA G-3' | 5'-GGT GCC ATC AGA GCA GTC T-3' | |
| MCP-1 | 5'-AGC TGT AGT TTT TGT CAC CAA GC-3' | 5'-GAC CTT AGG GCA GAT GCA GT -3' | |
| β -actin | 5'-TTG CTG ACA GGA TGC AGA AG-3' | 5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3' | |

Denmark), based on septal thickening, the presence of fibrotic foci, and immune cell infiltration throughout the lung section to account for the heterogeneous nature of inflammatory damage with both intact and injured/inflamed areas. The closer the injury score is to 1, the more damaged and congested the lungs are, altering gas exchange capacity. A team of pathologists (Drs. Feryel Azzi and Guillaume St-Jean from the Molecular Pathology Platform at CRCHUM) also performed a blinded histological analysis to quantify the percentage of total area with diffuse alveolar damage and immune cell (polynuclear neutrophil) infiltration (expressed as % of injured/inflamed area out of the total area of the lung section). This lung injury score was adapted from the official American Thoracic Society workshop report (Matute-Bello et al., 2011; Kulkarni et al., 2022), a well-established scoring system for experimental models of ALI, and takes into account of overall (interstitial and alveolar) inflammation, alveolar wall thickening (mainly due to immune cell infiltration), and the presence of debris. The severity of inflammation in the damaged/inflamed areas (on a score of 0–3) was also defined by the team of pathologists.

2.10 Pro-SPC and AQP5 immunostainings of cytomatrix-embedded frozen lung sections

Lung sections (5 μ m) were fixed in 0.4% paraformaldehyde before membrane permeabilization with 0.1% Triton X-100 and blocked for 1 h with a solution of PBS +10% FBS (Saradigm, United States) + 10% BSA (Sigma-Aldrich). Slides were then incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-pro-SPC (1:100, #AB3786 Millipore, United States) or anti-AQP5 (1:100, #AQP005, Alomone Labs, Israel) antibodies. The next day, lung tissues were again blocked before incubation with an Alexa Fluor™ 568-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:200, Life Technologies, United States) for 1 h, followed by a DAPI nuclear staining (1:1,000, Sigma) before mounting with Prolong® Gold (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Images were captured using an Exiqua camera (QImaging, Canada) under an inverted fluorescence microscope (Olympus, Canada) at 200x (NA = 0.75) and analyzed using ICY software (version 2.4.2.0, license GPLv3, developed by Institut Pasteur and France-BioImaging (de Chaumont et al., 2012)). Our analysis protocol allows a quantitative measurement of the intensity (in pixels) of the specific signal of each region of interest (ROI) (stained with each specific primary antibody), normalized to the total number of DAPI-positive cells (more than 24,000 cells were analyzed for each

staining). This ICY protocol also allows for adjustment of the ROI detection parameters to eliminate any potential background signal. Our controls showed no background, confirming the specificity of all primary and secondary antibodies used in our assays.

2.11 Isolation and primary culture of mice alveolar type II (ATII) epithelial cells

ATII cells were isolated from the lungs of WT and KO mice under control conditions. Lungs from approximately 1–3 WT or KO mice were pooled to increase cell yield. After harvest, the lungs were rinsed with physiological saline solution to remove excess blood cells and most of alveolar macrophages. The lungs were digested with elastase (30 U/mouse, Worthington Biochemical, Lakewood, N.J. United States, 30–45 min), minced, and then the resulting cell suspension was filtered. Alveolar epithelial cells were then purified using a differential adherence technique (Dobbs, Gonzalez, and Williams, 1986), which allows the discarding of remaining macrophages and fibroblasts attached to Petri dishes coated with IgG and then the collection of an epithelial cell suspension, enriched for up to 86% of AT2 (Brochiero et al., 2004; Leroy et al., 2004; Tan et al., 2020). Trypan blue staining of the post-IgG cell suspension confirmed >90% cell viability. After cell counting, the cell pellet was resuspended in DMEM (Gibco, United States) supplemented with 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Ontario, Canada) and 50 U/mL penicillin-streptomycin (ThermoScientific) + 10% FBS (Saradigm, US) and seeded at a density of ~2M cells/cm² density on cell culture plates (48-well Costar, Corning Incorporated, United States) coated with laminin (Millipore) for primary culture (with medium replacement on day 2), until adequate confluence for wound-healing assays on day 4 (see below). Using this protocol, we previously showed that by day 3–4 of primary 2D culture, ~75–85% of the cells exhibited an AT2 phenotype, while 20%–25% transdifferentiated from AT2 to AT1-like cells (Tan et al., 2020).

2.12 Wound-healing assays

Wound-healing assays were performed on primary cultured, confluent mouse ATII cells. Briefly, alveolar cell monolayers were mechanically injured (as per two wounds per well, two wells per conditions) with a 10 μ L pipette tip according to a highly reproducible technique (Trinh et al., 2007; 2012; Girault et al., 2015; Ruffin et al., 2016; Adam et al., 2018; Aubin Vega et al.,

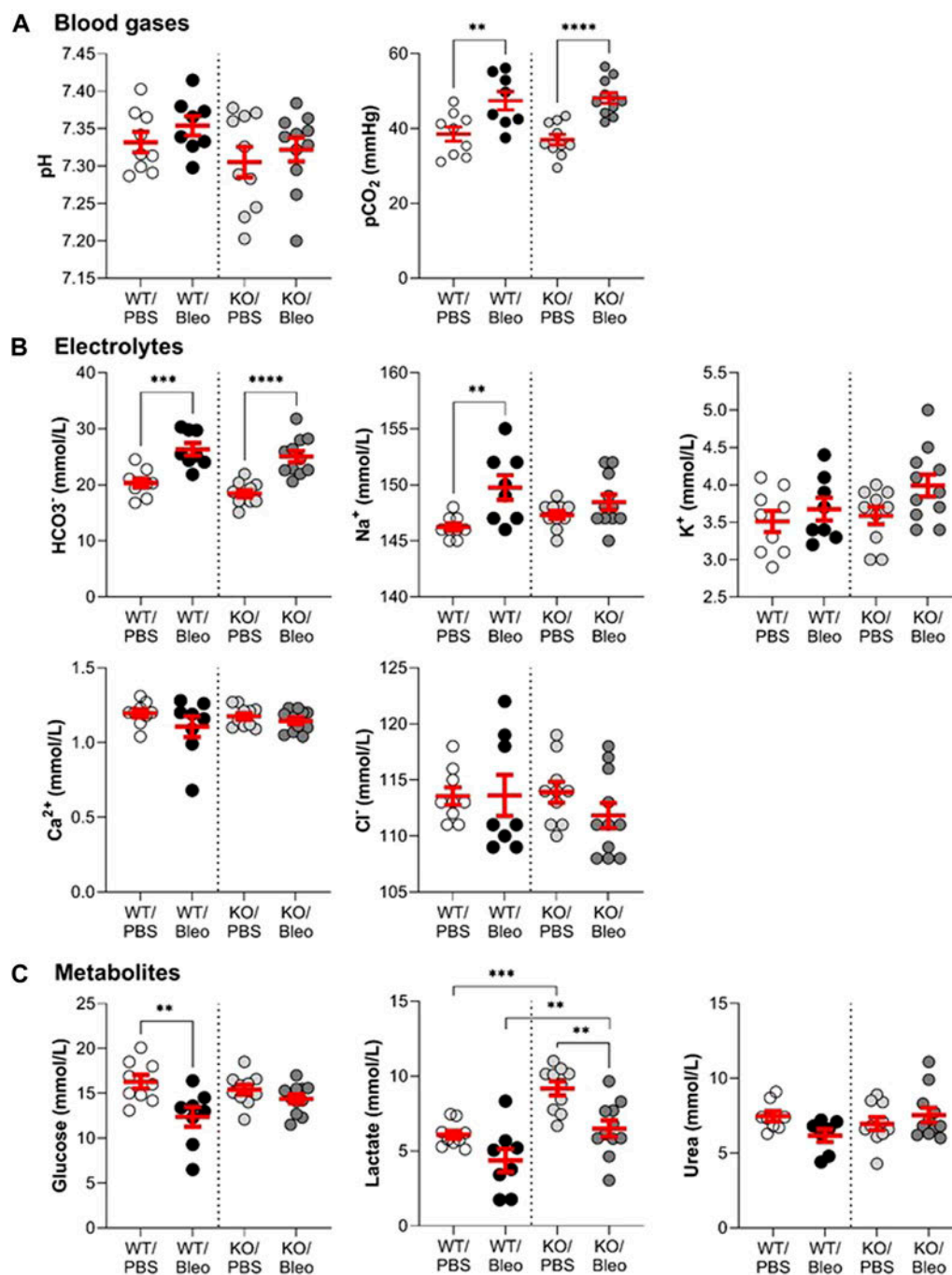


FIGURE 1
Assessment of the pulmonary and systemic dysfunction after the bleomycin challenge. Wild-type (WT, $n = 8-9$, shown on the left side of vertical dotted line) and KvLQT1-KO (KO, $n = 10-11$, right side) mice were challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, (I) n. on day 0). On day 7, blood gas (A), electrolyte (B), and metabolite (C) levels were measured using the epoc[®] system. Each dot represents 1 mouse and values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) was performed for all parameters. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

2019). After injury, the monolayers were washed with DMEM-FBS to remove detached, injured cells. A mark under the wells allowed us to photograph with a Nikon camera under light microscopy the wounds at the same location (at time 0 and after 6 h of repair). The rate of wound closure, expressed in $\mu\text{m}^2/\text{h}$, was calculated using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States) from the wound area

measured after repair ($t = 6$ h) compared to the initial wound area ($t = 0$ h) for each wound (as shown in [Supplementary Figure S1](#)). This time point correspond to approximately 50% of repair, which allow to observe either stimulatory or inhibitory effects on the repair capacity as a function of the experimental conditions, while wounds are generally fully repaired at 24 h ([Supplementary Figure S1](#)).

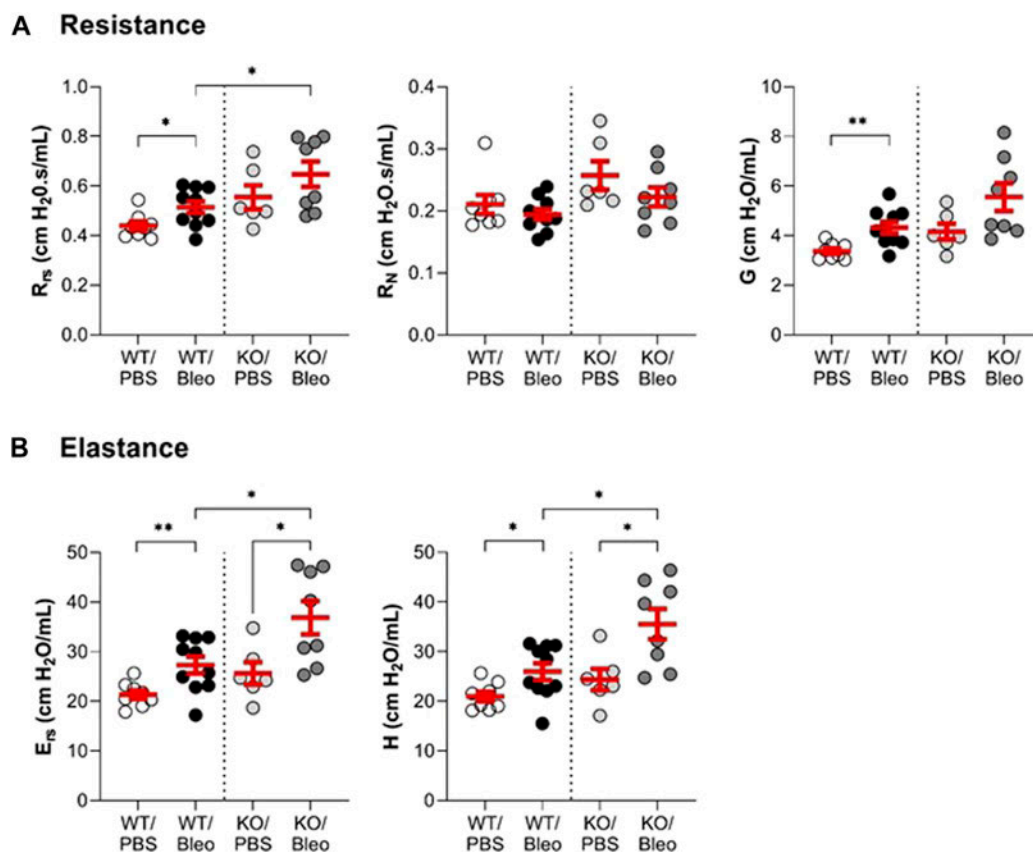


FIGURE 2

Evaluation of the lung function *in vivo* (resistance and elastance). Wild-type (WT, $n = 8-10$, left side of vertical dotted line) and KvLQT1-KO (KO, $n = 6-8$, right side) mice were challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, i. n. on day 0). On day 7, several respiratory mechanics parameters reflecting lung resistance (R_{rs} , R_N and G, panel (A)) and elastance E_{rs} and H, panel (B)) were measured using the flexiVent system (SCIREQ Inc., Montreal, QC, Canada). Each dot represents 1 mouse and values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) was performed for all parameters. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

This wound healing assay provides insight into the initial repair processes engaged after injury (mainly cell migration and proliferation).

2.13 Statistical analyses

Data are presented as dot plots with mean \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Normality tests (Agostino/Pearson) were performed first, followed by appropriate statistical tests, as described for each figure legend. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Evaluation of blood parameters in mice after acute lung injury induced by bleomycin

Blood analysis (Figure 1) using the epoc[®] system was first performed to evaluate blood gases (A), electrolytes (B), and

metabolites (C) in WT and KvLQT1-KO mice. Under physiological conditions, KvLQT1 deletion (KO/PBS group) did not alter blood parameters, except for an increase in lactate levels, compared to the WT/PBS group. On day 7 of the exudative phase of bleomycin-induced ALI, we observed an increase in pCO_2 levels, which were similar in WT/Bleo and KO/Bleo mice. In both groups, we also noticed an increase in bicarbonate (HCO_3^-), which probably acted as a buffering system, as indicated by the stable pH values, despite the increased pCO_2 . Sodium (Na^+) was the only electrolyte whose showed an increase after bleomycin exposure (in the WT mice only). Among the metabolites, glucose concentration was decreased in WT mice exposed to bleomycin, whereas no change was observed in KO/Bleo mice compared to KO/PBS. Bleomycin also induced a small decrease in lactate, although levels remained significantly higher in the KO/Bleo group than in the WT/Bleo group.

3.2 *In vivo* measurement of lung function in WT and KvLQT1-KO mice exposed to bleomycin

Pulmonary function (Figure 2; Figure 3) was assessed using various measurement manoeuvres designed to characterize the

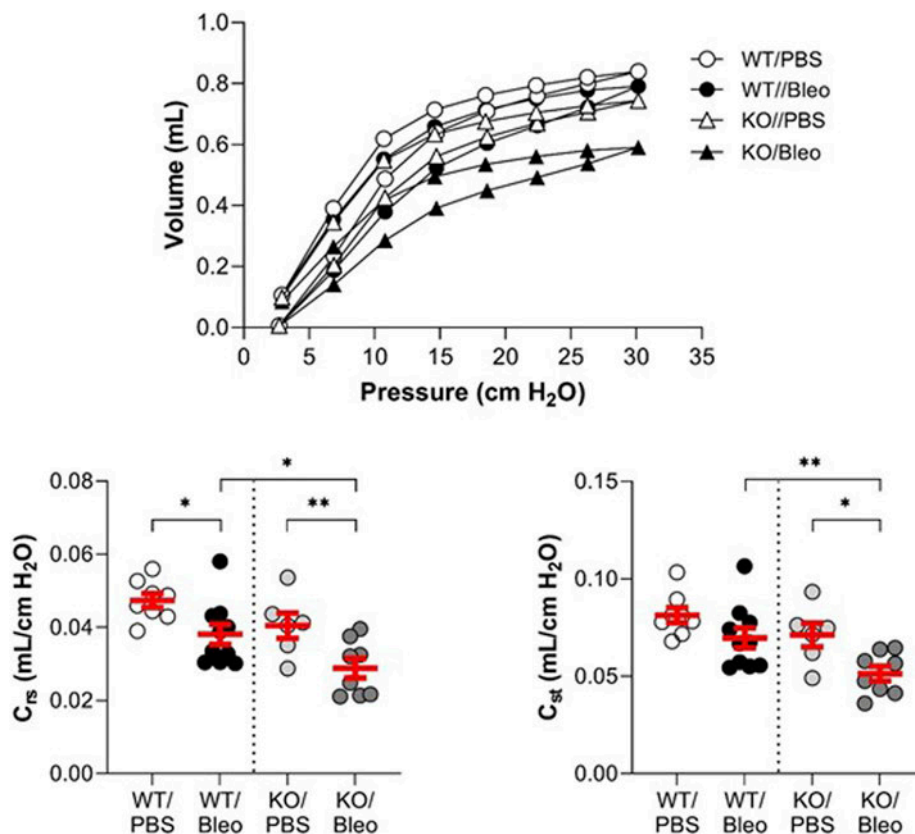


FIGURE 3

Evaluation of the lung function *in vivo* (compliance). Wild-type (WT, $n = 8-10$, left side of vertical dotted line) and KvLQT1-KO (KO, $n = 6-8$, right side) mice were challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, i. n. on day 0). On day 7, several respiratory mechanic parameters reflecting lung compliance (PV loop, C_{rs} and C_{st}) were measured using the flexiVent system. Each dot represents 1 mouse and values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) was performed for all parameters. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

biophysical properties of the lung (resistance: R_{rs} , R_N , G, elastance: E_{rs} , H, or compliance: pressure-volume curve, C_{rs} , C_{st}) and provide information on the contribution of the whole respiratory system (R_{rs} , E_{rs} , C_{rs}), the peripheral tissues (G, H) or the large conducting airways (R_N).

Under physiological conditions, a non-statistically significant trend toward higher resistance and elastance and lower compliance was measured in KO/PBS mice compared to WT/PBS (Figure 2; Figure 3).

In WT mice exposed to bleomycin, the results showed a significant rise in the overall resistance of the respiratory system (R_{rs}) and parameter G (which reflects energy loss during the respiratory manoeuvre) compared to the WT/PBS group (Figure 2A). Newtonian resistance (R_N) was unaffected, suggesting that the increase in R_{rs} was due to changes at the level of peripheral tissues and small airways. A similar pattern was observed in KO mice, but in this group the differences in R_{rs} and G did not reach the level of statistical significance. Nevertheless, the KO/Bleo mice had a higher respiratory resistance (R_{rs}) than the WT/Bleo mice (Figure 2A, left panel).

Compared to PBS treatment, the overall elastance of the respiratory system (E_{rs}) and the tissue stiffness parameter (H) were also significantly increased after bleomycin administration in both the WT and KO mice (Figure 2B). However, the

deleterious effect of bleomycin was more pronounced in the KO mice than in their WT littermates.

Under physiological conditions, the pressure-volume curves showed a slight downward shift in the KO/PBS group compared to the WT/PBS group (Figure 3). This observation was also reflected by a slight decrease in the compliance parameters (C_{rs} , C_{st}), but without a statistically significant difference between the two groups.

In WT mice, bleomycin treatment was associated with a slight shift in the PV loop, a statistically significant decrease in dynamic compliance (C_{rs}) and a non-significant trend toward a decrease in static compliance (C_{st}). As also shown in Figure 3, bleomycin had a more pronounced effect in the KO mice. Indeed, the PV loop was markedly shifted downward in KO/Bleo mice with significantly lower C_{rs} and C_{st} values in KO/Bleo compared to PBS treatment (KO/PBS) as well as to the WT/Bleo group (Figure 3).

3.3 Bleomycin-induced alteration of the alveolar-capillary barrier

To evaluate alveolar-capillary barrier function (Figure 4), we measured water lung content (as an edema index), protein concentration in broncho-alveolar lavage (BAL), and Evans Blue

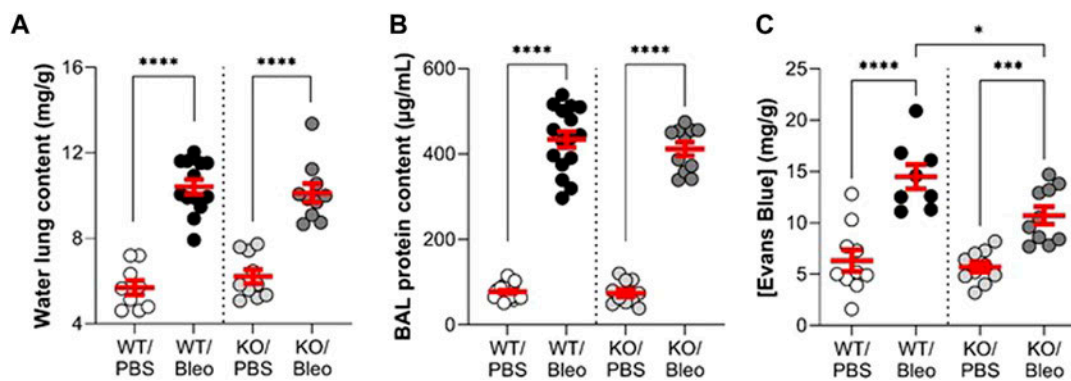


FIGURE 4

Alteration of the alveolar-capillary barrier by bleomycin in WT and KvLQT1-KO mice. Wild-type (WT, left side of vertical dotted line) and KvLQT1-KO (KO, right side) mice were challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, i. n. on day 0). On day 7, water content of the lungs (A), (n = 9–13), protein content in broncho-alveolar lavages (BALs) (B), (n = 10–20) and Evans Blue concentration (C), (n = 8–10) were measured. Each dot represents 1 mouse and values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) for all parameters was performed for (A–C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

extravasation in the lung compartment (interpreted as an index of endothelial permeability).

Under basal conditions, WT and KO mice showed no difference in these three parameters. Bleomycin exposure induced a twofold increase in water lung content (Figure 4A), as well as a high rise in protein concentration in BAL (Figure 4B), indicating flooding of protein-rich edema, similar in the WT and KO mice. The concentration of Evans Blue, measured after the extravasation of the dye from the blood into the lung compartment of WT/Bleo and KO/Bleo mice (Figure 4C), indicated an alteration in endothelial integrity after bleomycin, although the levels were slightly less compromised in KO than in WT mice.

3.4 Modulation of bleomycin-induced inflammatory response by KvLQT1 extinction

The inflammatory response, another important criterion in ARDS/ALI, was first evaluated by assessing the immune cell composition in BAL (Figures 5A–D) and then the gene expression levels of pro-inflammatory cytokines/chemokines in whole lung tissue (Figures 5E–I) collected from WT and KO mice under physiological conditions as well as after bleomycin challenge (day 7).

The results of the BAL analyses showed that the immune cell composition (total cell count and percentage of neutrophils, macrophages and lymphocytes) was the same in the KO/PBS and WT/PBS controls. Under bleomycin conditions, WT and KO mice showed a similar significant increase in the total number of immune cells compared to their respective controls (PBS). However, the immune cell profile in response to bleomycin differed between WT/Bleo and KO/Bleo mice. Although bleomycin exposure caused an increase in neutrophils in both WT/Bleo and KO/Bleo mice (and a concomitant decrease in macrophage levels), a neutrophil/macrophage ratio of 43/45 was calculated in the BAL of WT/Bleo vs. 25/64 in KO/Bleo. The increase in lymphocytes was similar in WT/Bleo and KO/Bleo mice (Figures 5B–D).

We then measured the expression levels in WT and KO lungs of a panel of cytokines and chemokines, based on the inflammatory profile found in two different cohorts of ARDS patients (Meduri et al., 1995a; Goodman et al., 1996). Under basal conditions, we observed a trend for KO mice to have higher levels of most of the pro-inflammatory markers tested (except MCP-1) than WT mice, although there was no statistical difference. An increase in each of the pro-inflammatory cytokines/chemokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC, and MCP-1) was measured on day 7 after bleomycin exposure in WT mice (WT/Bleo). In KO mice, however, the inflammatory response to bleomycin was impaired, with only IL-6 and MCP-1 being significantly upregulated, while TNF- α , IL-1 β , and KC remained at a similar expression levels as in the control group (KO/PBS) (Figures 5E–I).

3.5 Evidence of bleomycin-induced acute lung injury and inflammation in histological sections

Observations of histological lung sections (Figure 6A) showed that the WT and KO mice studied had a healthy alveolar structure under physiological conditions, as observed in our previous study (Aubin Vega et al., 2023). Intranasal administration of bleomycin induced severe changes, particularly inflammation, in the lungs of WT mice. Images of representative zones are presented (Figure 6A), showing dense congestion and cellular infiltration in zone 1, and significant septal thickening with alveolar structural changes in zone 2. The zone 3 image well illustrates the heterogeneous nature of lung damage within the same animal, with areas of extensive lung damage/inflammation juxtaposed with healthy alveolar zones. Compared to WT/Bleo, the alveolar lung architecture in KO/Bleo mice was less affected, as shown in representative images (Figure 6A) and by injury scoring (Figure 6B), based on the assessment of diffuse alveolar damage, specially the presence of an inflammatory infiltrate in the alveoli and interstitium (with septal wall thickening), as well as cellular debris, throughout the

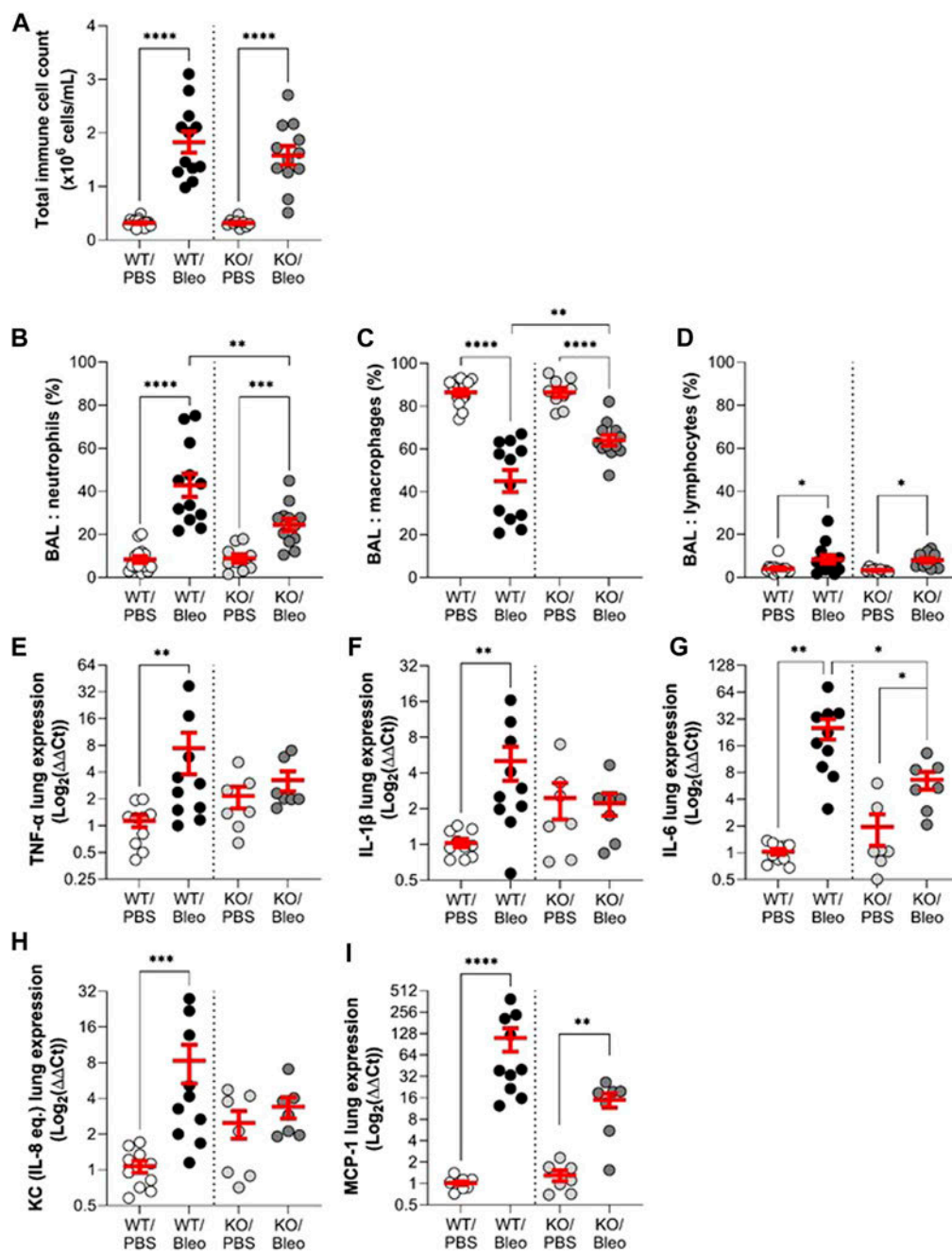


FIGURE 5

Effect of KvLQT1 modulation on bleomycin-induced inflammatory response. Wild-type (WT, left side of vertical dotted line) and KvLQT1-KO (KO, right side) mice were challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, i. n. on day 0). On day 7, BAL (n = 9–14) was collected and total immune cell count was performed (A). The cell pellet was then cytocentrifuged and stained with hematoxylin-eosin to obtain differential cell counts (in %) of neutrophils (B), macrophages (C) and lymphocytes (D). Pro-inflammatory cytokine (E): TNF- α , (F) IL-1 β , and (G) IL-6 and chemokine (H): KC and (I) MCP-1 mRNA fold change expression (normalized to β -actin housekeeping gene) was detected from lung tissue of WT (n = 10) and KO (n = 7) mice exposed or not to bleomycin on day 7 and presented as \log_2 ($\Delta\Delta$ Ct). Each dot represents 1 mouse and values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) was performed for (A–C and F). Kruskal–Wallis nonparametric test (Agostino/Pearson normality test: negative) was performed for (D,E,G and H). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

lung section (which included both intact and injured/inflamed areas). Consistent with the representative images in Figure 6A, lung injury scores (Figure 6B), percentage of injured/inflamed lung area (Figure 6C), and inflammatory infiltrate scores (Figure 6D), as defined by the pathologists, were significantly lower in KO/Bleo mice than in WT/Bleo mice.

3.6 Evaluation of the epithelial integrity with AII (pro-SPC) and ATI (AQP5) cell markers

Because the injury score is mainly based on apparent (interstitial and alveolar) inflammation as well as alveolar wall thickening due to immune cell infiltration within the interstitium and does not

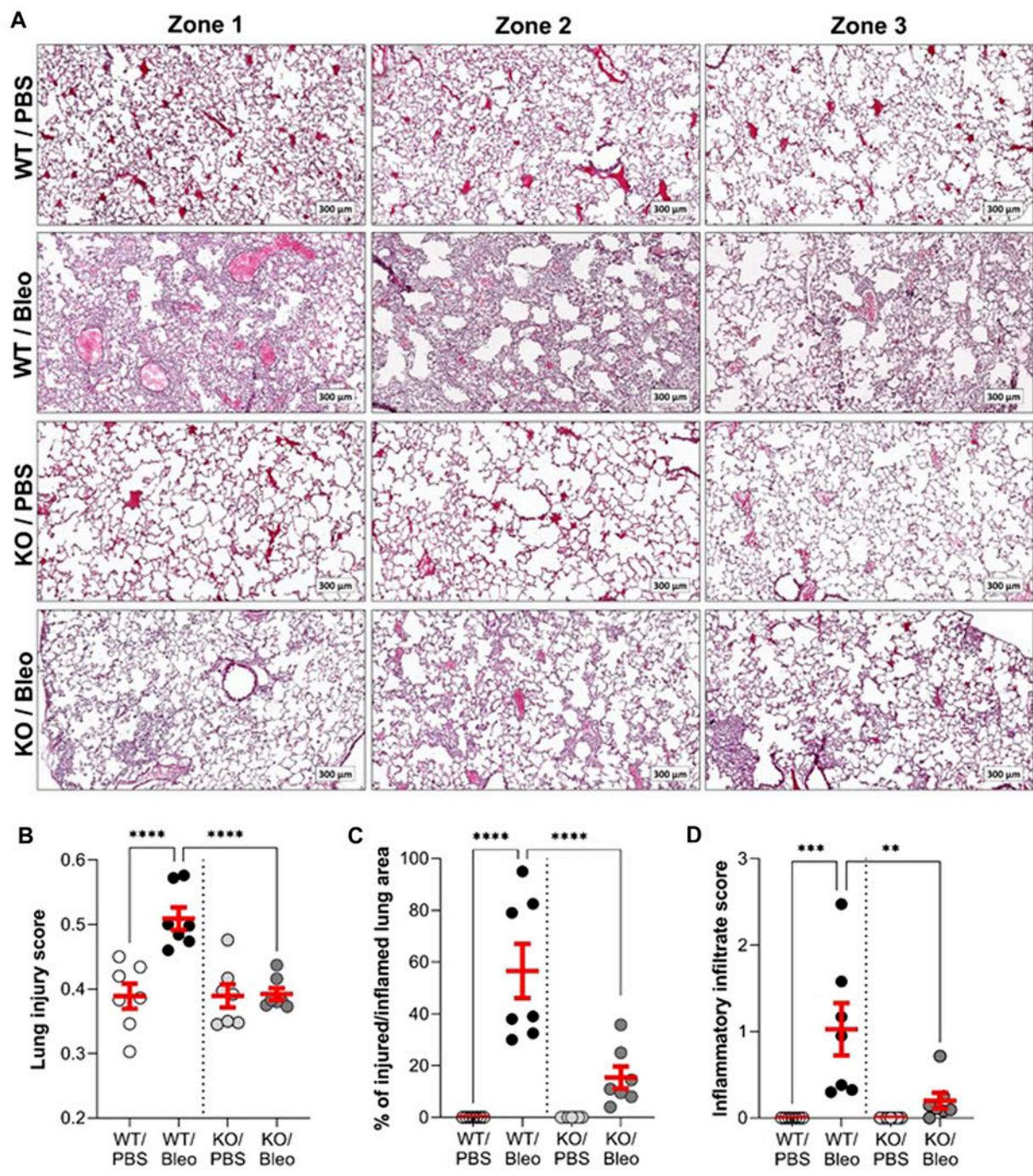


FIGURE 6 Histological evidence of bleomycin-induced inflammatory tissue damage. On day 7, fixed lung tissues from wild-type (WT, n = 7) and KvLQT1-KO (KO, n = 7) mice challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, i. n. on day 0) were collected for further hematoxylin-eosin staining. Three representative zones (scale: 300 μ m) from each experimental group are shown in (A). A lung injury score representing the proportion of septa responsible for gas exchange (B) was defined using the Visiomorph[®] software. The percentage (%) of injured/inflamed lung area (C) with inflammatory damage was also evaluated on the whole histological sections. The score of inflammatory infiltration intensity was also defined by pathologists from the CRCHUM molecular platform (D). Each dot represents 1 mouse and values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) was performed for (B,C, and D) ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

specifically capture the damage to the alveolar epithelium, we next performed complementary immunostaining analyses with specific markers of ATII (pro-SPC, Figure 7A) and ATI (AQP5, Figure 7B) cells in lung sections from WT and KO mice exposed or not to bleomycin. As shown in the representative images (top panel) and

intensity quantifications (bottom panel), KO/PBS mice exhibit an increase in pro-SPC compared to WT/PBS mice. Bleomycin did not significantly affect the intensity of pro-SPC in either WT or KO mice, with the latter (KO/Bleo) remaining significantly higher than in the WT/Bleo (Figure 7A).

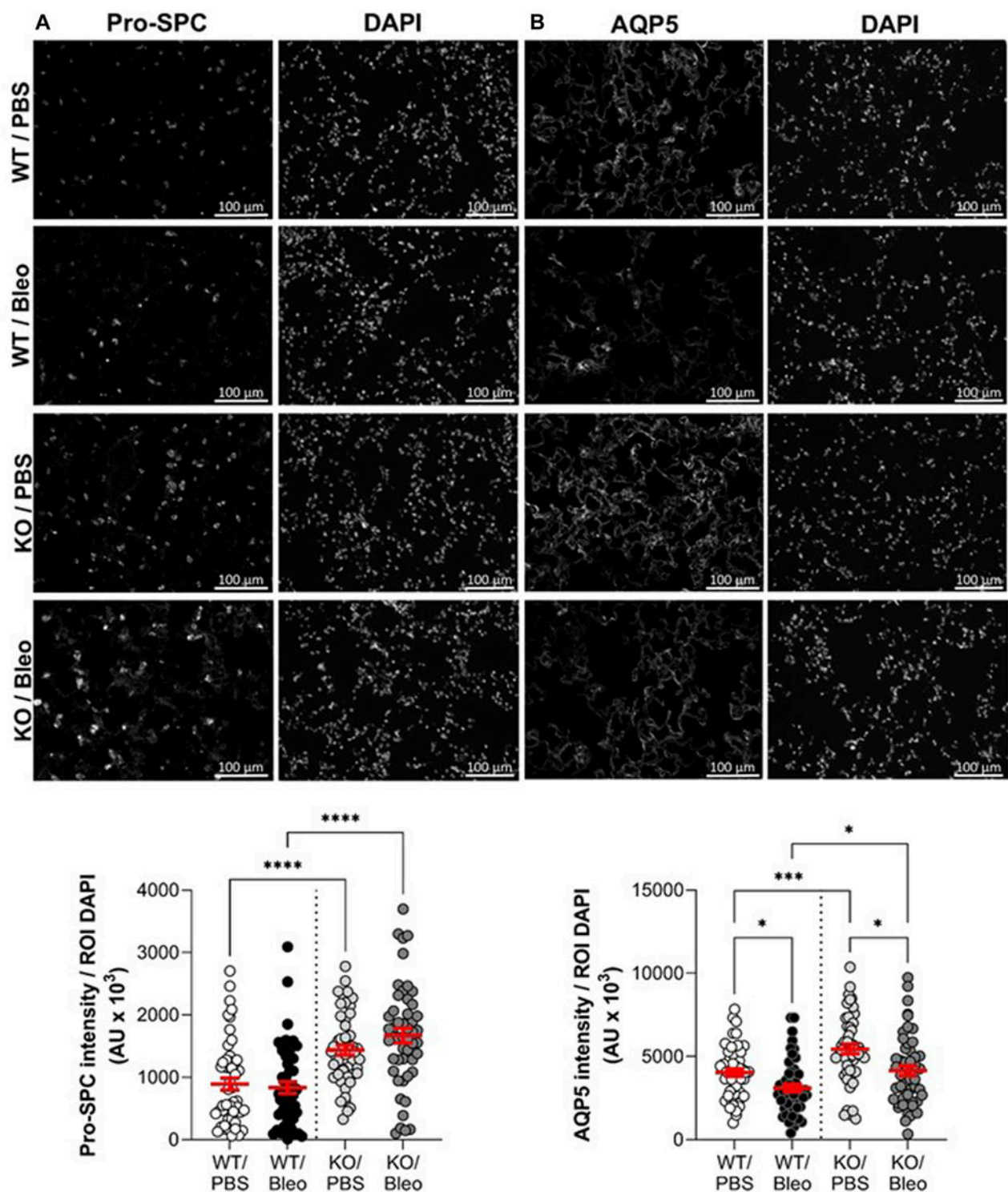
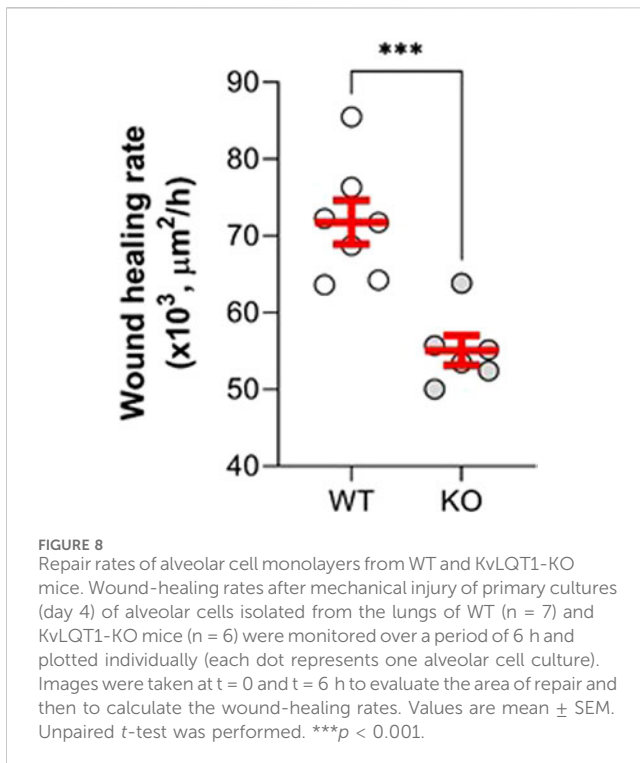


FIGURE 7

Assessment of alveolar epithelial markers after bleomycin challenge. Representative immunofluorescence images of lung sections (scale: 100 μ m) from WT and KvLQT1-KO mice challenged or not (PBS) with bleomycin (3 U/kg, 50 μ L, (I) n. on day 0). On day 7, lung tissues were fixed and immunostained for pro-SPC (A), n = 50 fields, ATII marker and AQP5 (B), n = 50 fields, ATI marker. Cell nuclei were stained with DAPI. Quantification of marker intensity was performed using a protocol exploited by ICY software. Values are mean \pm SEM. One-way ANOVA test (Agostino/Pearson normality test: positive) was performed for (A,B) * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Similarly, significantly higher AQP5 levels were observed in KO than in WT mice, under physiological conditions (PBS, Figure 7B). In contrast to AT2 cell staining, which was unaffected after

bleomycin-induced lung injury, a significant decrease in the intensity of the marker (AQP5) of the more fragile AT1 cells was observed in WT/Bleo and KO/Bleo after bleomycin challenge



(23.3% and 23.7% decrease, respectively, compared to their respective controls, WT/PBS and KO/PBS). However, AQP5 remained significantly higher in KO/Bleo than in WT/Bleo mice.

3.7 Comparison of wound repair capacity of primary cultures of alveolar epithelial cell cultures from WT and KvLQT1-KO mice

Our next goal was to evaluate the effect of KvLQT1 KO on the repair capacity of ATII cells, which are progenitor cells responsible for alveolar self-renewal and repair after injury. We therefore performed wound-healing assays to determine the specific contribution of the KvLQT1 channel, by comparing the repair rates of primary alveolar epithelial cell cultures, enriched for ATII cells obtained from the lungs of WT and KO mice. We found that alveolar cell cultures from KO mice had significantly lower wound healing rates after 6 h than those from WT mice (Figure 8), indicating that KvLQT1 function is essential for optimal early repair processes after injury.

4 Discussion

Our data first confirmed that the KvLQT1 potassium (K^+) channel knockout had no major effect on parameters measured under physiological conditions (KO/PBS). As expected, bleomycin challenge in WT mice reproduced the key features of the acute exudative phase of ALI/ARDS (on day 7), with impaired respiratory function as well as an alteration of the alveolar-capillary barrier favoring infiltration of protein-rich fluid into the alveolar space,

development of an inflammatory response, and histological evidence of heterogeneous damage including large areas of severe diffuse alveolar inflammatory damage. KvLQT1 deletion exacerbated the bleomycin-induced decline in lung function. Further analysis showed that the KCNQ1 KO did not alter the edema index, but modified the profile of infiltrating immune cells and reduced lung tissue inflammation, as observed in histological sections. Finally, a reduced repair rate of the KvLQT1-KO alveolar cells was observed. Collectively, these data suggest a complex role of KvLQT1 in lung homeostasis during the development and/or the resolution of acute phase parameters of ARDS in the bleomycin ALI model.

Molecular deletion of KvLQT1 in mice produces a Shaker-Waltzer phenotype, characterized by hyperactivity (head bobbing and intermittent bidirectional circling) and loss of balance (inner ear defects) (Casimiro et al., 2001). KvLQT1-KO mice are also known to exhibit macrocytic anemia, intestinal absorption defects and enhanced insulin sensitivity (Vallon et al., 2005; Boini et al., 2009). The effects of KCNQ1 deletion on cardiac function have been extensively studied by Dr. Pfeifer's group, who described ECG abnormalities, particularly prolongation of the QTc and JT intervals and an increase in T- and P-wave area. These changes were associated with altered ventricular and atrial repolarization, but no differences in heart rate (RR interval). An increase in heart weight was also observed, but no changes in lung weight. There is no clear reason to suspect that the cardiac dysfunction could be responsible for the decline in lung compliance in KO/Bleo mice. Based on the similar water lung contents measured in WT/Bleo and KO/Bleo (Figure 4A), it is unlikely that a cardiogenic edema developed as a result of impaired heart function in KO mice, in addition to the alveolar lung edema secondary to bleomycin-induced ALI.

At baseline, our blood analysis results (Figure 1) showed no changes in electrolytes, consistent with Dr. Pfeifer's observation (Vallon et al., 2005). No major differences in blood gases or metabolites were observed, except for significantly higher lactate levels in KO vs. WT mice under physiological conditions. It can be postulated that the observed hyperactivity of KO mice, due to a Shaker-Waltzer phenotype, is responsible for increased ATP demand and subsequent increased glycogenolysis/glycolysis by muscle cells, leading to this higher lactate production. The observed maintenance of glucose levels in KO/PBS mice is probably due to the homeostatic function of the liver with *de novo* gluconeogenesis from lactate.

Although the phenotype associated with KvLQT1-KO in mice has been described for various tissues (Casimiro et al., 2001; Vallon et al., 2005; Boini et al., 2009), the impact of KCNQ1 dysfunction in the lung was unknown until recently. In one of our previous studies (Aubin Vega et al., 2023), we confirmed effective *kcnq1* extinction in lung tissue, associated with a 50% decrease in total basolateral K^+ current in respiratory epithelial cells from KO mice. In addition, no major impairment of lung function was observed at baseline, as confirmed in the present study (Figure 2; Figure 3). Furthermore, no impairment of the alveolar structure was observed in KCNQ1-KO mice under physiological conditions (Figure 6A). Healthy alveolar architecture has also been reported despite deletion of the regulatory (β) subunit of the KvLQT1 K^+ channel, KCNE2 (Zhou et al., 2019) or KCNE3 (Preston et al., 2010).

Our search for early signs of respiratory and/or multi-organ failure, as often observed in patients with severe ARDS (Kallet et al.,

2019), revealed some dysregulation of blood parameters in WT mice under pathological conditions. Bleomycin caused a simultaneous increase in $p\text{CO}_2$ and HCO_3^- in both WT/Bleo and KO/Bleo mice, although no change in pH was observed. The rise in $p\text{CO}_2$, which is relative to ineffective gas exchange, is consistent with other studies using this experimental ALI model (Shi et al., 2019; Miyamoto et al., 2022). However, our results for pH level do not replicate the changes observed in other studies using bleomycin (Shi et al., 2019; Miyamoto et al., 2022). These divergent data may be explained by the different compartments from which the blood was collected (arterial in the literature vs. venous in our study) (Shi et al., 2019; Miyamoto et al., 2022). Regarding metabolites, the marked decrease in blood glucose in WT/Bleo mice compared to their control littermates (WT/PBS) is likely related to reduced food intake as a result of bleomycin-induced debilitation (Cowley et al., 2019). In addition, a loss of (fat and muscle) mass with reduced physical activity may be related to the observed decrease in lactate levels, in both WT/Bleo and KO/Bleo mice. We also showed that the lactate levels remained higher in KO/Bleo than in WT/Bleo, thus allowing glucose levels in KO/Bleo mice to be maintained by hepatic gluconeogenesis. Our measurements also showed that the KvLQT1 deletion did not exacerbate the systemic changes induced by bleomycin. Actually, no warning signs of multiorgan failure were observed in bleomycin-treated animals (WT/Bleo and KO/Bleo), possibly because of the experimental conditions, in particular the mode of bleomycin administration (intranasal instillation, which minimizes extrapulmonary damage, compared to systemic injection), the chosen protective dose of bleomycin (which caused sufficient lung damage without mortality), and the duration of the experiment (which focused on the acute phase of ALI, i.e., day 7).

Assessment of respiratory function in both WT and KO mice (Figure 2; Figure 3) revealed that bleomycin caused an alteration in three important lung mechanical properties, namely, resistance, elastance and compliance. The findings of the present study are consistent with the literature, more specifically with those of two articles that reported a decrease in compliance in bleomycin-exposed animals (Shi et al., 2019; Miyamoto et al., 2022). We found a pronounced shift in the pressure-volume curve of KO/Bleo mice, and a concomitant decrease in compliance compared with WT/Bleo mice, as well as a significant deterioration in their respiratory system resistance and elastance. This is the first time that a worsening of these parameters, caused by KvLQT1 depletion has been demonstrated, although impairment of lung function after other types of K^+ depletion has already been reported. Indeed, Schwingshackl *et al.* showed that genetically engineered mice deficient in the K2P K^+ channels TREK-1 (Schwingshackl et al., 2014) or TREK-1/TREK-2/TRAAK (Schwingshackl et al., 2017) exhibited altered lung compliance compared to the WT mice after a short period of hypoxia followed by mechanical ventilation (double insult model).

Evaluation of the alveolar-capillary barrier function (Figure 4) showed lower endothelial permeability in KO/Bleo than in WT/Bleo mice. The mRNA expression of KCNQ1 to KCNQ5 subunits has been reported in coronary vascular tissue, but it has not been clearly defined whether KvLQT1 were expressed in smooth muscle and/or other cell types such as the endothelium (Goodwill et al., 2016). There is evidence for Kv7 expression in airway smooth cells

(Brueggemann et al., 2012); however, to our knowledge, the presence of KCNQ1/Kv7.1 channels in alveolar capillary endothelial cells has not been clearly demonstrated. Although it would have been interesting to study the role of KvLQT1 channels in the endothelial compartment, we focused our study mainly on the alveolar epithelium because of its critical role in the resolution of ALI, especially in the bleomycin model, which induces more alveolar than interstitial damage. Despite reduced endothelial permeability in KO/Bleo than in WT/Bleo mice, both WT and KO mice developed comparable protein-rich pulmonary edema (with similar levels of water lung and BALF protein contents) after exposure to bleomycin. A compensatory role of other types of K^+ channels expressed in respiratory epithelial cells (Bardou et al., 2009), which could participate to the control of ion and fluid absorption, can be postulated.

In bleomycin-exposed WT mice, we observed an increase in total immune cell numbers, mainly due to massive neutrophil infiltration, and elevated levels of pro-inflammatory cytokines/chemokines (Figure 5). Massive neutrophilic infiltration is a known phenomenon in patients with ARDS that is well reproduced in this experimental model (Matthay et al., 2019). While KO/Bleo mice had the same total number of infiltrating immune cells in BAL as WT/Bleo mice, we observed an alteration of the immune cell profile in KO/Bleo, with a lower neutrophil/macrophage ratio, while the lymphocyte levels were similar in WT/Bleo and KO/Bleo mice. Histological sections showed less congestion, while qPCR measurements indicated lower cytokine/chemokine expression levels in the total lung tissue compared to WT/Bleo mice. According to the literature, whether under physiological or pathological conditions, the effect of K^+ channel deletion on the pulmonary inflammatory response depends on the types of K^+ channels or the experimental conditions (i.e., as a function of the animal model or the time point chosen) (Schwingshackl et al., 2014; Zhou et al., 2019; Vega et al., 2020). In contrast to the present data, KCNE2-deficient mice showed elevated levels of BAL TNF- α and IL-6 compared to WT mice, under basal conditions. In TREK-1 shRNA-deficient alveolar cells exposed to hyperoxia (Schwingshackl et al., 2012), a rapid (48 h) increase in MCP-1 levels was demonstrated, whereas no changes in IL-6 and KC were observed, similar to the results of this study.

The mechanism by which KvLQT1 silencing leads to an altered immune cell profile in the presence of lung damage remains to be defined, but several hypotheses could be proposed. First, the lower endothelial permeability in KO/Bleo mice than in WT/Bleo mice, as indicated by the Evans Blue extravasation assay, could physically impede neutrophil migration. Lower levels of cytokines/chemokines acting as neutrophil chemoattractants combined with a better preserved endothelial barrier is another possible explanation for the reduced neutrophil/macrophage ratio. This hypothesis is supported by the findings of Meduri *et al.* who described in a clinical study that the reduction of BAL inflammatory cytokines was associated with an improvement in endothelial permeability indices (Meduri et al., 1995b). Furthermore, Immler *et al.* demonstrated that neutrophils lacking another type of voltage-dependant K^+ channel, Kv1.3, lose their ability to adhere and transmigrate to the alveolar lumen (Immler et al., 2022). Finally, pharmacological modulation of large conductance K^+ (BK) channels alters cytokine secretion by human pulmonary endothelial cells (Zyrianova et al., 2023). These

potential mechanisms of action may partially explain our findings, but the impact of the KvLQT1 modulation on the inflammatory response requires further investigation.

We confirmed the presence of severe epithelial inflammatory damage in the lungs of WT mice during the acute phase after bleomycin challenge (Figure 6). We observed heterogeneous inflammatory lesions and different degrees of severity depending on the lung area (with zones of healthy structure and/or inflammation). The main features observed in histological sections were cellular infiltration, congestion and thickening of the septa, culminating in deformation of the alveolar structure. KO/Bleo mice appeared to develop significantly less inflammatory damage, as indicated by the ratio of injured/inflamed parenchymal area, which remained as low as the control group (KO/PBS), or the lung injury score, which was significantly lower compared to WT/Bleo mice. Nevertheless, we noticed a significant 23% decrease in AQP5 intensity (Figure 7) in both WT/Bleo and KO/Bleo groups, suggesting that epithelial ATI cells, which are known to be fragile, were injured in the two experimental groups. In contrast, the intensity of the ATII marker pro-SPC was not altered after bleomycin exposure.

Based on our analyses of the alveolar-capillary barrier, inflammatory response and histological observation, it is questionable why the impairment of lung function after bleomycin-induced ALI is worse in KO than in WT mice. Several hypotheses could have been proposed to explain the observed aggravation of the decline in lung compliance and the concomitant increase in resistance. An exacerbation of pulmonary edema in KO/Bleo mice could have been responsible for the loss of lung function. However, the similar water lung content measured in WT/Bleo and KO/Bleo mice does not support this hypothesis. A deficiency in surfactant production could also be accountable for the altered compliance. Although the observed high levels of pro-SPC in KO mice seem to contradict this hypothesis, it cannot be completely ruled out as the actual levels of surfactant released are not known. Finally, the degree of the lung function impairment may be related to lung damage severity. However, our histological analyses showed no worsening of the injury scores in KO/bleo compared to WT/Bleo mice. A lack of correlation between lung injury scores and function decline has been reported in other studies. In a bleomycin model, Manali et al. (Manali et al., 2011) observed that lung elastance (H) and lung PV loop curve area did not correlate strongly with histological scores. Furthermore, Toumpanakis et al. (Toumpanakis et al., 2023) showed that a severe lung injury induced by direct LPS inhalation was not associated with deterioration in lung compliance and resistance.

Finally, we observed a slowdown of the repair rates after injury of KvLQT1-KO alveolar cells in the wound-healing assays (Figure 8). In a previous study from our laboratory (Trinh et al., 2007), we investigated the functional relationship between K⁺ channels, specifically KvLQT1, and growth factor signaling during alveolar epithelial migration, proliferation, and repair. There is also evidence for a possible interaction between other types of K⁺ channels and integrins or focal adhesion kinase, both of which are key players in the epithelial cell migration process (Wei et al., 2009; Girault et al., 2015; Schwingshackl et al., 2015). However, the precise mechanisms by which KvLQT1 is involved in the control of alveolar repair processes would require further investigation.

In conclusion, we used a representative *in vivo* model of ALI that mimics specific features of ARDS, such as severe lung damage, a neutrophilic inflammatory response, protein-rich fluid infiltration, and deterioration of lung compliance, to study the role of the K⁺ channel KvLQT1, in the development and resolution of the acute phase of ARDS. Our results suggest the involvement of KvLQT1 K⁺ channels in the modulation of biophysical properties of lung function, the response of immune cells in an inflammatory context, and the regulation of the epithelial repair process. These findings are of interest for a deeper understanding of the role of K⁺ channels in the pathophysiology and resolution of ARDS as well as for the development of new therapeutic strategies.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal studies were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the CRCHUM. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Author contributions

MA: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing—original draft, Writing—review and editing. AG: Conceptualization, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing—original draft, Writing—review and editing. ÉM: Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing. JC: Formal Analysis, Investigation, Writing—review and editing. AP: Investigation, Methodology, Writing—review and editing. AR: Investigation, Methodology, Resources, Writing—review and editing. DA: Formal Analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing—review and editing. EB: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing—original draft, Writing—review and editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant numbers RGPIN-2016-04378 and RGPIN-2023-04496 to EB), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant numbers MOP-111054, PJT153406 and PJT166004), CRCHUM and the Université de Montréal. MA, AG, DA, JC also acknowledge studentships/

fellowships from the NSERC (MA), the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S, MA, AG, AD, JC) and the Respiratory Health Research Network of Quebec (AG). The CRCHUM is supported by a Centre grant from the FRQ-S. The funders had no role in study design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgments

We thank the Molecular Pathology Core Facility for access and training for the use of the cryostat and microtome use. We also acknowledge Drs. Feryel Azzi and Guillaume St-Jean of the Molecular Pathology Core Facility for performing the histological analyses and the CRCHUM animal care facility. We also thank Dr. K. Pfeifer for kindly providing the J800 KvLQT1-KO mice. Finally, we thank Drs. P. Ferraro, M. Prentki, and G. Rutter for sharing some of their equipment with us.

Conflict of interest

At the time of the study, AR was employed by SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (an emka TECHNOLOGIES company),

a commercial entity with interests in a topic area related to the content of this article. AR had no decision-making role in the manuscript prior to its submission.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2024.1345488/full#supplementary-material>

References

- Adam, D., Bilodeau, C., Sognigbé, L., Maillé, É., Ruffin, M., and Brochiero, E. (2018). CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J. Cyst. Fibros.* 17, 705–714. doi:10.1016/j.jcf.2018.03.010
- ARDS Definition Task Force; Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., et al. (2012). Acute respiratory distress Syndrome The Berlin definition. *JAMA* 307 (23), 2526–2533. doi:10.1001/jama.2012.5669
- Aubin Vega, M., Chupin, C., Pascariu, M., Privé, A., Dagenais, A., Berthiaume, Y., et al. (2019). Dexamethasone fails to improve bleomycin-induced acute lung injury in mice. *Physiol. Rep.* 7, e14253. doi:10.14814/phy2.14253
- Aubin Vega, M., Chupin, C., Massé, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E. (2021). Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin. *Exp. Physiol.* 106 (4), 1110–1119. doi:10.1113/EP089060
- Aubin Vega, M., Girault, A., Adam, D., Chebli, J., Privé, A., Maillé, É., et al. (2023). Impact of KvLQT1 potassium channel modulation on alveolar fluid homeostasis in an animal model of thiourea-induced lung edema. *Front. Physiol.* 13, 1069466. doi:10.3389/fphys.2022.1069466
- Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., et al. (2012). K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1818, 1682–1690. doi:10.1016/j.bbame.2012.02.025
- Bardou, O., Trinh, N. T. N., and Brochiero, E. (2009). Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 296, L145–L155. doi:10.1152/ajplung.90525.2008
- Barkauskas, C. E., Crouce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., et al. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 123, 3025–3036. doi:10.1172/JCI68782
- Basset, G., Crone, C., and Saumon, G. (1987). Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J. Physiol.* 384, 311–324. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016456
- Bellani, G., Laffey, J. G., Pham, T., Fan, E., Brochard, L., Esteban, A., et al. (2016). Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA* 315, 788–800. doi:10.1001/jama.2016.0291
- Berthiaume, Y., Lesur, O., and Dagenais, A. (1999). Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* 54, 150–160. doi:10.1136/thx.54.2.150
- Boini, K. M., Graf, D., Hennige, A. M., Koka, S., Kempe, D. S., Wang, K., et al. (2009). Enhanced insulin sensitivity of gene-targeted mice lacking functional KCNQ1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1695–R1701. doi:10.1152/ajpregu.90839.2008
- Bos, L. D. J., and Ware, L. B. (2022). Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet* 400, 1145–1156. doi:10.1016/S0140-6736(22)01485-4
- Bosma, K. J., Taneja, R., and Lewis, J. F. (2010). Pharmacotherapy for prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome: current and experimental approaches. *Drugs* 70, 1255–1282. doi:10.2165/10898570-000000000-00000
- Brochiero, E., Dagenais, A., Prive, A., Berthiaume, Y., and Grygorczyk, R. (2004). Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287, L382–L392. doi:10.1152/ajplung.00320.2002
- Bueggemann, L. I., Kakad, P. P., Love, R. B., Solway, J., Dowell, M. L., Cribbs, L. L., et al. (2012). Kv7 potassium channels in airway smooth muscle cells: signal transduction intermediates and pharmacological targets for bronchodilator therapy. *Am. J. Physiology-Lung Cell. Mol. Physiology* 302, L120–L132. doi:10.1152/ajplung.00194.2011
- Casimiro, M. C., Grinberg, A., Huang, S. P., Pfeifer, K., Greene, A. E., Franz, M. R., et al. (2001). Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of jervell and lange-nielsen syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2526–2531. doi:10.1073/pnas.041398998
- Cowley, P. M., Roberts, C. R., and Baker, A. J. (2019). Monitoring the Health status of mice with bleomycin-induced lung injury by using body condition scoring. *Comp. Med.* 69, 95–102. doi:10.30802/AALAS-CM-18-000060
- de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods* 28 (9), 690–696. doi:10.1038/nmeth.2075
- Dobbs, L. G., Gonzalez, R., and Williams, M. (1986). An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 141–145. doi:10.1164/arrd.1986.134.1.141
- Egli, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., et al. (2004). Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J. Physiol.* 560, 857–865. doi:10.1113/jphysiol.2004.066704
- Fronius, M. (2013). Treatment of pulmonary edema by ENaC activators/stimulators. *Curr. Mol. Pharmacol.* 6, 13–27. doi:10.2174/1874467211306010003
- Girault, A., and Brochiero, E. (2013). Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 306, C307–C319. doi:10.1152/ajpcell.00226.2013

- Girault, A., Chebli, J., Privé, A., Trinh, N., Maillé, E., Grygorczyk, R., et al. (2015). Complementary roles of KCa3.1 channels and β 1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir. Res.* 16, 100. doi:10.1186/s12931-015-0263-x
- Goodman, R. B., Strieter, R. M., Martin, D. P., Steinberg, K. P., Milberg, J. A., Maunder, R. J., et al. (1996). Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 602–611. doi:10.1164/ajrccm.154.3.8810593
- Goodwill, A. G., Fu, L., Noblet, J. N., Casalini, E. D., Sasso, D., Berwick, Z. C., et al. (2016). Kv7 channels contribute to paracrine, but not metabolic or ischemic, regulation of coronary vascular reactivity in swine. *Am. J. Physiology-Heart Circulatory Physiology* 310, H693–H704. doi:10.1152/ajpheart.00688.2015
- Gotts, J. E., and Matthay, M. A. (2014). Endogenous and exogenous cell-based pathways for recovery from acute respiratory distress syndrome. *Clin. Chest Med.* 35, 797–809. doi:10.1016/j.ccm.2014.08.015
- Horie, S., McNicholas, B., Rezoagli, E., Pham, T., Curley, G., McAuley, D., et al. (2020). Emerging pharmacological therapies for ARDS: COVID-19 and beyond. *Intensive Care Med.* 46, 2265–2283. doi:10.1007/s00134-020-06141-z
- Hummeler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., et al. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* 12, 325–328. doi:10.1038/ng0396-325
- Immler, R., Nadolny, W., Bertsch, A., Morikis, V., Rohwedder, I., Masgrau-Alsina, S., et al. (2022). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates neutrophil recruitment during inflammation. *Cardiovasc Res.* 118, 1289–1302. doi:10.1093/cvr/cvab133
- Izicki, G., Segel, M. J., Christensen, T. G., Conner, M. W., and Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Path.* 83, 111–119. doi:10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x
- Kabir, K., Gelinas, J.-P., Chen, M., Chen, D., Zhang, D., Luo, X., et al. (2002). Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock* 17, 300–303. doi:10.1097/00024382-200204000-00010
- Kallet, R. H., Lipnick, M. S., Zhuo, H., Pangilinan, L. P., and Gomez, A. (2019). Characteristics of nonpulmonary organ dysfunction at onset of ARDS based on the Berlin definition. *Respir. Care* 64, 493–501. doi:10.4187/respcare.06165
- Kulkarni, H. S., Lee, J. S., Bastarache, J. A., Kuebler, W. M., Downey, G. P., Albaiceta, G. M., et al. (2022). Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American thoracic society workshop report. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 66, e1–e14. doi:10.1165/rcmb.2021.0531ST
- Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E. (2004). Molecular identity and function in transepithelial transport of KATP channels in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286, L1027–L1037. doi:10.1152/ajplung.00249.2003
- Leroy, C., Privé, A., Bourret, J., Berthiaume, Y., Ferraro, P., and Brochiero, E. (2006). Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291, L1207–L1219. doi:10.1152/ajplung.00376.2005
- Manali, E. D., Moschos, C., Triantafillidou, C., Kotanidou, A., Psallidas, I., Karabela, S. P., et al. (2011). Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulm. Med.* 31, 33. doi:10.1186/1471-2466-11-33
- Markus, B., and Qi-Xian, S. (2007). Epithelial K⁺ channels: driving force generation and K⁺ recycling for epithelial transport with physiological and clinical implications. *Sheng Li Xue Bao* 59, 443–453.
- Matthay, M., Zemans, R., Zimmerman, G., Arabi, Y., Beitler, J., Mercat, A., et al. (2019). Acute respiratory distress syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 5, 18. doi:10.1038/s41572-019-0069-0
- Matthay, M. A. (2014). Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1301–1308. doi:10.1164/rccm.201403-0535OE
- Matthay, M. A., Arabi, Y., Arroliga, A. C., Bernard, G., Bersten, A. D., Brochard, L. J., et al. (2024). A new global definition of acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 209, 37–47. doi:10.1164/rccm.202303-0558WS
- Matute-Bello, G., Downey, G., Moore, B. B., Goshong, S. D., Matthay, M. A., Slutsky, A. S., et al. (2011). An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 725–738. doi:10.1165/rcmb.2009-0210ST
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., and Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295, L379–L399. doi:10.1152/ajplung.00010.2008
- Meduri, G. U., Headley, S., Kohler, G., Stentz, F., Tolley, E., Umberger, R., et al. (1995a). Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 107, 1062–1073. doi:10.1378/chest.107.4.1062
- Meduri, G. U., Kohler, G., Headley, S., Tolley, E., Stentz, F., and Postlethwaite, A. (1995b). Inflammatory Cytokines in the BAL of Patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108, 1303–1314. doi:10.1378/chest.108.5.1303
- Miyamoto, H., Takemura, S., Minamiyama, Y., Tsukioka, T., Toda, M., Nishiyama, N., et al. (2022). Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis model by small amount of lipopolysaccharide in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 70, 129–139. doi:10.3164/jcbs.21-7
- Mokra, D., Mikolka, P., Kosutova, P., and Mokry, J. (2019). Corticosteroids in acute lung injury: the dilemma continues. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4765. doi:10.3390/ijms20194765
- Petersen, A. G., Lind, P. C., Mogensen, S., Jensen, A. B., Granfeldt, A., and Simonsen, U. (2022). Treatment with senicapoc, a KCa3.1 channel blocker, alleviates hypoxaemia in a mouse model of acute respiratory distress syndrome. *Br. J. Pharmacol.* 179, 2175–2192. doi:10.1111/bph.15704
- Preston, P., Wartosch, L., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Barhanin, J., Warth, R., et al. (2010). Disruption of the K⁺ channel beta-subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *J. Biol. Chem.* 285, 7165–7175. doi:10.1074/jbc.M109.047829
- Riviello, E. D., Buregeya, E., and Twagirumugabe, T. (2017). Diagnosing acute respiratory distress syndrome in resource limited settings: the Kigali modification of the Berlin definition. *Curr. Opin. Crit. Care* 23, 18–23. doi:10.1097/MCC.0000000000000372
- Robichaud, A., Fereydoon, L., Collins, S. L., Loube, J. M., Ishii, Y., Horton, M. R., et al. (2017). Airway compliance measurements in mouse models of respiratory diseases. *Am. J. Physiology-Lung Cell. Mol. Physiology* 321, L204–L212. doi:10.1152/ajplung.00470.2020
- Robichaud, A., Fereydoon, L., Limjunyawong, N., Rabold, R., Allard, B., Benedetti, A., et al. (2017). Automated full-range pressure-volume curves in mice and rats. *J. Appl. Physiol.* 123, 746–756. doi:10.1152/jappphysiol.00856.2016
- Ruffin, M., Bilodeau, C., Trinh, N. T. N., Beaudoin, T., Desrosiers, M.-Y., Rousseau, S., et al. (2016). Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair. *FASEB J.* 30, 3011–3025. doi:10.1096/fj.201500166R
- Sakuma, T., Takahashi, K., Ohya, N., Nakada, T., and Matthay, M. (1998). Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 16–22. doi:10.1111/j.1600-0773.1998.tb01436.x
- Schwingshackl, A., Lopez, B., Teng, B., Luellen, C., Lesage, F., Belperio, J., et al. (2017). Hyperoxia treatment of TREK-1/TREK-2/TRAAK-deficient mice is associated with a reduction in surfactant proteins. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 313, L1030–L1046. doi:10.1152/ajplung.00121.2017
- Schwingshackl, A., Roan, E., Teng, B., and Waters, C. M. (2015). TREK-1 regulates cytokine secretion from cultured human alveolar epithelial cells independently of cytoskeletal rearrangements. *PLoS One* 10, e0126781. doi:10.1371/journal.pone.0126781
- Schwingshackl, A., Teng, B., Ghosh, M., Lim, K. G., Tigyi, G., Narayanan, D., et al. (2013a). Regulation of interleukin-6 secretion by the two-pore-domain potassium channel Trek-1 in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 304, L276–L286. doi:10.1152/ajplung.00299.2012
- Schwingshackl, A., Teng, B., Ghosh, M., and Waters, C. M. (2013b). Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 secretion by the Two-Pore-Domain Potassium (K2P) channel TREK-1 in human alveolar epithelial cells. *Am. J. Transl. Res.* 5, 530–542.
- Schwingshackl, A., Teng, B., Ghosh, M., West, A. N., Makena, P., Gorantla, V., et al. (2012). Regulation and function of the two-pore-domain (K2P) potassium channel Trek-1 in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 302, L93–L102. doi:10.1152/ajplung.00078.2011
- Schwingshackl, A., Teng, B., Makena, P., Ghosh, M., Sinclair, S. E., Luellen, C., et al. (2014). Deficiency of the two-pore-domain potassium channel TREK-1 promotes hyperoxia-induced lung injury. *Crit. Care Med.* 42, e692–e701. doi:10.1097/CCM.0000000000000603
- Shi, Y., Dong, M., Zhou, Y., Li, W., Gao, Y., Han, L., et al. (2019). Distal airway stem cells ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 161. doi:10.1186/s13287-019-1257-2
- Silva, P. L., Pelosi, P., and Rocco, P. R. (2020). Personalized pharmacological therapy for ARDS: a light at the end of the tunnel. *Expert Opin. Investigational Drugs* 29, 49–61. doi:10.1080/13543784.2020.1699531
- Tan, J. J., Boudreaux, F., Adam, D., Brochiero, E., and Grygorczyk, R. (2020). Type 2 secretory cells are primary source of ATP release in mechanically stretched lung alveolar cells. *Am. J. Physiology-Lung Cell. Mol. Physiology* 318, L49–L58. doi:10.1152/ajplung.00321.2019
- Toumpanakis, D., Glynos, C., Schoini, P., Vassilakopoulou, V., Chatzianastasiou, A., Dettoraki, M., et al. (2023). Synergistic effects of resistive breathing on endotoxin-induced lung injury in mice. *COPD* 18, 2321–2333. doi:10.2147/COPD.S424560
- Trinh, N. T. N., Bardou, O., Privé, A., Maillé, E., Adam, D., Lingée, S., et al. (2012). Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur. Respir. J.* 40, 1390–1400. doi:10.1183/09031936.00221711
- Trinh, N. T. N., Prive, A., Kheir, L., Bourret, J.-C., Hijazi, T., Amraei, M. G., et al. (2007). Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293, L870–L882. doi:10.1152/ajplung.00362.2006

Vallon, V., Grahmmer, F., Volkl, H., Sandu, C. D., Richter, K., Rexhepaj, R., et al. (2005). KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17864–17869. doi:10.1073/pnas.0505860102

Vega, G., Guequén, A., Philp, A. R., Gianotti, A., Arzola, L., Villalón, M., et al. (2020). Lack of *Kcnn4* improves mucociliary clearance in muco-obstructive lung disease. *JCI Insight* 5, e140076. doi:10.1172/jci.insight.140076

Wei, J., Wei, L., Zhou, X., Lu, Z., Francis, K., Hu, X., et al. (2009). Formation of kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility. *J. Cell Physiol.* 217, 544–557. doi:10.1002/jcp.21530

Zhou, L., Köhncke, C., Roepke, T., and Abbott, G. (2019). The KCNE2 potassium channel β subunit is required for normal lung function and resilience to ischemia and reperfusion injury. *FASEB J.* 33, 9762–9774. doi:10.1096/fj.201802519R

Zyrianova, T., Lopez, B., Olcese, R., Belperio, J., Waters, C., Wong, L., et al. (2020). K2P2.1 (TREK-1) potassium channel activation protects against hyperoxia-induced lung injury. *Sci. Rep.* 10, 22011. doi:10.1038/s41598-020-78886-y

Zyrianova, T., Zou, K., Lopez, B., Liao, A., Gu, C., Olcese, R., et al. (2023). Activation of endothelial large conductance potassium channels protects against TNF- α -induced inflammation. *IJMS* 24, 4087. doi:10.3390/ijms24044087