

Université de Montréal

**Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC dans les
cellules épithéliales alvéolaires**

Détermination du rôle des séquences 3' non traduites

par

Francis Migneault

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en Sciences biomédicales

Décembre 2014

© Francis Migneault, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC dans les
cellules épithéliales alvéolaires
Détermination du rôle des séquences 3' non traduites**

Présentée par :
Francis Migneault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Rémy Sauvé, président-rapporteur
Dr Yves Berthiaume, directeur de recherche
Dr André Dagenais, codirecteur de recherche
Dr Pascal Chartrand, membre du jury
Dr Ahmed Chraïbi, examinateur externe
Dr Emmanuelle Brochiero, représentante de la doyenne de la FESP

Résumé

Le transport actif de sodium par les cellules épithéliales alvéolaires est le principal mécanisme impliqué dans la régulation du niveau de liquide dans le poumon distal. Le canal épithélial sodique (ENaC) exprimé par les cellules épithéliales alvéolaires est essentiel à la résorption du liquide des poumons à la naissance ainsi que la résolution de l'œdème pulmonaire chez l'adulte. L'activité et l'expression du canal ENaC sont modulées par de nombreux stress pathophysiologiques. L'inflammation pulmonaire constitue un facteur important dans l'inhibition de l'expression du canal ENaC et pourrait favoriser la formation d'œdème pulmonaire. Nous avons précédemment démontré que différentes cytokines pro-inflammatoires, ainsi que les lipopolysaccharides (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, inhibent l'expression de l'ARNm α ENaC par des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Ces résultats suggèrent que les mécanismes qui modulent la stabilité des ARNm α ENaC pourraient jouer un rôle important dans la régulation du niveau d'expression du transcrit en condition inflammatoire.

Le principal objectif de mes travaux était de caractériser les mécanismes de modulation de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires lors de différents stress pathophysiologiques et déterminer si cette modulation pouvait s'expliquer en partie par une régulation de la stabilité du transcrit. Mes travaux montrent que les LPS et la cycloheximide inhibent l'expression de l'ARNm α ENaC de façon similaire via l'activation des voies de signalisation des MAPK ERK1/2 et p38. Cependant, les mécanismes de modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC sont différents puisque les LPS répriment la transcription du gène, alors que la cycloheximide diminuerait la stabilité du transcrit via des mécanismes post-transcriptionnels impliquant la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC. Pour mieux étudier le rôle du 3'UTR dans ce processus, nous avons développé un modèle Tet-Off nous permettant de mesurer la demi-vie de l'ARNm α ENaC indépendamment de l'utilisation d'un inhibiteur de la transcription comme l'actinomycine D (Act. D). Nous avons montré que la demi-vie de l'ARNm α ENaC était de 100min, un temps beaucoup plus court que celui rapporté dans la littérature. Nous avons démontré que l'Act. D a un effet stabilisateur important sur l'ARNm α ENaC et qu'il ne peut être utilisé pour évaluer la stabilité du transcrit.

À l'aide de différents mutants de délétion, nous avons entrepris de déterminer la nature des régions du 3'UTR impliquées dans la modulation de la stabilité du transcrit. Nous avons trouvé que le 3'UTR joue un rôle à la fois de stabilisation (région 3'UTR proximale) et de déstabilisation (région 3'UTR distale) du transcrit. Notre système nous a finalement permis de confirmer que la diminution de l'ARNm α ENaC observée en présence de TNF- α s'expliquait en partie par une diminution importante de la stabilité du transcrit induite par cette cytokine. Enfin, nous avons identifié la nature des protéines pouvant se lier au 3'UTR de l'ARNm α ENaC et déterminé lesquelles pouvaient moduler la stabilité du transcrit. Des trois protéines candidates trouvées, nous avons confirmé que la surexpression de DHX36 et TIAL1 diminue le niveau de transcrit par un mécanisme impliquant la stabilité du messenger.

Les travaux présentés ici montrent la complexité des voies de signalisation induites par différents stress sur les cellules épithéliales alvéolaires et montrent comment la stabilité de l'ARNm α ENaC et en particulier, les séquences du 3'UTR jouent un rôle important dans la modulation du niveau de transcrit. Le modèle Tet-Off que nous avons développé permet d'estimer le temps de demi-vie réel de l'ARNm α ENaC et montre que le 3'UTR du messenger joue un rôle complexe dans la stabilisation du messenger en condition de base ainsi qu'en condition pro-inflammatoire. Enfin, nous avons identifié deux protéines liant l'ARNm qui pourraient jouer un rôle important dans la modulation de la stabilité du transcrit.

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

Abstract

The epithelial sodium channel (ENaC) expressed in alveolar epithelial cells plays a major role for lung liquid clearance at birth and lung edema resorption in adulthood. The expression and activity of ENaC are inhibited by many pathophysiological stress that could have an impact in the clinical outcome of acute respiratory distress syndrome (ARDS). Pulmonary inflammation is an important factor in this inhibition that may promote or sustain pulmonary edema. We have previously shown that pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide (LPS) from *Pseudomonas aeruginosa* inhibit α ENaC mRNA expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms, suggesting that a modulation of α ENaC mRNA stability could play a role in this process.

The main objective of the present work was to characterize how different pathophysiological stress affect α ENaC mRNA expression in alveolar epithelial cells and determine whether this modulation could be explained in part by regulating the stability of the transcript. Our study shows that LPS and cycloheximide decrease the level of α ENaC mRNA with a similar time course and via the activation of the MAPK ERK1/2 and p38 signaling pathways. Despite similarities, there were important differences in the mechanisms involved in the modulation of α ENaC mRNA expression. While LPS repress α ENaC mRNA transcription, cycloheximide triggers post-transcriptional mechanisms involving the 3' untranslated region (3'UTR) of α ENaC mRNA. To further study the role of α ENaC 3'UTR in this process, we developed a Tet-Off model that allows us to measure the half-life of α ENaC mRNA regardless of the use of a transcription inhibitor such as actinomycin D (Act. D). Using this system, we showed a 100 min half-life for α ENaC mRNA, a much shorter time then the one reported for this mRNA using Act. D. We showed that Act. D has an important stabilizing effect on α ENaC mRNA and cannot be used to assess the stability of the transcript. Using deletion mutants of the α ENaC 3'UTR region, we determined how different portions of 3'UTR were important in modulating stability of the transcript. We found that the 3'UTR has dual functions, with portions important to promote stabilization (proximal 3'UTR) and others that strongly destabilize (distal 3'UTR) the transcript. Our system also allowed us to confirm that the decreased expression of α ENaC mRNA induced by TNF- α results in part by a decreased

stability of the mRNA. Finally, we identified several RNA-binding proteins that interact specifically with α ENaC 3'UTR and determined if these proteins had an impact on transcript stability. Surexpression of two of these proteins in alveolar epithelial cells, DHX36 and TIAL1 was able to decrease the level of α ENaC mRNA via a downregulation of mRNA stability.

The work presented here shows the complexity of the signal transduction pathways elicited by different pathological stress conditions in alveolar epithelial cells and is the first to show that α ENaC mRNA stability elicited by sequences in 3'UTR plays an important role in modulating the level of the transcript. The Tet-Off model that we developed allows to accurately estimate the half-life of α ENaC mRNA and shows that the 3'UTR portion of the mRNA plays a complex role in the modulation of transcript stability in basal and pro-inflammatory conditions. Finally, we identified two putative RNA-binding proteins able to specifically recognize α ENaC 3'UTR and modulate the transcript stability.

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

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des équations.....	xi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Description de l'appareil respiratoire.....	1
1.1.1. Voies respiratoires supérieures.....	2
1.1.2. Voies respiratoires inférieures.....	2
1.1.2.1. Parenchyme pulmonaire.....	2
1.1.3. L'épithélium de l'appareil respiratoire.....	4
1.1.3.1. L'épithélium alvéolaire.....	5
1.2. Le syndrome de détresse respiratoire aigu.....	7
1.2.1. Définition et épidémiologie.....	7
1.2.2. Pathophysiologie.....	8
1.3. L'homéostasie liquidienne.....	10
1.3.1. Les canaux sodiques.....	11
1.3.2. Les canaux chlorures.....	12
1.3.3. Les canaux potassiques.....	13
1.3.4. Le canal épithélial sodique ENaC.....	14
1.4. Réponse au stress suite à des lésions pulmonaires.....	15
1.4.1. Stress pathophysiologiques.....	15
1.4.2. Voies de signalisation classiques.....	20
1.4.2.1. Le module MAPK ERK1/2.....	22
1.4.2.2. Le module MAPK p38.....	24
1.4.2.3. Le module MAPK JNK1/2/3.....	26
1.4.2.4. Le module MAPK ERK5.....	26

1.4.2.5. Seuil limite.....	27
1.4.2.6. Activation transitoire vs soutenue.....	27
1.4.2.7. MAPKAPK (MAPK activated protein kinases)	28
1.5. Modulation de l'activité et de l'expression du canal ENaC	29
1.5.1. Modulation de l'activité du canal	29
1.5.2. Modulation transcriptionnelle.....	31
1.5.2.1. Élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE)	32
1.5.2.2. Élément de réponse à l'AMPc (CRE).....	34
1.5.2.3. Dot1a/AF9 – Aldostérone.....	35
1.5.2.4. Autres modulations transcriptionnelles.....	36
1.5.3. Modulation post-transcriptionnelle.....	36
1.5.3.1. Modulation de la traduction.....	37
1.5.3.2. Épissage alternatif.....	38
1.5.3.3. Modulation de la stabilité.....	38
1.6. Modulation de la stabilité de l'ARNm.....	39
1.6.1. Définition de la demi-vie d'un ARNm	39
1.6.2. Techniques de mesure de la stabilité	41
1.6.2.1. « Pulse-chase » d'UTP modifiés.....	41
1.6.2.2. Inhibiteurs de la transcription	43
1.6.2.3. Système d'induction transcriptionnelle.....	44
1.6.2.3.1. Promoteur c-fos induit par le sérum.....	44
1.6.2.3.2. Promoteur Tet-Off/On	45
1.6.3. Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm.....	46
1.6.3.1. Modulation de la stabilité.....	47
1.6.3.1.1. miARNs	47
1.6.3.1.2. Stabilité et dégradation des ARNm interagissant avec les protéines liant l'ARN.....	49
1.6.3.1.3. Structures secondaires de l'ARN	52
1.6.3.2. Modulation de la traduction.....	53
1.6.3.2.1. miARNs	53
1.6.3.2.1. Protéines liant l'ARN.....	54

1.6.3.3. Impact du stress inflammatoire sur la modulation de la stabilité et de la traduction d'ARNm par le 3'UTR	55
1.7. Hypothèse et Objectifs	57
1.7.1. Hypothèse de recherche	58
1.7.2 Objectif général.....	58
1.7.3. Objectifs spécifiques.....	58
1.7.3.1. Objectif no.1	58
1.7.3.2. Objectif no.2	59
1.7.3.3. Objectif no.3	59
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	60
2.1. Chirurgie	60
2.2. Isolation des cellules épithéliales alvéolaires et culture cellulaire.....	61
2.3. Réactifs	62
2.4. Vecteurs et Clones	62
2.5. Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse semi-quantitative (RT-PCR).....	64
2.6. Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR)	65
2.7. Détection de l'activité des caspases 3/7.....	68
2.8. Détection de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)	68
2.9. Immunobuvardage de type Western	69
2.10. Transfection transitoire des cellules épithéliales alvéolaires	71
2.11. Détection de l'activité luciférase	71
2.12. Développement du système Tet-Off.....	73
2.13. Isolation de protéines liant l'ARNm α ENaC par chromatographie d'affinité	74
2.13.1. Synthèse de l'ARN biotinylé	74
2.13.2. Immobilisation de l'ARN biotinylé sur les billes magnétiques.....	75
2.13.3. Préparation de l'extrait protéique et isolation des protéines liant l'ARN.....	75
2.13.4. Identification des protéines isolées par spectrométrie de masse.....	76
2.14. Isolation de l'ARNm α ENaC par chromatographie d'affinité à l'aide de protéines chimériques GST	77

2.14.1. Synthèse de protéines liant l'ARN.....	77
2.14.2. Immobilisation des protéines GST-hnRNPk sur les billes magnétiques	78
2.14.3. Isolation des ARN liant la protéine hnRNPk.....	78
2.14.4. Mesure de l'enrichissement de l'ARNm α ENaC.....	78
2.15. Analyses statistiques	79
Chapitre 3 : Résultats	80
3.1. Modulation de l'ARNm α ENaC par différents stress.....	80
3.1.1. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS	80
3.1.2. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC de façon « dose-dépendante » par la cycloheximide	82
3.1.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par l'émétine.....	84
3.1.4. Effet de la cycloheximide et des LPS sur la mort cellulaire causée par apoptose et par nécrose	85
3.1.5. Modulation des voies de signalisation par la cycloheximide et les LPS	88
3.1.6. Induction d'un stress inflammatoire par la cycloheximide.....	92
3.1.7. Effet de l'inhibition des MAPK ERK1/2, p38 et JNK1-2/3 sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.....	93
3.1.8. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par la cycloheximide et les LPS...	96
3.1.9. Impact de l'inhibition de la transcription sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS	99
3.1.10. Impact de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de l'activité luciférase par la cycloheximide et les LPS	101
3.2. Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de sa stabilité.....	103
3.2.1. Implication du 3'UTR α ENaC.....	103
3.2.2. Modulation de l'ARNm α ENaC par la doxycycline.....	105
3.2.3. Mesure de la stabilité de l'ARNm α ENaC à l'aide du système Tet-Off.....	106
3.2.4. Impact de l'inhibition de la transcription sur la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC.....	107
3.2.5. Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par différents stress cellulaires et inflammatoires	109

3.2.6. Caractérisation de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC	111
3.2.6.1. Identification des régions conservées dans le 3'UTR.....	111
3.2.6.2. Modulation de la stabilité de l'ARNm des mutants de délétion	114
3.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN.....	119
3.3.1. Identification de protéines liant la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC	119
3.3.2. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN...	125
3.3.3. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par les protéines liant l'ARN	127
3.3.4. Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN.....	129
Chapitre 4 : Discussion	131
4.1. Modulation de l'ARNm α ENaC par différents stress.....	131
4.1.1. Rationnelle	131
4.1.2. Modulation de l'ARNm par la cycloheximide et les LPS.....	132
4.1.3. Rôle de la traduction dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide.....	132
4.1.4. Impact de la cycloheximide et des LPS sur la survie cellulaire.....	134
4.1.5. Implication des voies de signalisations dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.....	135
4.1.5.1. Activation des voies de signalisation par la cycloheximide et les LPS	135
4.1.5.2. Rôle des voies de signalisation dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.....	137
4.1.6. Mécanisme de modulation de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS	140
4.1.6.1. Modulation transcriptionnelle.....	140
4.1.6.2. Modulation post-transcriptionnelle.....	142
4.1.7. Conclusion	143
4.2. Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de sa stabilité.....	145
4.2.1. Rationnelle	145
4.2.2. Impact de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC	145
4.2.3. Mesure de la stabilité de l'ARNm α ENaC à l'aide du système Tet-Off.....	146
4.2.3.1. Mise au point du modèle Tet-Off dans les cellules épithéliales alvéolaires ..	146
4.2.3.2. Détermination de la demi-vie de l'ARNm α ENaC avec le système Tet-Off.	148

4.2.3.3. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC par différents stress	150
4.2.4. Caractérisation de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC	152
4.2.5. Conclusion	160
4.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN.....	161
4.3.1. Rationnelle	161
4.3.2. Identification des protéines liant le 3'UTR de l'ARNm α ENaC	162
4.3.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN...	163
4.3.3.1. hnRNP K.....	164
4.3.3.2. DHX36.....	166
4.3.3.3. TIAL1	168
4.3.3.4. Collaboration des protéines liant l'ARN	170
4.3.4. Conclusion	171
Chapitre 5 : Conclusion et Perspectives.....	173
Bibliographie.....	175
Annexes.....	205

Liste des équations

Équation 1. Taux de transcription de l'ARNm	40
Équation 2. Taux de dégradation de l'ARNm	40
Équation 3. Demi-vie d'un ARNm.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1. Types de cellules épithéliales retrouvées dans les voies aériennes proximales.	4
Tableau 2. Critères pour le diagnostic du syndrome de détresse respiratoire aigu.	7
Tableau 3. Les fonctions biologiques et les substrats des MAPKAPK.	28
Tableau 4. Estimation de la demi-vie de l'ARNm αENaC.	39
Tableau 5. Nomenclatures des différentes constructions	63
Tableau 6. Oligonucléotides utilisés pour le RT-PCR semi-quantitatif	64
Tableau 7. Oligonucléotides utilisés pour le RT-PCR en temps réel	67
Tableau 8. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les protéines étudiées.	70
Tableau 9. Oligonucléotides utilisés pour la synthèse de la matrice d'ADN.	74
Tableau 10. Combinaison des plasmides utilisés pour l'étude de la modulation de la stabilité de l'ARNm αENaC	129

Liste des figures

Figure 1. L'appareil respiratoire.....	1
Figure 2. La zone alvéolo-capillaire.	3
Figure 3. Schématisation des différents types de cellules épithéliales.....	5
Figure 4. Représentation d'une alvéole durant la phase aiguë du SDRA.....	9
Figure 5. Canaux et transporteurs impliqués dans le transport ionique alvéolaire.	11
Figure 6. Structure d'une sous-unité d'ENaC.....	15
Figure 7. Les différentes cascades de signalisation.....	21
Figure 8. Module MAPK ERK1/2.....	23
Figure 9. Module MAPK p38.....	25
Figure 10. Système d'induction transcriptionnelle Tet-Off et Tet-On.....	45
Figure 11. Structure en tige-boucle.....	48
Figure 12. Mécanisme de compétition/coopération dans la modulation de la stabilité d'ARNm possédant des séquences ARE et GURE.....	51
Figure 13. Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR).....	66
Figure 14. Système de contrôle transcriptionnel Tet-Off avec V5- α ENaC.....	73
Figure 15. Isolation des protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité.....	76
Figure 16. Isolation de l'ARNm α ENaC liant des protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité.....	77
Figure 17. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.....	81
Figure 18. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC de façon « dose-dépendante » par la cycloheximide.....	83
Figure 19. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par l'émétine.....	84
Figure 20. Effet de la cycloheximide et des LPS sur l'activité des caspases 3 et 7.....	86
Figure 21. Effet de la cycloheximide et des LPS sur la libération de la LDH.....	87
Figure 22. Activation de la voie de signalisation des MAPK ERK par la cycloheximide et les LPS.....	89

Figure 23. Activation de la voie de signalisation de la MAPK P38 par la cycloheximide et les LPS.....	90
Figure 24. Activation de la voie de signalisation des SAPK JNK1-2/3 par la cycloheximide et les LPS.	91
Figure 25. Modulation de l'expression des ARNm des cytokines IL-1α, IL-1β et TNF-α.....	92
Figure 26. Effets des inhibiteurs de MAPK sur la modulation de l'expression de l'ARNm αENaC par la cycloheximide.....	94
Figure 27. Effets des inhibiteurs de MAPK sur la modulation de l'expression de l'ARNm αENaC par les LPS.	95
Figure 28. Modulation de l'activité du promoteur αENaC par la cycloheximide et les LPS.	97
Figure 29. Effet des inhibiteurs des MAPK sur la modulation de l'activité du promoteur αENaC par la cycloheximide et les LPS.....	98
Figure 30. Effet de l'inhibition de la transcription sur la modulation de l'expression de l'ARNm αENaC par la cycloheximide et les LPS.	100
Figure 31. Modulation de l'activité luciférase de chimères Luciférase formées de différentes portions de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm αENaC.....	102
Figure 32. Modulation de l'expression de chimères Luciférase composées de différentes portions du 3'UTR αENaC.	104
Figure 33. Modulation de l'ARNm αENaC par la doxycycline.....	105
Figure 34. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC avec le système Tet-Off..	106
Figure 35. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC par l'actinomycine D.	108
Figure 36. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC par différents stress cellulaires et inflammatoires.....	110
Figure 37. Identification de séquences conservées entre différentes espèces, présentes dans la région 3' non traduite de l'ARNm αENaC.....	112
Figure 38. Production de mutants de délétion dans la région 3' non traduite de l'ARNm αENaC.....	113
Figure 39. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC – Mutant de délétion 1..	115
Figure 40. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC – Mutant de délétion 2..	116
Figure 41. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC – Mutant de délétion 3..	117

Figure 42. Modulation de la demi-vie des mutants de délétion de la région 3' non traduite de l'ARNm V5-αENaC.	118
Figure 43. Isolation de protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité à l'aide du 3'UTR αENaC.	121
Figure 44. Identification des protéines liant le 3'UTR de l'ARNm αENaC par spectrométrie de masse.	122
Figure 45. Confirmation de l'identification des protéines liant l'ARN associées au 3'UTR αENaC.	123
Figure 46. Enrichissement de l'ARNm αENaC par la protéine hnRNPK par chromatographie d'affinité GST.	124
Figure 47. Surexpression des protéines DHX36, hnRNPK et Tial1 dans les cellules épithéliales alvéolaires	125
Figure 48. Modulation de l'expression de l'ARNm αENaC par des protéines liant l'ARN	126
Figure 49. Modulation de l'activité du promoteur αENaC par des protéines liant l'ARN	128
Figure 50. Modulation de la stabilité de l'ARNm αENaC par des protéines liant l'ARN	130
Figure 51. Modèle proposé pour la modulation de l'ARNm αENaC par la cycloheximide et les LPS.	144
Figure 52. Techniques de mesure de la stabilité de l'ARNm αENaC suite au traitement au TNF-α.	151
Figure 53. Modèle proposé pour la modulation de la stabilité de l'ARNm αENaC par la cycloheximide et le TNF-α.	156
Figure 54. Représentation de complexes ribonucléoprotéiques permettant la formation de granules de stress et de « Processing bodies ».	159
Figure 55. Modèle proposé pour la modulation de l'expression de l'ARNm αENaC par les protéines liant l'ARN.	172

Liste des abréviations

3'UTR	séquence 3' non traduite
5'UTR	séquence 5' non traduite
Act. D	actinomycine D
ADN	acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	protéine kinase B
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARE	élément riche en adénine et uridine (<i>AU-rich element</i>)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATI	cellule épithéliale alvéolaire de type I (<i>alveolar epithelial type I cell</i>)
ATII	cellule épithéliale alvéolaire de type II (<i>alveolar epithelial type II cell</i>)
ATP	adénosine triphosphate
AUF	protéine liant l'élément ARE (<i>AU-rich element RNA-binding protein</i>)
C/EBP	protéine inductrice liant la séquence CCAAT (<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>)
CFTR	régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
Chx	cycloheximide
Cl	chlore
CLC	canal chlore (<i>chloride channel</i>)
CNG1	canal cationique GMPC-dépendant (<i>cGMP-gated cation channel</i>)
CNOT	complexe de transcription CCR4-NOT (<i>CCR4-NOT transcription complex</i>)
Cox	cyclo-oxygénase
CPEB	protéine liant l'élément cytoplasmique de polyadénylation (<i>cytoplasmic polyadenylation element binding protein</i>)
CREB	protéine se fixant à l'élément de réponse à l'AMPc (<i>cAMP Response Element-binding protein</i>)
CUGBP	protéine liant les triplets CUG (<i>CUG triplet repeat, RNA binding protein</i>)
CURE	élément riche en cytosine et uridine (<i>CU-rich element</i>)

DHX36	protéine 36 à boîte DEAH (<i>DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36</i>)
DRB	5,6-dichloro-1b-1-ribofuranosylbenzimidazole
eIF	facteur eucaryote de démarrage de la traduction (<i>eukaryotic translation initiation factor</i>)
ENaC	canal épithélial sodique (<i>epithelial sodium channel</i>)
eNOS	oxyde nitrique synthase endothéliale (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ETS	facteur de transcription spécifique à E26 (<i>E26 transformation-specific</i>)
ETV	variant ETS (<i>ETS variant</i>)
FISH	hybridation in situ en fluorescence (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
GRE	élément de réponse aux glucocorticoïdes (<i>glucocorticoids-response element</i>)
GST	glutathion S-transférase
GURE	élément riche en guanine et uridine (<i>GU-rich element</i>)
H	hydrogène
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HCO₃⁻	anion bicarbonate
HDAC	histone désacétylase
hnRNP	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>)
HSC	canal hautement sélectif au sodium (<i>highly selective sodium channel</i>)
Hsp70	protéine de choc thermique 70 (<i>heat-shock protein 70</i>)
HuR	antigène humain R (<i>human antigen R</i>)
IgG	immunoglobulines de type G
IL-X	interleukine
iNOS	oxyde nitrique synthase inductible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IRE	élément de réponse au fer (<i>iron responsive element</i>)
JNK	kinase N-terminal c-Jun (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
K	potassium
KCC	cotransporteur potassium et chlorure (<i>potassium chloride cotransporter</i>)
KH	domaines d'homologie K

KNS	domaine de translocation nucléaire hnRNP K (<i>hnRNP K nuclear shuttling domain</i>)
LDH	lactate déshydrogénase
LPS	lipopolysaccharides
MAPK	protéine kinase mitogène-activée (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MAPKAPK	protéine kinase activée par la MAPK (<i>MAP Kinase Activated Protein Kinase</i>)
mCDD	cellules du tube collecteur cortical de la souris (<i>Mouse Cortical Collecting Duct</i>)
MDCK	cellules rénales de chien de la lignée Madin-Darby (<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>)
miARN	microARN
MSK	kinase mitogène- et stress- activé (<i>mitogen- and stress-activated kinase</i>)
Na	sodium
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NF-κB	facteur nucléaire κB (<i>nuclear factor κB</i>)
NO	oxyde nitrique
NPPB	acide benzoïque 5-nitro-2-(3-phénylpropylamine)
NSC	canal cationique non sélectif (<i>non-selective cation channel</i>)
O₂⁻	anion superoxyde
PABP	protéine liant les séquences polyA (<i>poly (A)-binding protein</i>)
PARN	ribonucléase spécifique à la queue polyA (<i>Poly(A)-specific ribonuclease</i>)
PB	corps processifs (<i>processing bodies ou P-bodies</i>)
PC12	lignée cellulaire de phéochromocytome (<i>Pheochromocytoma Cell Line 12</i>)
PCR	réaction d'amplification par polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP₂	phosphatidylinositol-4, 5-diphosphate
PIP₃	phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKC	protéine kinase C
PUM	protéine pumilio
RA	récepteur aux androgènes

Raf	fibrosarcome rapidement accéléré (<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
Ras	petite GTPase de sarcome de rat (<i>Rat sarcoma small GTPase</i>)
RBP	protéine liant l'ARN (<i>RNA-binding protein</i>)
RCK/DDX6	hélicase 6 à boîte DEAD (<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6</i>)
RHAU	hélicase à ARN associée avec les éléments riche en adénine et uridine (<i>RNA helicase associated with AU-rich element</i>)
RISC	complexe de silençage induit par l'ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
ROS	dérivés réactifs de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RRM	motif de reconnaissance de l'ARN (<i>RNA recognition motif</i>)
RSM	motif spécifique à RHAU (<i>RHAU-specific motif</i>)
RT-qPCR	réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (<i>Real-time reverse transcription PCR</i>)
SAPK	protéine kinase activée par le stress (<i>Stress-activated protein kinase</i>)
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aigu
SG	granules de stress (<i>stress granule</i>)
Sgk	kinase régulée par le sérum et les glucocorticoïdes (<i>serum and glucocorticoid-regulated Kinase</i>)
SP1	protéine de spécificité 1 (<i>specificity protein 1</i>)
SVF	sérum de veau fœtal
TBP	protéine liant la boîte TATA (<i>TATA-binding protein</i>)
TCR	récepteur des cellules T (<i>T-cell antigen receptor</i>)
TGF	facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor</i>)
TIA1	antigène-1 intracellulaire à cellule T (<i>T-cell intracellular antigen-1</i>)
TIAL1	protéine TIA1-like (<i>TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1</i>)
TLR	récepteur Toll-like (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	facteur de nécrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TP53	protéine tumorale p53 (<i>tumor protein p53</i>)
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
TTP	tristétraproline
Xrn1	5'-3' exoribonucléase 1

« Ce qui est maintenant prouvé ne fut jadis qu'imaginé. »

William Blake

Extrait de Le mariage du Ciel et de l'Enfer

« La vraie science est une ignorance qui se sait. »

Michel De Montaigne

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury, le Dr Rémy Sauvé, le Dr Pascal Chartrand, le Dr Ahmed Chraïbi et la Dr Emmanuelle Brochiero d'avoir accepté de corriger ma thèse en un laps de temps si court.

Je voudrais également remercier Dr Yves Berthiaume d'avoir été un directeur de recherche aussi exceptionnel. Votre compréhension et votre incroyable humanité envers les membres de votre laboratoire sont des exemples à suivre pour nous tous. Merci pour votre confiance tout au long de cette aventure ainsi que de l'indépendance que vous m'avez offerte pour l'accomplissement de mon projet.

Un merci tout particulier à André de m'avoir reçu à maintes reprises à son bureau dans mes moments d'incertitude et lorsque rien ne fonctionnait. Un grand merci pour le temps passé à réviser mes textes et cette thèse. Je n'oublierai pas nos multiples discussions plus ou moins scientifiques qui se sont généralement conclues par: « toute est dans toute ! » et « y'a pas juste ENaC dans vie ! ». Merci d'avoir été un super codirecteur, un mentor, mais surtout un grand ami.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire qui ont fait de ces années une expérience incroyable sur le plan professionnel, mais surtout humain. Je crois sincèrement que nous sommes plus qu'une super « team », nous sommes une famille. Un merci particulier à Chantal, Guillaume et Mihai pour votre support, votre bonne humeur et pour tous ces fous rires. Vous m'avez permis, chacun à votre façon, d'accomplir ce doctorat. J'espère que nous pourrons tous rester « *de maingne* » dans le futur!

Bien sûr, je ne pourrais terminer sans remercier toute ma famille et ma belle-famille qui ont été présentes tout au long de cette aventure. Merci pour vos encouragements, votre soutien et de m'avoir écouté discuter de mon projet, malgré votre totale incompréhension!

Enfin, à Joanie, ma merveilleuse femme, ma meilleure amie et future maman de notre petit garçon, je ne pourrais transmettre en de simples mots tout ce que je ressens pour toi. Tu as toujours cru en moi, tu m'as encouragé dans les moments difficiles et je ne serais pas l'homme que je suis aujourd'hui sans toi. Pour tout et plus encore, merci et je t'aime!

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Description de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire joue un rôle vital pour l'organisme en assurant les fonctions respiratoires via les échanges gazeux. Celles-ci permettent l'aspiration de l'air, le transport de l'oxygène vers les organes et les tissus, ainsi que le rejet du dioxyde de carbone. L'appareil respiratoire débute au niveau de la bouche et du nez, pour se terminer dans les alvéoles pulmonaires. Les voies respiratoires qui permettent le passage de l'air entre l'extérieur et les poumons composent l'appareil respiratoire et sont divisées en deux sections : les voies respiratoires supérieures et les voies respiratoires inférieures [Figure 1A].

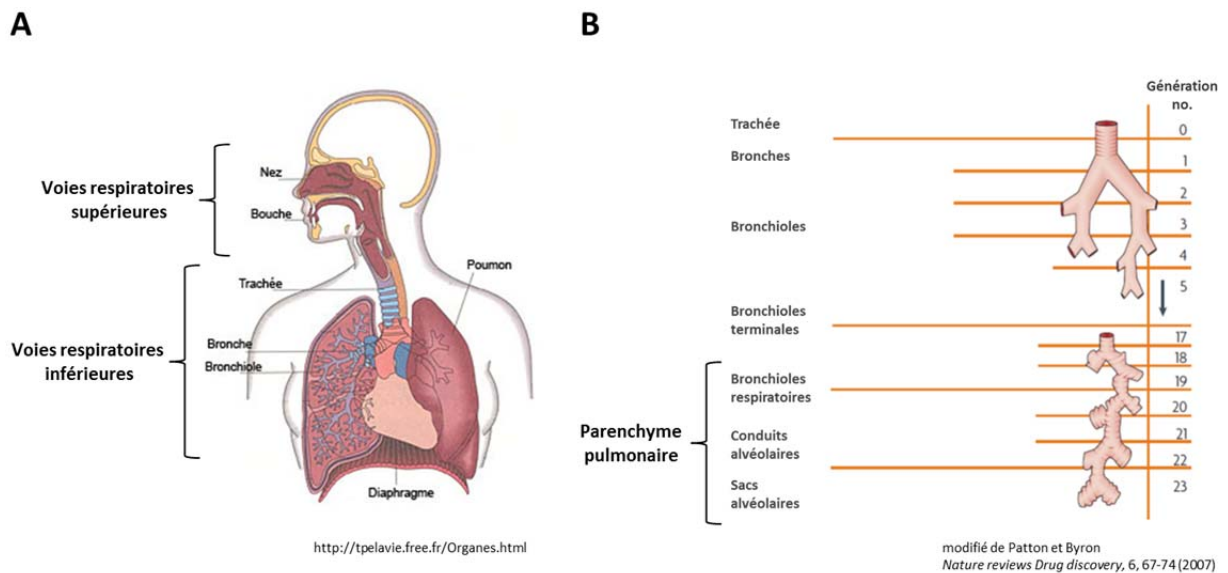


Figure 1. L'appareil respiratoire.

(A) Schéma représentant l'anatomie de l'appareil respiratoire des voies respiratoires supérieures et inférieures. (B) Représentation des voies respiratoires inférieures (arbre bronchique) jusqu'au parenchyme pulmonaire.

1.1.1. Voies respiratoires supérieures

Les voies respiratoires supérieures sont composées des éléments extrathoraciques de l'appareil respiratoire, c'est-à-dire le nez, les fosses nasales, la bouche, le pharynx et le larynx. L'entrée de l'air par la bouche et le nez dans les fosses nasales assure un conditionnement de l'air ambiant avant de pénétrer dans les poumons. En effet, l'air sera purifié par deux mécanismes, soit les poils nasaux qui stoppent les éléments de grande taille et le mucus sécrété qui emprisonne les éléments de plus petites tailles en les entraînant vers la gorge grâce aux cils vibratiles des cellules de l'épithélium pseudostratifié, un phénomène nommé clairance mucociliaire (Knowles & Boucher, 2002). Les fosses nasales permettent également une humidification de l'air et son réchauffement par la circulation capillaire avant de se diriger vers le pharynx. Celui-ci est un carrefour permettant le croisement des voies respiratoires et des voies digestives. L'air se déplace ensuite dans le larynx, l'organe de la phonation pour finalement se diriger dans les voies respiratoires inférieures.

1.1.2. Voies respiratoires inférieures

Les voies respiratoires inférieures sont composées des éléments intrathoraciques de l'appareil respiratoire qui se divisent en une zone de conduction et une zone d'échange nommée parenchyme pulmonaire [Figure 1B]. Les voies respiratoires inférieures, dénommées arbre bronchique, débutent avec la trachée formée d'un cartilage cylindrique donnant naissance à deux branches, les bronches souches qui pénètrent dans chaque poumon. Celles-ci vont se ramifier en bronches lobaires en pénétrant dans leur lobe respectif et donner naissance à 16 générations de ramifications jusqu'à la formation de bronchioles non respiratoires qui s'achèvent par les bronchioles terminales telles que présentées dans la figure 1 (Parent, 1992). La purification continue de l'air se poursuit également dans les voies respiratoires inférieures grâce à la production de mucus et aux cils vibratiles recouvrant l'épithélium pseudostratifié.

1.1.2.1. Parenchyme pulmonaire

Le parenchyme pulmonaire représente la fin du prolongement de l'arbre bronchique et correspond au tissu fonctionnel des poumons. En effet, le parenchyme pulmonaire est formé des constituants qui permettent les échanges gazeux. Les bronchioles terminales vont donner naissance à trois générations de bronchioles respiratoires qui se subdivisent en une dizaine de

conduits alvéolaires. En plus de leur rôle de conduction de l'air et de l'absence de cils, les bronchioles respiratoires se distinguent des bronchioles terminales par la présence d'alvéoles sur leur parois permettant des échanges gazeux. Les conduits alvéolaires comportent deux ou trois sacs alvéolaires qui présentent de nombreuses alvéoles. Celles-ci se dénombrent à environ 500 millions dans les poumons humains et couvrent une surface de 100m^2 (Patton & Byron, 2007). La surface qui effectue les échanges gazeux se nomme la zone alvéolo-capillaire et représente environ 70m^2 (Bishop, 2004).

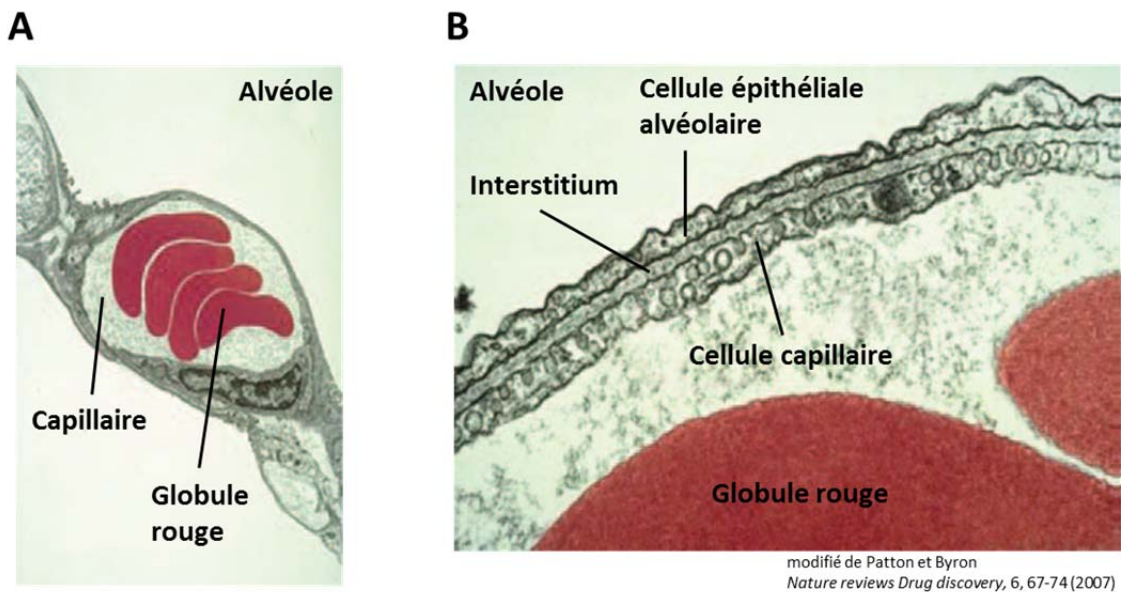


Figure 2. La zone alvéolo-capillaire.

Photographies de microscopie électronique en transmission d'alvéole humaine. (A) Représentation à faible grossissement. (B) Représentation à fort grossissement.

La zone alvéolo-capillaire est constituée de différents acteurs permettant un échange gazeux optimal. En débutant dans l'espace alvéolaire, on y retrouve le surfactant, dont le rôle est discuté plus loin, qui est produit par les cellules épithéliales alvéolaires de type II et les cellules de Clara au niveau des bronchioles terminales. Ensuite, on retrouve l'hypophase sécrétée principalement par les cellules épithéliales alvéolaires de type II. Ensuite, on retrouve l'épithélium alvéolaire constitué des cellules épithéliales alvéolaires de type I et II (AT I et II), l'interstitium, puis les cellules endothéliales formant le capillaire [Figure 2].

1.1.3. L'épithélium de l'appareil respiratoire

L'épithélium respiratoire possède une population hétéroclite de cellules qui présente des rôles distincts selon sa localisation dans l'appareil respiratoire [Figure 3]. Les fosses nasales et le rhinopharynx sont composés de cellules épithéliales pseudostratifiées, tout comme la trachée et les bronches. Cet épithélium est caractérisé par la présence de plusieurs types de cellules représentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Types de cellules épithéliales retrouvées dans les voies aériennes proximales.

Type de cellule	Fonction
Cellules ciliées	Élimination des contaminants
Cellules caliciformes	Sécrétion du mucus
Cellules basales	Cellules progénitrices
Cellules à bordure en brosse	Régénération de l'épithélium
Cellules endocrines	Sécrétion d'amines et de polypeptides (hormones/neurotransmetteurs)

Les mêmes types de cellules vont se retrouver dans les voies aériennes plus distales, mais vont présenter une structure plus petite. Par exemple, les cellules épithéliales des bronchioles changent de structure pour devenir cuboïdes dans les bronchioles terminales. Celles-ci vont présenter moins de cellules ciliées et sont dépourvues de cellules caliciformes. Par conséquent, les débris logés dans les bronchioles devront être éliminés par les macrophages alvéolaires. Un nouveau type de cellules épithéliales intervient à ce niveau, les cellules de Clara. Celles-ci servent de cellules progénitrices aux cellules ciliées dans les bronchioles, ainsi qu'à la régénération de l'épithélium alvéolaire (Bishop, 2004), et participent également au transport ionique (Van Scott, Hester, & Boucher, 1987), à la clairance muco-ciliaire via la sécrétion de

facteurs présents dans le mucus ainsi qu'à la réponse inflammatoire (Reynolds & Malkinson, 2010). Finalement, on retrouve les cellules épithéliales alvéolaires qui seront décrites dans le paragraphe suivant.

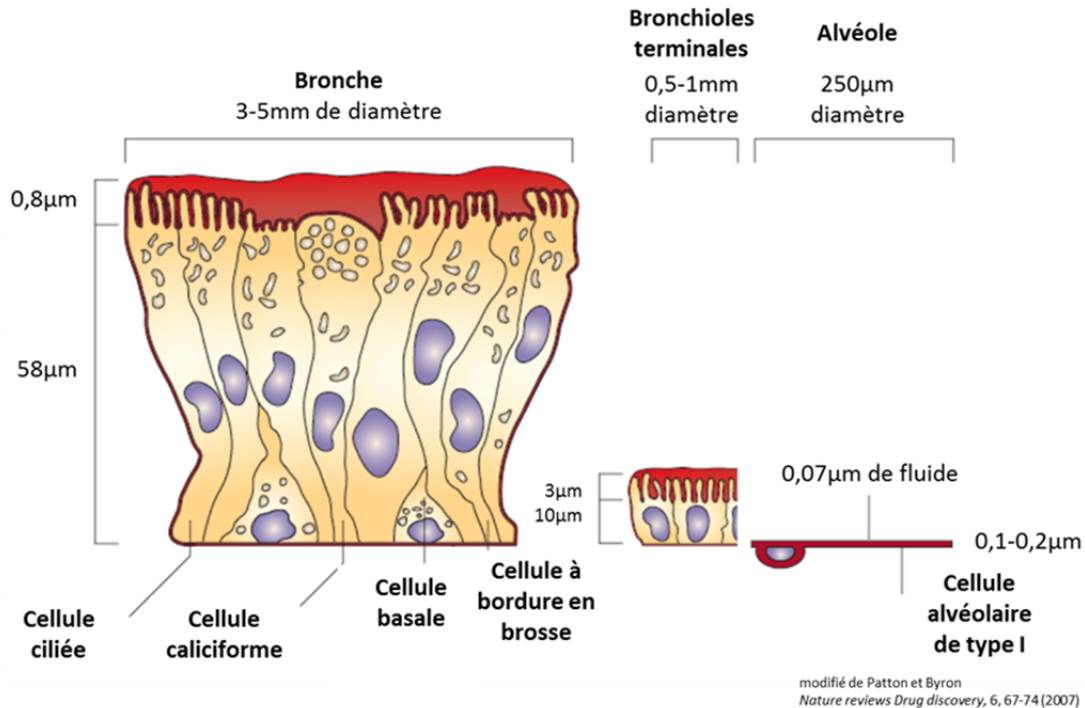


Figure 3. Schématisation des différents types de cellules épithéliales.

Les différents types cellulaires décrits dans le tableau 1 sont représentés ci-dessus proportionnellement à leur taille.

1.1.3.1. L'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est composé de deux types de cellules épithéliales, soit les cellules épithéliales alvéolaires de type I et II (ATI et II). Cet épithélium a pour principale fonction d'agir comme barrière physique contre l'invasion de bactéries, virus, allergènes ou autres substances toxiques pour l'organisme. Cette étanchéité est possible de par la présence de plusieurs jonctions serrées et adhérentes entre les cellules épithéliales alvéolaires créant ainsi une barrière cellulaire étanche.

Les ATI, des cellules minces et étalées, recouvrent environ 96% de la surface alvéolaire et sont séparées par seulement 0,1 à 0,2 µm des capillaires sanguins. Cette caractéristique morphologique permet un échange gazeux optimal entre l'alvéole et les

capillaires pulmonaires (Berthiaume, Voisin, & Dagenais, 2006). Leur fonction n'est cependant pas complètement élucidée dû à la difficulté de leur culture *ex vivo*. Avec l'avènement de nouvelles techniques, telle que la purification cellulaire par cytométrie en flux, de récentes études ont mis en lumière le rôle essentiel des ATI dans le transport ionique et aqueux en condition basale (Guidot et al., 2006). Récemment, l'implication des ATI dans le processus de réparation alvéolaire a également été proposée lors d'une démonstration de la capacité de prolifération des ATI en culture (Dobbs, Johnson, Vanderbilt, Allen, & Gonzalez, 2010). Cependant, ces observations devront être répétées avec des modèles animaux afin d'apprécier leur rôle dans la réparation et le développement du tissu alvéolaire.

Les ATII, contrairement aux ATI, présentent une structure cuboïde et une morphologie caractérisée par la présence de corps lamellaires et de microvillosités apicales. Ces cellules sont mieux caractérisées que leurs consœurs et plusieurs fonctions leur sont attribuées. Notamment, les ATII jouent un rôle essentiel dans les échanges gazeux par la production et la sécrétion de surfactant. En effet, la tension de surface des molécules d'eau du côté apical de l'épithélium favorise le collapsus des alvéoles lors de l'expiration. Le surfactant, un complexe de lipides et de protéine, agit en réduisant la cohésion des molécules d'eau entre elles ce qui réduit la tension de surface et permet une ventilation adéquate contribuant à l'efficacité des échanges gazeux (Guillot et al., 2013). En plus de son rôle dans la respiration, le surfactant permet de prévenir l'œdème pulmonaire et démontre des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Mason, 2006). Les ATII jouent également un rôle important dans la régénération de l'épithélium alvéolaire en tant que cellules progénitrices (Uhal, 1997). En effet, celles-ci peuvent se différencier, se multiplier et se différencier en ATI ou ATII (Reddy et al., 2004). Récemment, de nouvelles populations de cellules progénitrices présentant des caractéristiques de cellules de Clara, de cellules ATII et ATI ont également été découvertes (Fujino et al., 2011; Kim et al., 2005) suggérant un mécanisme de réparation plus complexe. Les ATII jouent également un rôle important dans le transport ionique et liquidien qui sera discuté plus en détail ultérieurement. Les ATII sont également des acteurs de la réponse immunitaire par la sécrétion de diverses molécules inflammatoires telle que les chimiokines RANTES et MCP-1 qui servent de chimioattractants pour les macrophages. Les ATII interagissent également avec les leucocytes via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Fehrenbach, 2001).

1.2. Le syndrome de détresse respiratoire aigu

1.2.1. Définition et épidémiologie

Le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) est une atteinte pulmonaire sévère avec des taux de mortalité et de morbidité substantiels. L'origine du SDRA est multiple et peut provenir d'atteintes pulmonaires directes (pneumonie, aspiration gastrique, reperfusion suite à une transplantation pulmonaire) ou indirectes (sepsie, trauma sévère, multiples transfusions). Une conférence en 1994 a permis d'établir les critères relatifs au diagnostic du SDRA. Il avait été défini que la sévérité des dommages pulmonaires varie. Les patients avec une hypoxie moins sévère étaient considérés comme ayant une insuffisance respiratoire aiguë, alors que ceux qui ont une hypoxie sévère étaient considérés atteints de SDRA (Johnson & Matthay, 2010). Depuis 2011, une nouvelle définition du SDRA a été proposée. Le SDRA se divise maintenant en trois catégories, soit la forme légère, modérée ou sévère selon des critères établis présentés dans le tableau 2 (Force et al., 2012).

Tableau 2. Critères pour le diagnostic du syndrome de détresse respiratoire aigu.

Acute Respiratory Distress Syndrome	
Timing	Within 1 week of a known clinical insult or new or worsening respiratory symptoms
Chest imaging ^a	Bilateral opacities—not fully explained by effusions, lobar/lung collapse, or nodules
Origin of edema	Respiratory failure not fully explained by cardiac failure or fluid overload Need objective assessment (eg, echocardiography) to exclude hydrostatic edema if no risk factor present
Oxygenation ^b	
Mild	$200 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$ with PEEP or CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$ ^c
Moderate	$100 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$ with PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Severe	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$ with PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$

Abbreviations: CPAP, continuous positive airway pressure; FiO_2 , fraction of inspired oxygen; PaO_2 , partial pressure of arterial oxygen; PEEP, positive end-expiratory pressure.

^aChest radiograph or computed tomography scan.

^bIf altitude is higher than 1000 m, the correction factor should be calculated as follows: $[\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \times (\text{barometric pressure}/760)]$.

^cThis may be delivered noninvasively in the mild acute respiratory distress syndrome group.

L'incidence du SDRA est estimée à environ 64 cas par 100 000 personnes, l'équivalent de 190 000 cas par année aux États-Unis. Cependant, l'incidence fluctue beaucoup d'une région à l'autre où elle varie de 17 à 34 cas par 100 000 habitants en Europe et en Australie

(MacCallum & Evans, 2005). Il est à noter que l'incidence du SDRA semble augmenter dans le temps, mais cela est probablement dû à une sous-estimation de l'incidence du SDRA auparavant (Rubenfeld et al., 2005). Malgré une amélioration des traitements et une ventilation mécanique adéquate, le taux de mortalité des personnes atteintes de SDRA demeure toujours élevé, avec un taux variant de 26% à 40% selon les études (Erickson et al., 2009; Zambon & Vincent, 2008).

1.2.2. Pathophysiologie

La pathophysiologie du SDRA peut se décrire en trois phases qui vont se chevaucher dans le temps.

Le premier stade d'un SDRA est une phase aiguë aussi dite exsudative. Celle-ci peut s'étaler sur une période d'environ sept jours ou moins. Durant cette phase, on assiste à l'apparition de dommages étendus au niveau de la barrière épithélio-endothéliale. Ces dommages vont entraîner un œdème alvéolaire riche en protéines et en fibrine accompagné d'un influx en cellules inflammatoires, principalement des neutrophiles (Matthay & Zemans, 2011). Vers la fin de ce stade, des membranes hyalines formées de protéines, de débris cellulaires et de fibrine peuvent se déposer dans les espaces aériens empêchant ainsi que les échanges gazeux soient adéquats [Figure 4]. À ce stade, l'épithélium alvéolaire a subi de nombreux dommages, toutefois le degré de sévérité peut être associé à la résolution du SDRA. En effet, chez certains patients, un renouvellement de l'épithélium respiratoire se produit permettant la guérison (Berthiaume, Lesur, & Dagenais, 1999; Geiser, 2003).

Dans le cas où il n'y a pas de résolution des lésions subies par l'épithélium alvéolaire, une phase proliférative se développe. Celle-ci est caractérisée par une hyperplasie et une prolifération des cellules alvéolaire ATII. Ce processus est accompagné par une prolifération des fibroblastes et des myofibroblastes qui entraîne la création d'un tissu fibrotique dans l'espace alvéolaire (Schwarz, 2001). Il s'en suit un dépôt de collagène et une migration des cellules épithéliales alvéolaires vers la surface du tissu nouvellement formé.

Finalement, la phase fibrosante se met en place. Celle-ci est caractérisée par un dépôt excessif de collagène et de matrice extracellulaire. Cette phase est également associée avec le développement d'une fibrose des régions interalvéolaires, alvéolo-capillaires, des alvéoles et des conduits alvéolaires (Rocco, Dos Santos, & Pelosi, 2009; Ware, 2006). Cette fibrose

provoquera la formation d'une barrière physique non fonctionnelle qui altérera les échanges gazeux dans les alvéoles.

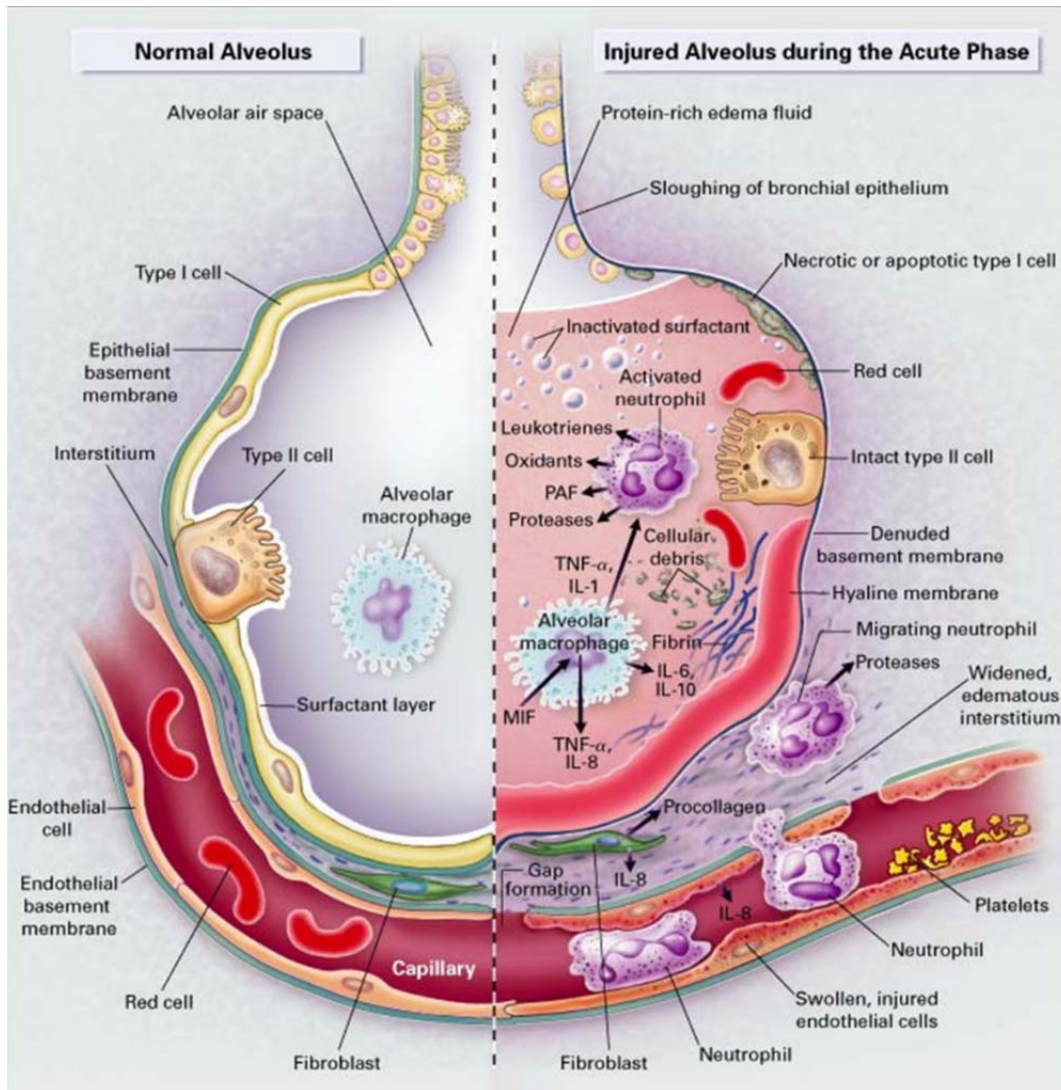


Figure 4. Représentation d'une alvéole durant la phase aiguë du SDRA

Durant la phase aiguë, on retrouve une desquamation de l'épithélium ainsi que la formation d'une membrane d'hyaline. Les neutrophiles adhèrent à l'endothélium et transitent vers l'espace aérien où l'on retrouve un œdème riche en protéines. Les macrophages alvéolaires sécrètent différentes cytokines et chimiokines qui activent les neutrophiles et favorisent la formation de matrice extracellulaire par les fibroblastes. (Ware & Matthay, 2000)

Une étape importante dans la résolution du SDRA est la capacité à résorber l'œdème alvéolaire. La clairance de l'œdème requiert un transport vectoriel de sodium de la surface des cellules épithéliales alvéolaires vers l'espace interstitiel grâce à la présence du canal ENaC et la pompe Na^+/K^+ -ATPase. En cas de SDRA, la capacité à éliminer l'œdème est associée au degré de sévérité des dommages causés à l'épithélium alvéolaire. Cette sévérité est liée à la nature de la lésion (directe ou indirecte) et à sa durée. L'importance d'une clairance liquidienne alvéolaire adéquate dans la résolution du SDRA a été suggérée. En effet, la présence d'une clairance alvéolaire détériorée au début des lésions pulmonaires corrèle avec un mauvais pronostic de survie contrairement aux patients avec une clairance alvéolaire initiale moins affectée (Matthay, 2002). Puisqu'une partie de l'évolution pathophysiologique du SDRA dépend de la clairance alvéolaire et du transport ionique, il est important de mieux comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans l'homéostasie liquidienne.

1.3. L'homéostasie liquidienne

L'épithélium alvéolaire est essentiel à la régulation du volume de l'hypophase en condition physiologique, mais également pour la clairance liquidienne dans les cas d'œdème pulmonaire. Les ATI et II vont effectuer un contrôle strict du transport ionique et liquidien. Ces mécanismes de transport ionique sont rendus possibles par la présence de nombreux canaux et transporteurs à la surface des cellules épithéliales alvéolaires. Le transport actif permet la création d'un gradient osmotique transépithélial permettant l'absorption de l'eau des alvéoles vers le milieu interstitiel, puis vers les capillaires (Matthay, Landolt, & Staub, 1982). Le transport passif de l'eau se fait ici de deux façons, soit par la voie paracellulaire, soit via les aquaporines présentes à la surface des ATI. Le rôle exact des aquaporines n'est toutefois pas encore complètement élucidé considérant que l'absence de ces protéines n'altère pas la clairance alvéolaire (Verkman, 2007). Il existe trois grandes familles de canaux et transporteurs ioniques impliquées dans l'homéostasie liquidienne alvéolaire. Les canaux sodiques, chlorures et potassiques [Figure 5]. Ceux-ci sont décrits plus en détail ci-après.

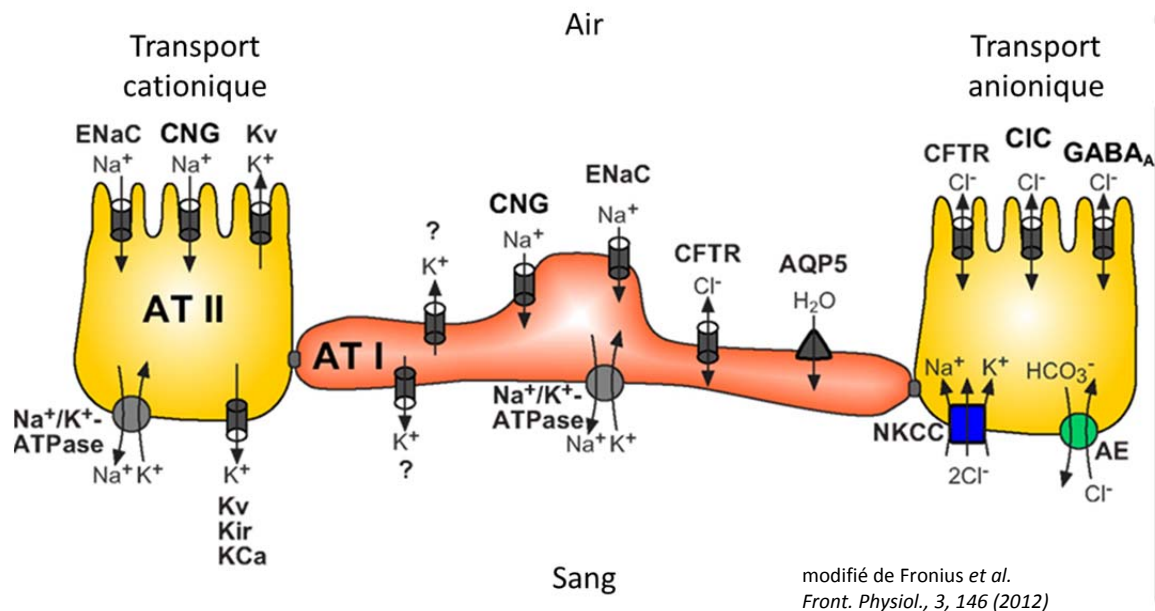


Figure 5. Canaux et transporteurs impliqués dans le transport ionique alvéolaire.

De nombreuses protéines impliquées dans le transport ionique ont été identifiées dans les cellules ATII. (ENaC: canal épithélial sodique; CNG: canal cationique activé par le GMP_c; K_v: canal potassique tensiodépendant; la pompe Na⁺/K⁺-ATPase; K_{ir}: canal potassique à rectification entrante; K_{Ca}: canal potassique activé par le calcium; CFTR: régulateur transmembranaire de la fibrose kystique; CIC: canal chlorure sensible à la tension; GABA_A: canal chlorure activé par l'acide γ-aminobutyrique de type A; NKCC: cotransporteur NaK2Cl; AE: échangeur d'anions). Les cellules ATI possèdent les mêmes types de canaux et transporteurs. En outre, ces cellules expriment l'aquaporine 5 (AQP5), une protéine transmembranaire perméable aux molécules d'eau (Hollenhorst, Richter, & Fronius, 2011).

1.3.1. Les canaux sodiques

L'absorption des ions sodium à la surface apicale des cellules par des canaux est un transport passif qui nécessite la présence et l'activité de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase à la surface basolatérale des cellules alvéolaires (Sartori & Matthay, 2002). La pompe Na⁺/K⁺-ATPase est composée de deux sous-unités (α et β) formant un hétérodimère. La sous-unité α représente la sous-unité catalytique avec la présence d'un site de liaison d'ATP et d'un site de phosphorylation. La sous-unité β jouerait plutôt un rôle au niveau de l'ancrage de la pompe à la membrane (Lingrel, Orłowski, Shull, & Price, 1990). La pompe Na⁺/K⁺-ATPase joue un rôle important dans le maintien des gradients osmotiques et électrochimiques en couplant l'hydrolyse de l'ATP avec le transport du sodium et du potassium contre leur gradient de

concentration respectif (Sweadner & Goldin, 1980). La pompe expulse ainsi trois ions Na^+ et fait pénétrer deux ions K^+ ce qui contribue à créer un potentiel de membrane négatif dans la cellule. Le gradient électrochimique créé par la pompe favorise l'absorption de Na^+ à la surface apicale et permet son expulsion en basolatéral contribuant directement et de façon active au transport transepithelial de Na^+ .

Les canaux sodiques sont classés selon leur sensibilité à l'amiloride, un inhibiteur de ces canaux. Les canaux insensibles à l'amiloride peuvent représenter jusqu'à 70% du transport sodique dans le poumon adulte (O'Brodovich, Yang, Gandhi, & Otulakowski, 2008). Le canal CNG1 (cGMP-gated cation channel) (Wilkinson et al., 2011), mais également un canal sodique non sélectif détecté par patch-clamp (Mair et al., 2004) pourraient être impliqués dans ce transport. Cependant, le rôle physiologique de ce canal non sélectif reste à être déterminé dans les poumons. À ces canaux s'ajoutent plusieurs co-transporteurs sodiques tels le cotransporteur Na^+ /Glucose (Knowles & Boucher, 2002), le cotransporteur Na^+ /Phosphate (Jin, Zoidis, Ghirlanda, & Schmid, 2010), le cotransporteur Na^+ / HCO_3^- (Lubman, Chao, & Crandall, 1995), ainsi que l'échangeur Na^+ / H^+ (Oelberg, Xu, & Shabarek, 1993). Dans le cas des canaux sensibles à l'amiloride, il existe les canaux non sélectifs aux cations (Feng, Clark, & Berthiaume, 1993) et le canal épithélial sodique (ENaC). ENaC est l'acteur-clé dans la clairance alvéolaire en condition physiologique, mais également dans le cadre de pathologie (Eaton, Helms, Koval, Bao, & Jain, 2009). Une présentation plus détaillée de ce canal sera faite ultérieurement.

1.3.2. Les canaux chlorures

Initialement, il a été suggéré que le transport du chlore se faisait principalement par les voies paracellulaires en suivant le gradient osmotique créé par le transport de sodium (Zhu, Yue, Shoemaker, & Matalon, 1996). Cependant, de nombreuses études ont finalement fait mention de différents canaux chlorures présents à la surface des ATI et ATII. Le transport du chlore serait donc principalement régulé par le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui est exprimé à la surface des deux types de cellules alvéolaires (Brochiero, Dagenais, Prive, Berthiaume, & Grygorczyk, 2004; Johnson et al., 2006). Celui-ci a principalement un rôle dans la sécrétion du Cl^- permettant une régulation du niveau de liquide des alvéoles en association avec le canal sodique ENaC (Fang et al., 2006).

Dépendamment du type cellulaire où il est exprimé, CFTR peut également absorber le Cl^- (Johnson, 2007) et participe de cette façon à la clairance liquidienne des poumons (Fang et al., 2002). Ils existent également d'autres acteurs impliqués dans le transport du chlore, tel que les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Lubman, Danto, Chao, Fricks, & Crandall, 1995), les canaux tensiodépendant CLC2 et 5 (Johnson, Allen, & Dobbs, 2009) et le cotransporteur NaK_2Cl au niveau basolatéral (Solymosi et al., 2013). La sécrétion ou l'absorption de chlore par les cellules épithéliales alvéolaires dépend de la nature des cotransporteurs Cl^- exprimés dans les différentes cellules. Les AII expriment le co-transporteur NaK_2Cl au niveau basolatéral, favorisant l'entrée de chlore dans la cellule. L'activation de CFTR dans ces cellules permet donc une sécrétion de chlore ce qui provoque une sécrétion active de liquide (Hollenhorst et al., 2011). À l'opposé, les AI expriment plutôt le co-transporteur KCC qui expulse le potassium et le chlore de la cellule du côté basolatéral. KCC permet un transport transcellulaire de chlore via CFTR et un canal Cl^- sensible au NPPB (Dagenais et al., 2013).

1.3.3. Les canaux potassiques

Jusqu'à récemment, le rôle des canaux potassiques était moins connu dans les cellules épithéliales alvéolaires. Il existe près d'une quarantaine de canaux potassiques répertoriés en diverses classes: les canaux K^+ tensiodépendant, les canaux K^+ activés par le calcium, les canaux K^+ à rectification entrante et les canaux K^+ activés par l'ATP (Bardou, Trinh, & Brochiero, 2009a, 2009b). Ceux-ci jouent différents rôles dans l'alvéole. En raison de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase qui pompe du K^+ dans le cytoplasme, les canaux K^+ jouent un rôle important dans l'homéostasie ionique des cellules. Ces canaux jouent également un rôle important dans le contrôle du potentiel de membrane. L'activité des canaux K^+ permet en effet une hyperpolarisation de la cellule qui à son tour peut activer le fonctionnement d'autres canaux. Ils permettent ainsi la formation du gradient électrochimique nécessaire au transport ionique et liquidien. Certains canaux K^+ (KvLQT1, KATP et $\text{KCa}_{3.1}$) peuvent également contrôler l'expression des canaux ENaC et CFTR et affecter la clairance alvéolaire (Bardou et al., 2012; Leroy, Dagenais, Berthiaume, & Brochiero, 2004; Leroy et al., 2006).

1.3.4. Le canal épithélial sodique ENaC

Le canal ENaC est constitué de trois sous-unités distinctes: α , β et γ (Canessa et al., 1994). La sous-unité α joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du canal ENaC et son implication dans la clairance alvéolaire. En effet, l'absence d'expression de la sous-unité α ENaC dans un modèle de souris KO (*knock-out*) a démontré que cette sous-unité jouait un rôle essentiel à la naissance, puisque les souriceaux $-/-$ incapables de réabsorber le liquide des poumons meurent rapidement (Hummler et al., 1996). Quant à elles, les sous-unités β et γ sont nécessaires pour une expression et une activité maximale du canal à la membrane (Canessa et al., 1994; Konstas & Korbmacher, 2003). Chez l'humain, on retrouve également la sous-unité δ similaire en plusieurs points à la sous-unité α (Ji et al., 2012). Toutefois, sa faible expression dans les poumons suggère un rôle plus ou moins important dans cet organe (Giraldez, Rojas, Jou, Flores, & Alvarez de la Rosa, 2012). La structure proposée pour le canal ENaC représente une stœchiométrie tétrahétéromérique composée de quatre sous-unités sous la forme de 2α , 1β et 1γ (Dijkink, Hartog, van Os, & Bindels, 2002). Cependant, la structure tend à être revue suite à une cristallisation récente du canal sensible à l'acide (ASIC) démontrant une conformation trimérique. Par extension, il est proposé que le canal ENaC présenterait également une organisation trimérique α , β et γ puisque les canaux ENaC et ASIC présentent des caractéristiques similaires et font partie de la famille des dégénérines (Gonzales, Kawate, & Gouaux, 2009). Chaque sous-unité présente une structure similaire composée de deux segments transmembranaires, de deux domaines amino- (N-) et carboxy (C-) -terminaux dans la région cytoplasmique, ainsi qu'une large boucle extracellulaire [Figure 6].

Dans les poumons, le canal ENaC peut se retrouver sous sa forme hautement sélective aux ions sodium (HSC), un canal très sensible à l'amiloride, ou sous la forme d'un canal cationique non sélectif (NSC) moins sensible à l'amiloride (Jain, Chen, Ramosevac, Brown, & Eaton, 2001). La forme atypique du canal ENaC (NSC) serait uniquement constituée des sous-unités α et présente une sélectivité semblable pour les ions Na^+ et K^+ (Jain, Chen, Malik, Al-Khalili, & Eaton, 1999). Cependant, l'identité exacte de ce canal n'est toujours pas connue (Jain et al., 2001). À l'opposé, la forme classique HSC composée des trois sous-unités du canal ENaC a été extensivement étudiée.

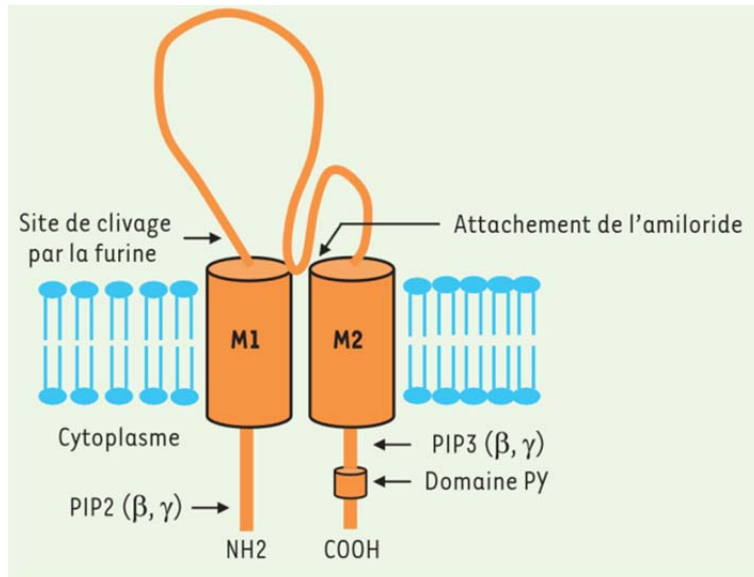


Figure 6. Structure d'une sous-unité d'ENaC

Chaque sous-unité est constituée de deux domaines transmembranaires (M1, M2), d'un long segment extracellulaire glycosylé, riche en cystéines, ainsi que de deux courts fragments cytoplasmiques. Le domaine extracellulaire représente environ 70 % de la protéine, ce qui confère à chaque sous-unité une structure qui s'apparente plus à celle d'un récepteur membranaire qu'à celle d'un canal ionique. La majorité des sites qui modulent l'activité du canal se retrouvent dans les domaines amino- et carboxy-terminaux (Dagenais, Boncoeur, & Berthiaume, 2009).

1.4. Réponse au stress suite à des lésions pulmonaires

Les lésions pulmonaires engendrées par le SDRA brisent l'homéostasie liquidienne décrite précédemment. Cette détérioration des mécanismes de transport ionique entraîne une réponse cellulaire selon la nature du stress pathophysiologique rencontré afin de rétablir une clairance liquidienne adéquate.

1.4.1. Stress pathophysiologiques

Les stress pathophysiologiques causés par des carences, l'exposition à des agents chimiques ou physiques sont des conditions qui peuvent altérer la physiologie et la survie cellulaire dans les poumons. On distingue différents types de stress cellulaire, par exemple le stress oxydant, hypoxique, mécanique et inflammatoire. La réponse à ces stress met en jeu des mécanismes protecteurs, sélectionnés par l'évolution, afin de minimiser l'impact négatif de

ces conditions et permettre une réponse optimale des cellules. Chaque type de stress cellulaire présente généralement deux éléments essentiels. Tout d'abord, il y aura un mécanisme de détection de l'agression, par exemple par l'activation de récepteurs, puis une réponse adaptative, généralement par l'activation de différentes voies de signalisation qui conduisent à la modulation de l'expression génique. Ces voies de signalisation seront présentées plus en détail dans un prochain sous-chapitre. Cependant, il peut arriver que cette réponse cellulaire soit néfaste, en raison de son intensité ou parce que cette stimulation devient chronique. C'est l'intensité et/ou la chronicité de l'activation des systèmes de protection qui entraînent un stress pathophysiologique dommageable aux cellules. En raison de son contact direct avec le milieu extérieur, l'environnement pulmonaire présente un potentiel élevé en source de stress pour les cellules épithéliales alvéolaires. Dans le cas de SDRA, plusieurs stress sont connus pour moduler négativement l'activité du canal ENaC, son expression protéique et le niveau d'expression de son ARNm. Une revue de ces stress est présentée ci-dessous.

Ainsi, en réponse à divers stimuli inflammatoires, les cellules épithéliales des voies aériennes et des alvéoles, les cellules endothéliales ainsi que les macrophages alvéolaires, produisent des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui peuvent avoir des effets nocifs sur l'épithélium pulmonaire (Bhatia & Mochhala, 2004). En effet, dans le condensat de respiration de patients atteints de SDRA ont été retrouvées des concentrations élevées en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une source de ROS, (Kietzmann, Kahl, Muller, Burchardi, & Kettler, 1993). Des concentrations élevées de ROS ont également été retrouvées dans les poumons de patients SDRA et sont associées à d'importants dommages cellulaires (Lamb, Gutteridge, Baker, Evans, & Quinlan, 1999). D'autre part, le H_2O_2 semble induire une modulation du canal ENaC qui semble contradictoire sur certains points. D'une part, ce ROS induit une inhibition de l'expression de l'ARNm et de la protéine de la sous-unité α ENaC dans différents types cellulaires (A549, H441, Calu-3) (Wang et al., 2000; Xu & Chu, 2007). À l'opposé, cette même molécule, ainsi que l'anion superoxide O_2^- , induisent une augmentation de l'expression membranaire et de l'activité du canal ENaC dans les cellules ATII (Downs, Kumar, Kreiner, Johnson, & Helms, 2013; Takemura, Goodson, Bao, Jain, & Helms, 2010). Cette divergence temporelle pourrait s'expliquer par un phénomène d'autorégulation et de rétroaction de l'activité et de l'expression du canal ENaC. En effet, la cellule pourrait inhiber l'expression génique de ENaC afin d'éviter une suractivation du canal par les ROS. Ainsi, le

stress oxydatif pourrait selon son origine, son intensité et sa durée, avoir un impact sur la réponse cellulaire et par conséquent sur le canal ENaC. Par exemple, dans les neurones corticaux de rat, le stress oxydatif chronique inhibe l'expression du canal TRPC3, alors qu'un stress oxydatif aigu n'a aucun effet (Roedding, Tong, Au-Yeung, Li, & Warsh, 2013).

L'hypoxie du tissu alvéolaire est également un environnement que l'on retrouve souvent chez les personnes atteintes de SDRA. La diminution de la concentration en oxygène dans les alvéoles de ces patients inhibe l'expression des différentes sous-unités ENaC et en particulier de la sous-unité alpha essentielle à la fonction du canal. (Gille et al., 2014; Planes et al., 1997). L'inhibition de l'activité du canal en condition hypoxique implique également une polyubiquitylation de la sous-unité β ENaC par Nedd4 ce qui entraîne la dégradation du canal dans les lysosomes (Gille et al., 2014). L'inhibition du canal ENaC par l'hypoxie peut s'expliquer également par la sécrétion de sérotonine par les cellules endocrines du système respiratoire dans ces conditions. En effet, la sérotonine module négativement les fonctions du canal ENaC dans les voies distales, ainsi que la clairance alvéolaire. (Goolaerts et al., 2010).

La transplantation pulmonaire peut également être une cause au développement de la détresse respiratoire aiguë dans les premières 72h suivant la transplantation. En effet, celle-ci est une complication courante suite à cette chirurgie (Fard et al., 2014). Les dommages d'ischémie reperfusion inhérent à la transplantation induisent des ROS et une réponse inflammatoire dans les poumons qui affectent le transport ionique de l'épithélium pulmonaire. Les dommages causés par la transplantation pulmonaire chez un modèle canin affectent la clairance alvéolaire potentiellement via une chute de l'expression de l'ARNm des sous-unités α et β ENaC, ainsi que d'une diminution de la protéine α ENaC. De plus, l'administration de terbutaline, un agoniste des récepteurs β 2-adrénrgiques connu pour stimuler l'activité du canal ENaC (Baxendale-Cox, 1999), est incapable de favoriser une clairance liquidienne dans le poumon transplanté contrairement au poumon contrôle (Sugita et al., 2003a). Ces résultats suggèrent un rôle majeur du transport du sodium dans le maintien d'une fonction pulmonaire optimale suite à une transplantation pulmonaire.

Le facteur de croissance transformant β 1 (TGF- β 1) est une cytokine qui joue plusieurs rôles dans les poumons, incluant le développement, la prolifération cellulaire et l'immunité. Durant le SDRA, le TGF- β 1 a surtout été démontré dans la phase tardive de réparation cellulaire où celui-ci joue un rôle critique dans le développement de la fibrose pulmonaire.

Cependant, le TGF- β 1 se présente comme un médiateur-clé dans le développement de la phase aiguë du SDRA où le niveau de TGF- β 1 actif est augmenté (Fahy et al., 2003). Le TGF- β 1 augmenterait la perméabilité membranaire ce qui favorise l'œdème pulmonaire (Dhainaut, Charpentier, & Chiche, 2003). Par ailleurs, le TGF- β 1 inhibe le transport du sodium de l'épithélium alvéolaire. Cette inhibition par le TGF- β 1 s'effectue par une diminution de l'activité du canal ENaC (Peters et al., 2014) causée par la répression de l'expression de l'ARNm et de la protéine de la sous-unité α ENaC via la voie de signalisation de ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) (Frank et al., 2003).

Outre le TGF- β 1, plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées dans l'espace alvéolaire durant la phase exsudative du SDRA. Parmi celles-ci on retrouve notamment l'interleukine-1 β (IL-1 β), une des cytokines les plus actives identifiées dans l'œdème pulmonaire de patients avec une détresse respiratoire aiguë (Pugin, Ricou, Steinberg, Suter, & Martin, 1996; Pugin, Verghese, Widmer, & Matthay, 1999). L'IL-1 β a également démontré une action inhibitrice du transport du sodium sensible à l'amiloride, conséquemment à une réduction de l'expression des transcrits des trois sous-unités ENaC et de la protéine de la sous-unité α ENaC via l'activation de la voie de signalisation p38 (Roux et al., 2005).

Une autre cytokine pro-inflammatoire importante sécrétée dans les voies distales est le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF- α). Celle-ci est retrouvée en grande quantité chez les patients atteints de SDRA (Hyers, Tricomi, Dettenmeier, & Fowler, 1991). Le TNF- α peut induire l'activation des cellules endothéliales et provoquer une dysfonction de la barrière alvéolo-capillaire, deux mécanismes impliqués dans la pathogenèse de l'œdème pulmonaire (Petrache, Birukova, Ramirez, Garcia, & Verin, 2003). L'inhibition du transport sodique est également un autre mécanisme par lequel le TNF- α favorise le développement de l'œdème pulmonaire. Le TNF- α agit en inhibant le transport sensible à l'amiloride (Dagenais et al., 2004). La cytokine réduit également l'expression des transcrits des sous-unités α , β et γ -ENaC, ainsi que de la protéine α ENaC, mais sans affecter l'expression de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase (Yamagata et al., 2009). Cependant, le TNF- α semble présenter un double rôle au niveau de la modulation du canal ENaC. En effet, l'utilisation du peptide TIP qui mime le domaine lectine du TNF- α a permis de stimuler le transport actif de sodium et la résorption de l'œdème pulmonaire chez des patients victimes de SDRA. Cette activation du canal ENaC se ferait par une interaction directe entre le domaine lectine du TNF- α et la région carboxy-terminale de la

sous-unité α ENaC suite à l'internalisation du peptide (Czikora et al., 2014; Fukuda et al., 2001).

Un autre stress important auquel les patients atteints de détresse respiratoire aiguë font face est l'apparition d'infections nosocomiales provoquant une pneumonie. Près de 6,5% des personnes sous ventilation mécanique, généralement nécessaire chez les patients atteints de SDRA, vont développer une pneumonie après six jours et le nombre de cas s'élève à 28% après 30 jours (Iregui & Kollef, 2001). Ces infections nosocomiales peuvent être exacerbées par la réponse immunitaire. En effet, le TNF- α et l'IL-1 β , en plus de participer à la réponse inflammatoire associée à l'infection, peuvent favoriser la prolifération bactérienne (Kanangat et al., 2001; Meduri, Kanangat, Stefan, Tolley, & Schaberg, 1999). Parmi les sources bactériennes, on retrouve *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Meduri et al., 1999), deux organismes impliqués dans la modulation du transport sodique. En effet, *Staphylococcus aureus*, une bactérie à Gram positif, perturbe l'intégrité du canal ENaC en inhibant l'expression de l'ARNm de la sous-unité α ENaC tout en augmentant celle de la sous-unité γ chez des cellules 6HBE14o- des voies aériennes (Hussain, Oliynyk, Roomans, & Bjorkqvist, 2013). Par contre, aucune étude n'a démontré d'impact de cette bactérie sur la modulation du transport ionique dans les alvéoles.

Pseudomonas aeruginosa, une bactérie à Gram négatif, est un organisme naturellement retrouvé dans différents environnements tels que dans le sol, les plantes et dans la nourriture que nous consommons (Neu, 1983). Cette bactérie n'est généralement pas pathogène, mais présente un profil opportuniste chez les personnes vulnérables comme les patients atteints de SDRA en induisant des infections nosocomiales. L'instillation de *P. aeruginosa* chez le lapin a démontré l'impact de cette bactérie sur l'homéostasie pulmonaire. Celle-ci induit une pneumonie aiguë provoquant des dommages à l'épithélium alvéolaire, une perte de son intégrité, ainsi que le développement d'un œdème pulmonaire (Wiener-Kronish et al., 1993). Un modèle semblable chez la souris a démontré que l'instillation de *P. aeruginosa* provoque une chute des transcrits des différentes sous-unités ENaC (Dagenais, Gosselin, Guilbault, Radzioch, & Berthiaume, 2005b). L'impact de cette bactérie sur le canal ENaC peut provenir de différents composants structuraux, tels que le flagelle ou les lipopolysaccharides (LPS). En effet, le flagelle de *P. aeruginosa* inhibe l'activité du transport sodique du canal ENaC via l'activation de la voie de signalisation de ERK1/2 (Kunzelmann et al., 2006). Les LPS sont des

glycolipides qui constituent la majeure partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et possèdent un potentiel pro-inflammatoire important dans les poumons (Schlag, Redl, & Hallstrom, 1991). La présence de LPS provoque une réponse forte chez les cellules alvéolaires en inhibant l'activité du canal ENaC via la sécrétion d'ATP et l'activation de la voie de signalisation de la PKC (Boncoeur et al., 2009), mais également en inhibant l'expression des transcrits et des protéines des trois sous-unités ENaC (He et al., 2014).

Tous les exemples présentés ci-dessus ont un point en commun, l'activation de voies de signalisation en réponse à un stress pathophysiologique.

1.4.2. Voies de signalisation classiques

Les MAP (mitogen-activated protein) kinases sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans de multiples voies de signalisation cellulaire. Les MAPK sont des enzymes conservées au cours de l'évolution de la levure jusqu'à l'homme (Widmann, Gibson, Jarpe, & Johnson, 1999) qui permettent de lier l'activation d'un récepteur à la surface des cellules avec des cibles intracellulaires. Les MAPK répondent aux différents stress pour permettre à la cellule de s'adapter à son environnement. La fonction des MAPK est contrôlée par une activation en cascade qui implique la phosphorylation en série de trois kinases soit une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MEKK), une MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK/MKK) et une MAP kinase (MAPK) [Figure 7]. Cette cascade de signalisation utilise un phénomène d'amplification afin de permettre une réponse rapide et efficace de la cellule face aux différents stimuli. Cette amplification s'explique par une plus grande abondance de la protéine en aval de son régulateur (Errede et al., 1995). Chez les mammifères, on retrouve quatre groupes distincts de MAPK conventionnelles, soit Erk1 et Erk2, Jnk 1, 2 et 3 (c-Jun N-terminal kinase), p38- α , - β , - γ et - δ et Erk5 (Chang & Karin, 2001). Il existe également trois autres groupes de MAPK considérées comme atypiques, soit Erk7/8, Nlk (nemo-like kinase), Erk3/4 (Cargnello & Roux, 2011). Ceux-ci présentent une régulation et des fonctions distinctes des MAPK conventionnelles et ne seront pas discutés ici.

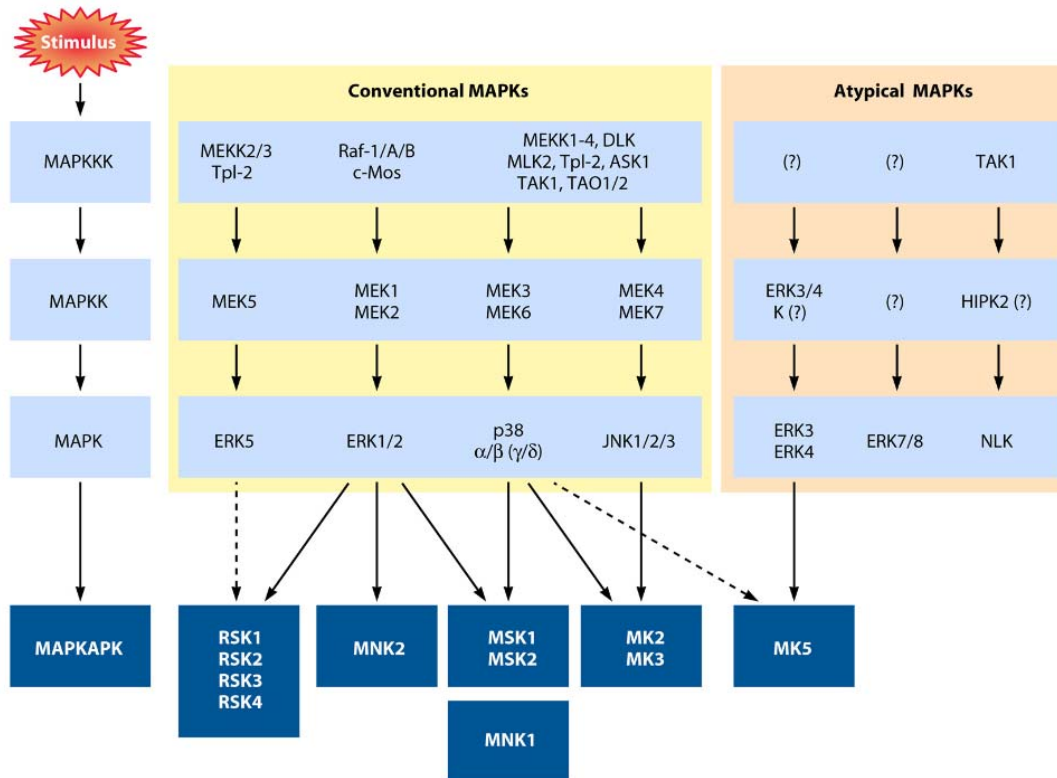


Figure 7. Les différentes cascades de signalisation.

Plusieurs stimuli vont activer les cascades de signalisation des MAPK suite à la phosphorylation en série des trois kinases (MAPKKK, MAPKK et MAPK). Les MAPKs vont ensuite activer d'autres protéines en amont agissant sur le métabolisme de la cellule (Cargnello & Roux, 2011).

1.4.2.1. Le module MAPK ERK1/2

ERK1 est la première MAPK à avoir été identifiée et clonée chez les mammifères. Celle-ci avait été caractérisée comme étant phosphorylée sur les résidus thréonine et tyrosine en réponse à des facteurs de croissance (Kazlauskas & Cooper, 1988; Ray & Sturgill, 1988). Les MAPK ERK1 et 2 présentent une homologie de 85% de leur séquence en acides aminés (Pearson et al., 2001). L'expression des MAPK ERK1 et 2 est ubiquitaire dans la cellule et varie selon le type de tissu (Pearson et al., 2001). ERK1/2 sont activées principalement par des mitogènes et des facteurs de croissance (Junttila, Li, & Westermarck, 2008), mais également par des ligands pour les récepteurs aux protéines G, des cytokines, le stress osmotique et la désorganisation des microtubules (Raman, Chen, & Cobb, 2007). Le module ERK1/2 consiste en une MAPKKK correspondant à une isoforme Raf (A-Raf, B-Raf ou Raf-1), une MAPKK correspondant à MEK1 ou MEK2 et la MAPK ERK1/2. Les isoformes Raf sont les MAPKKK principales, malgré l'existence de quelques MAPKKK spécifiques à certains types cellulaires ou stimuli. Le module ERK1/2 est principalement activé par des récepteurs se retrouvant à la surface cellulaire. Par contre, il existe une pléiade de protéines pouvant phosphoryler Raf dépendamment de la source du stress. L'activation de ERK1/2 pourrait toutefois présenter une cascade directe avec Raf. En effet, Raf semble capable de phosphoryler uniquement la MAPKK MEK1 et 2 (Kyriakis et al., 1992). Par contre, MEK1/2 peut tout de même être phosphorylée par d'autres facteurs tels que PAK et MEKK1-3 (Junttila et al., 2008). MEK1/2 phosphoryle ensuite les deux sites d'activation du domaine kinase de la MAPK ERK1/2, soient les résidus thréonine et tyrosine séparés par un résidu glutamate (motif TEY) entraînant une augmentation d'environ 1000 fois de son activité (Prowse, Hagopian, Cobb, Ahn, & Lew, 2000). Une fois activée, ERK1/2 interagit avec de nombreux substrats en fonction de sa localisation dans la cellule. En effet, la MAPK ERK1/2 peut demeurer dans le cytoplasme, mais peut également transiter à la membrane plasmique, interagir avec le cytosquelette ou transloquer dans le noyau pour moduler des facteurs de transcription en fonction des partenaires protéiques associés à ERK1/2 (Cargnello & Roux, 2011). ERK1 et 2 jouent un rôle dans diverses fonctions biologiques, telles que la prolifération et la croissance cellulaires, la différenciation cellulaire, la survie et l'apoptose (Cargnello & Roux, 2011; Junttila et al., 2008) [Figure 8].

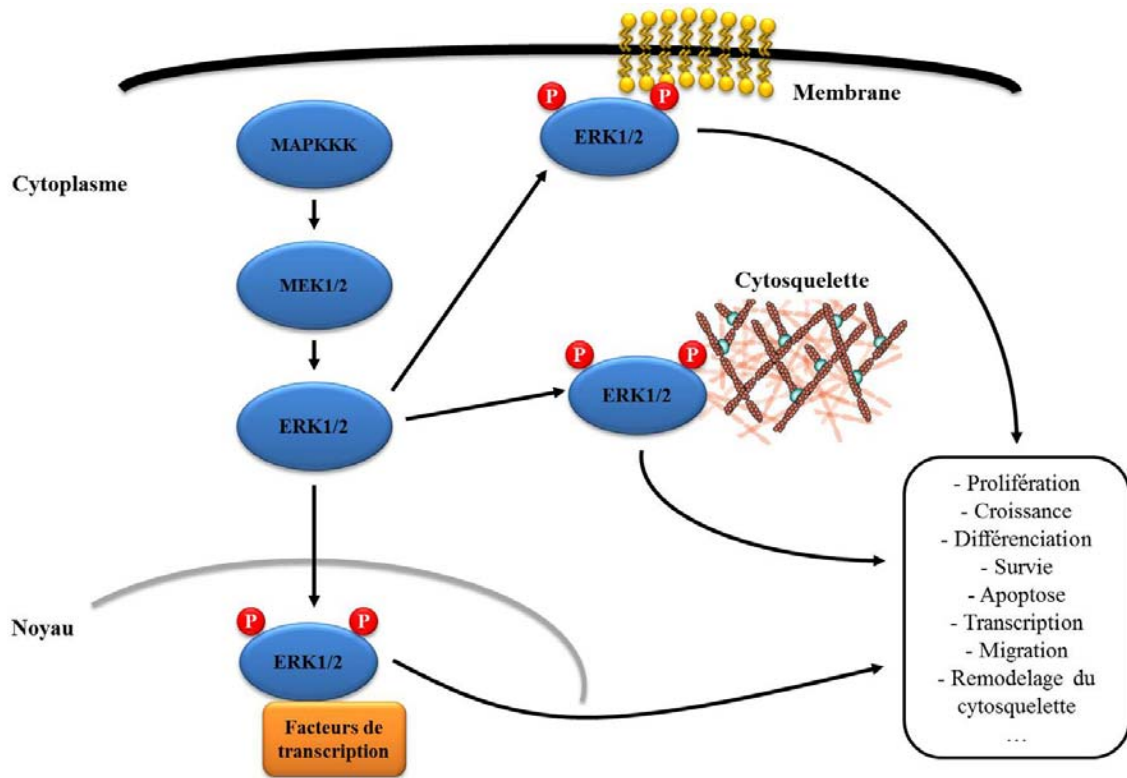


Figure 8. Module MAPK ERK1/2

Suite à son activation, la MAPK ERK1/2 interagit avec de nombreux substrats dépendamment de sa localisation cellulaire. Selon celle-ci, la MAPK ERK1/2 pourra agir sur plusieurs fonctions biologiques.

1.4.2.2. Le module MAPK p38

Il existe quatre isoformes de la MAPK p38 chez les mammifères : α , β , γ et δ . Parmi ces différentes isoformes, p38 α est la mieux caractérisée et est exprimée dans la plupart des types cellulaires. Initialement, la MAPK p38 α fut identifiée comme un polypeptide de 38kDa subissant une phosphorylation du résidu tyrosine suite à un traitement avec des endotoxines et un choc hypertonique (Han, Lee, Bibbs, & Ulevitch, 1994). Par la suite, les isoformes p38 β (Jiang et al., 1996), p38 γ (Lechner, Zahalka, Giot, Moller, & Ullrich, 1996) et p38 δ (Goedert, Cuenda, Craxton, Jakes, & Cohen, 1997) ont été identifiés. Ceux-ci sont exprimés en fonction du type cellulaire. p38 est activée par une pléthore de stimuli tels que des cytokines, des pathogènes, plusieurs stress cellulaires et environnementaux, ainsi que des mitogènes (Junttila et al., 2008). Ces multiples facteurs d'activation pourraient expliquer le nombre élevé de MAPKKK, dont MLK, ASK1 et TAK1 (Cheung, Campbell, Nebreda, & Cohen, 2003; Gallo & Johnson, 2002; Ichijo et al., 1997) qui peuvent activer les MAPKK MKK3 et 6. Les isoformes p38 sont activées selon leur affinité pour leur MAPKK respective, c'est-à-dire que MKK3 active p38 α et β , alors que MKK6 peut activer les quatre isoformes (Enslin, Brancho, & Davis, 2000). L'activation de p38 s'effectue via la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine séparés par une glycine (motif TGY) dans le domaine kinase de leur boucle d'activation (Cuenda & Rousseau, 2007). Il est également possible d'observer une activation indépendante des MKK3 et 6. En effet, chez les lymphocytes T, le récepteur TCR (T-cell antigen receptor) peut activer une tyrosine kinase capable de phosphoryler un résidu tyrosine ne correspondant pas au résidu Y précédent. Cette phosphorylation provoque alors un changement de conformation qui active p38 α et permet une autophosphorylation de son motif TGY (Salvador et al., 2005). Suite à leur activation, les MAPK p38 peuvent agir directement dans le cytoplasme, mais également se déplacer dans le noyau. La MAPK p38 est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques, particulièrement dans la prolifération et la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration et la transformation de cellules cancéreuses. p38 joue également un rôle important dans la réponse immunitaire et inflammatoire en induisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Cargnello & Roux, 2011; Cuenda & Rousseau, 2007; Tibbles & Woodgett, 1999) [Figure 9].

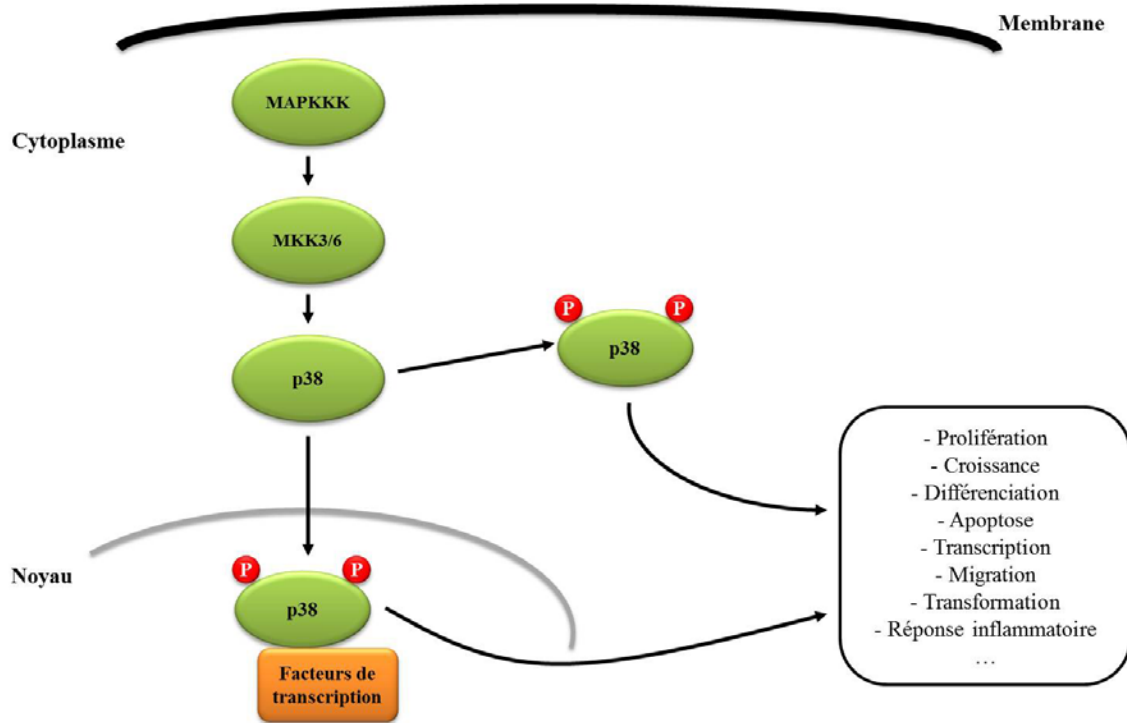


Figure 9. Module MAPK p38

Suite à son activation, la MAPK p38 interagit avec de nombreux substrats dépendamment de sa localisation cellulaire. Selon celle-ci, la MAPK p38 pourra agir sur plusieurs fonctions biologiques.

1.4.2.3. Le module MAPK JNK1/2/3

Le premier membre de la famille JNK, également connu sous la dénomination SAPK (Stress-activated protein kinase) a été identifié sous la forme de MAP-2 kinase activée par la cycloheximide (Kyriakis & Avruch, 1990). Il existe trois différents isoformes JNK, soit JNK1, 2 et 3 qui ont subséquemment été clonés (Kyriakis et al., 1994). Ces isoformes partagent 85% d'homologie et sont généralement exprimées dans tous les tissus, à l'exception de JNK3 qui semble être restreint au tissu neuronal, aux testicules et aux cardiomyocytes (Bode & Dong, 2007). JNK est généralement activé par des stimuli similaires à ceux du module MAPK p38, tels que les cytokines et le stress cellulaire (Junttila et al., 2008). Ces stimuli activent un nombre élevé de MAPKKK, par exemple ASK1, HPK1, MLK3, TAK1 et TPL-2 (Weston & Davis, 2007). Ces MAPKKK vont ensuite phosphoryler les MAPKK spécifiques au module MAPK JNK, soit les MAPKK MKK4 et 7. Comme les MAPK mentionnées précédemment, JNK sera ensuite activé par la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine séparés par une proline du motif TPY dans la boucle d'activation (Junttila et al., 2008). Cependant, il semble que le site d'activation varie selon le type de MAPKK impliqué. MKK4 a une prédilection pour le résidu tyrosine, alors que MKK7 est plus spécifique au résidu thréonine. L'activation de JNK lors de différents stress cellulaires dépend donc d'une coopération entre ces 2 MAPKK (Lawler, Fleming, Goedert, & Cohen, 1998). Les fonctions biologiques modulées par le module MAPK JNK sont également similaires à celles impliquées par le module MAPK p38 (Tibbles & Woodgett, 1999).

1.4.2.4. Le module MAPK ERK5

La MAPK ERK5, également connu sous le nom de BMK1 (Big MAP kinase 1) possède deux fois la taille des MAPK précédentes (≈ 100 kDa). Cette MAPK possède un domaine kinase similaire à celui de la MAPK ERK1/2, mais présente un domaine de signalisation nucléaire la différenciant des autres MAPK. Le module MAPK ERK5 peut être activé par des facteurs de croissance, du sérum, le stress oxydatif et l'hyperosmolarité. Il existe plusieurs MAPKKK impliquées dans la cascade d'activation, mais les plus connues sont MEKK2 et 3 (Wang, Finegan, et al., 2006). Celles-ci ne sont toutefois pas exclusives à la MAPK ERK5. Ces MAPKKK vont phosphoryler la MAPKK MEK5, qui semble être l'unique MEK pouvant activer la MAPK ERK5. Tout comme les MAPK ERK1 et 2, ERK5 sera

phosphorylé sur les résidus thréonine et tyrosine du motif TEY (Cargnello & Roux, 2011; English, Pearson, Baer, & Cobb, 1998). ERK5 est localisé dans le cytoplasme et se transporte dans le noyau suite à son activation. Le module MAPK ERK5 semble être principalement impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire (Cargnello & Roux, 2011; Wang, Finegan, et al., 2006).

1.4.2.5. Seuil limite

La propriété des MAPK d'être phosphorylées sur deux résidus avant d'être activées dans la cellule permet de développer le concept de seuil limite. Par exemple, dans le cas des kinases ERK1/2, celles-ci sont préalablement phosphorylées sur leur résidu tyrosine avant d'initier la phosphorylation du résidu thréonine (Ferrell & Bhatt, 1997). Cette phosphorylation « non processive » force l'établissement d'un seuil limite où les protéines phosphorylées en tyrosine ne sont pas actives, mais doivent s'accumuler dans la cellule, avant la phosphorylation suivante. Suite à l'atteinte du seuil limite, les protéines monophosphorylées sont rapidement converties dans leur état actif suite à la deuxième phosphorylation. Cette étape pourrait permettre une coopération dans l'activation des MAPK, ainsi qu'une modulation plus fine des cascades par d'autres événements de signalisation (Pearson et al., 2001).

1.4.2.6. Activation transitoire vs soutenue

L'organisation temporelle de l'activité des MAPK joue un rôle important dans la réponse biologique spécifique des cellules face aux différents stimuli. En effet, les MAPK présentent des patrons d'activation qui peuvent fluctuer selon le type de stress et la réponse offerte par la cellule. Par exemple, la MAPK p38 présente généralement une activation transitoire (Cuenda & Rousseau, 2007), alors que ERK1/2 peut montrer une activité enzymatique transitoire ou soutenue (Alam & Gorska, 2011). La variation de la réponse des MAPK peut avoir des conséquences complètement différentes dans la cellule. En effet, pour les cellules PC12, l'activation de ERK1/2 peut engendrer deux réponses biologiques opposées, soit une prolifération cellulaire ou la différenciation de celles-ci (Schaeffer & Weber, 1999). Dans le cas d'une activation soutenue suivie d'une translocation au noyau de ERK1/2, les cellules PC12 entrent dans un processus de différenciation. À l'opposé, lorsque l'activité de la

MAPK est transitoire, les cellules débutent un cycle de prolifération cellulaire (Marshall, 1995). Cette variation dans l'activation des MAPK dépend de l'induction de voies de signalisation rétroactives. La régulation de la déphosphorylation des MAPK permet de maintenir une sensibilité aux différents stimuli et implique des phosphatases spécifiques à chaque kinase permettant l'inactivation de celles-ci (Lewis, Shapiro, & Ahn, 1998).

1.4.2.7. MAPKAPK (MAPK activated protein kinases)

Une fois activés, les modules MAPK conventionnels vont phosphoryler différents acteurs tels que les MAPKAPK [Figure 7]. Lorsque les MAPK sont transloquées au noyau, celles-ci pourront moduler différents facteurs de transcription. La localisation cytoplasmique de certaines MAPK leur permet également de réguler l'expression de plusieurs gènes par des mécanismes post-transcriptionnels et traductionnels qui impliquent des cibles cytoplasmiques, telles que les complexes ribosomiaux et des protéines liant l'ARN. La localisation de ces protéines de signalisation permet ainsi d'augmenter la spécificité de la transduction du signal (Chang & Karin, 2001). La modulation subséquente exercée par les MAPK peut également mener à une convergence des cibles, telle que le groupe de protéines activées par les MAPK nommé MAPKAPK.

Tableau 3. Les fonctions biologiques et les substrats des MAPKAPK.

(Cargnello & Roux, 2011)

RSK1-4	MSK1/2	MNK1/2	MK2/3	MK5
<p>Gene transcription SRF, Nur77, c-Fos, ER81, TIF-1A, ERα, p65, ATF4</p> <p>Cell proliferation c-Fos, p27^{kip1}, MAD1, LKB1, Myt1, Emi2, GSK3</p> <p>Cell growth rpS6, TSC2, Raptor, eIF4B, LKB1, GSK3, eEF2 kinase</p> <p>Cell survival C/EBPβ, DAPK</p> <p>Others NHE-1, Filamin A, RanBP3, YB-1, nNOS, AS160</p>	<p>Gene transcription CREB, ATF1, p65, ER81, p53</p> <p>Nucleosomal response Histone H3, HMGN1</p>	<p>mRNA translation eIF4E, eIF4G</p> <p>Others hnRNP A1, PSF, cPLA₂, Spry2</p>	<p>Actin remodeling and cell migration Hsp25/27, p16-Arc, LSP-1, CapZIP, vimentin, $\alpha\beta$-crystallin</p> <p>Cytokine production hnRNP A0, TTP, PABP1, HuR, BRF1</p> <p>Gene transcription BMI1, SRF, ER81, E47</p> <p>Cell cycle control CDC25B, CDC25C, HDM2, TSC2</p>	<p>Tumor suppression p53?</p> <p>Actin remodeling Hsp25/27?</p>

Cette famille de protéines est composée de 11 membres qui sont activées par différents stimuli en fonction des MAPK induites en amont et représentent une cascade de signalisation supplémentaire. En fonction de leur domaine d'activation, les MAPKAPK sont divisés en cinq groupes distincts, les RSK, MSK, MNK, MK2/3 et MK5 [Figure 7]. Leurs rôles biologiques vont varier en fonction de leur activation par les différentes MAPK. Ceux-ci sont résumés dans le tableau 3.

1.5. Modulation de l'activité et de l'expression du canal ENaC

L'activation des différentes voies de signalisation suite à la réponse cellulaire au stress entraîne une modulation de l'activité et de l'expression du canal ENaC. Sa régulation est complexe et implique plusieurs mécanismes qui sont décrits ci-dessous.

1.5.1. Modulation de l'activité du canal

Le canal ENaC est un canal constitutivement ouvert avec une demi-vie moyenne de 1h qui peut varier selon le niveau de modifications post-traductionnelles affectant les régions N- et C-terminales du canal (Eaton, Malik, Bao, Yu, & Jain, 2010). La région N-terminale régule la conductance et l'ouverture du canal du côté cytoplasmique (Grunder et al., 1997). La région C-terminale, via son domaine PY est impliquée dans la dégradation du canal par des protéines telle que Nedd-4, une E3 ubiquitine ligase. Nedd-4 reconnaît le motif PY présent sur les sous-unités β et γ ce qui entraîne l'ubiquitination du canal (Staub et al., 1997) suivie d'une endocytose « clathrine- (Wang, Traub, et al., 2006) ou cavéoline-dépendante » (Lee et al., 2009). Le destin du canal dépendra du type d'ubiquitination subie. En effet, la polyubiquitination du canal ENaC provoque sa dégradation par le protéasome (Malik et al., 2005), alors qu'une mono- ou une multi-ubiquitination favorise sa dégradation dans les lysosomes (Wiemuth, Ke, Rohlf, & McDonald, 2007). Différentes déubiquitinases interviennent également dans le recyclage des canaux internalisés. Les déubiquitinases USP8 et UCH-L3 vont bloquer la dégradation des sous-unités ENaC suite à leur endocytose, alors que USP2-45 agit principalement sur la population d'ENaC à la surface membranaire, empêchant leur internalisation (Butterworth et al., 2007; Oberfeld et al., 2011; Zhou et al., 2013).

Le domaine extracellulaire présente un site de clivage par la furine situé après le domaine transmembranaire M1 qui permet à la protéase de cliver le canal dans l'appareil de Golgi et ainsi de l'activer (Rossier & Stutts, 2009). D'autres protéases clivent également le canal à la surface cellulaire ce qui permet de maximiser son activité (Chraïbi, Vallet, Firsov, Hess, & Horisberger, 1998; Kleyman, Carattino, & Hughey, 2009).

La présence de phospholipides membranaires affecte l'activité du canal dans les domaines N- et C-terminaux (Pochynyuk et al., 2007). Les phospholipides phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) et phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) présents dans la membrane cytoplasmique interagissent de façon électrostatique aux charges cationiques des lysines présentes sur le deuxième domaine intracytoplasmique du canal, permettant de stimuler l'activité du canal. La stimulation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) en augmentant la production de PIP₃ stimule ENaC, alors que l'activation de certains récepteurs, tel que le récepteur purinergique P2Y₂, en activant la phospholipase C diminue la concentration membranaire de PIP₂ et conséquemment l'activité de ENaC (Ma, Saxena, & Warnock, 2002; Pochynyuk, Tong, Staruschenko, Ma, & Stockand, 2006). Les phospholipides modulent également l'activité du canal via son clivage protéolytique. Par exemple, le PIP₂ favorise un changement allostérique du canal provoquant son activation par les protéases. Les lysines chargées positivement dans le domaine N-terminal de la sous-unité γ interagissent avec les charges négatives du PIP₂ entraînant un changement de conformation du domaine transmembranaire qui favorise l'accessibilité du site de clivage pour les protéases (Kota et al., 2014).

Dans les cellules épithéliales pulmonaires, les glucocorticoïdes sont importants dans la modulation de l'activité du canal ENaC, alors que dans les cellules épithéliales rénales il s'agit plutôt de l'aldostérone (Eaton et al., 2010). Les stéroïdes entraînent cependant une réponse similaire en deux phases sur l'activité du canal ENaC. La phase précoce active la PI3K afin de produire du PIP₃ ce qui entraîne une augmentation rapide de l'activité du canal ENaC (Helms et al., 2005; Paunescu, Blazer-Yost, Vlahos, & Helman, 2000). La phase tardive affecte les mécanismes de transport et de dégradation du canal. Les glucocorticoïdes et l'aldostérone augmentent l'expression et l'activité de la « Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 » (Sgk1). Cette kinase cible Nedd-4 qui présente une moins grande affinité sous sa forme phosphorylée pour le motif PY du canal ENaC (Bhalla et al., 2005). En conséquence, Sgk1

réduit l'internalisation et la dégradation des canaux à la membrane ce qui augmente le transport de Na⁺.

La phosphorylation du canal ENaC est également impliquée dans la modulation de son activité. La MAPK ERK1/2 phosphoryle les sous-unités β et γ ENaC ce qui favorise l'interaction avec Nedd-4 et entraîne une dégradation accrue du canal à la membrane (Shi et al., 2002). À l'opposé, la phosphorylation induite par la caséine kinase 2 (CK2) protège le canal ENaC contre l'ubiquitination par Nedd-4 (Bachhuber et al., 2008).

La modulation de l'activité du canal ENaC et de son expression à la surface membranaire est bien détaillée dans la littérature. Il existe toutefois moins de données sur la modulation de l'expression de l'ARNm ENaC, malgré le fait qu'il s'agit d'un facteur prépondérant dans les lésions pulmonaires, particulièrement dans le cas de la sous-unité α . Pour cette raison, nous allons explorer plus en détail la régulation de l'expression génique du canal α ENaC.

1.5.2. Modulation transcriptionnelle

Le promoteur du gène α ENaC présente certaines particularités. En effet, le promoteur α ENaC, autant chez l'humain que le rat ou la souris, ne présente pas de motifs TATA ou CCAAT habituellement retrouvés pour l'initiation de la transcription (Chow, Wang, Plumb, O'Brodovich, & Hu, 1999; Dagenais et al., 2001b; Otulakowski, Rafii, Bremner, & O'Brodovich, 1999). Par contre, comme pour la majorité des gènes dépourvus de motif TATA, la séquence 5' à proximité du gène α ENaC présente un contenu riche en guanine et en cytosine (GC). Chez l'humain, on trouve trois régions riches en GC, deux à proximité du site d'initiation de la transcription et un troisième en amont. L'absence de motif TATA pourrait également expliquer la présence de multiples sites d'initiation de la transcription (Chow et al., 1999). Chez le rat et la souris, le gène α ENaC contient deux sites d'initiation ayant pour conséquence la production de deux ARNm avec des régions 5' non traduites de tailles différentes (~450bp) sans impact sur la protéine (Dagenais et al., 2001b; Otulakowski et al., 1999). Chez l'humain, on observe également la présence de deux transcrits, cependant ce mécanisme provient plutôt d'un épissage différentiel. En effet, le gène α hENaC présente deux exons, 1A et 1B, séparés par un intron. Chacun de ces transcrits posséderait sa propre région promotrice avec la présence d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) en amont de

l'exon 1A et un élément SP-1 pour l'exon 1B. Le variant α hENaC1 serait dépendant de la région GRE, alors que le variant α hENaC2 serait sous le contrôle de SP1 (Xu & Chu, 2007). Ce site de liaison pour le facteur de transcription SP-1 semble être essentiel pour l'expression du transcrit α hENaC2 et sa mutation entraîne une chute de l'activité du promoteur (Chu, Cockrell, & Ferro, 2003). Cette observation a été également retrouvée dans les cellules mIMCD3 provenant de tubules rénaux murins. SP-1 est impliqué dans l'expression génique de base de α mENaC où l'aldostérone augmente également l'affinité de SP-1 avec son site de liaison présent sur le promoteur (Yu, Kong, & Kone, 2013a). L'étude des séquences promotrices du gène α ENaC a permis de révéler la présence de plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription. Les motifs GRE et SP-1 sont retrouvés dans les trois espèces mentionnées (Dagenais et al., 2001b; Otulakowski et al., 1999; Xu & Chu, 2007). Chez le rat, on retrouve également des sites de liaison pour les facteurs de transcription de la famille ETS et PEA3 connus pour être modulés par les voies de signalisation des MAPK (Otulakowski et al., 1999). Chez la souris, le promoteur α ENaC présente deux sites consensus pour l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) liant le facteur de transcription CREB. On trouve également des séquences consensus pour la liaison d'AP-1, AP-2, de GATA-1, un site de liaison dégénéré pour NF- κ B, ainsi que des sites d'attachement pour les facteurs ETS et PEA3 comme chez le rat (Dagenais et al., 2001b). Toujours chez la souris, en plus du motif GRE mentionné, on retrouve plusieurs motifs incomplets GRE pouvant répondre partiellement aux corticostéroïdes (Kohler et al., 2001).

1.5.2.1. Élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE)

Le motif GRE est un élément fondamental dans la modulation de l'expression du messenger α ENaC sous l'effet des glucocorticoïdes. La dexaméthasone, un corticostéroïde synthétique utilisé dans le traitement du SDRA, stimule l'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules fœtales humaines (Venkatesh & Katzberg, 1997), les cellules alvéolaires humaines A549 (Wang et al., 2000) et les cellules épithéliales alvéolaires primaires de rat (Dagenais et al., 2001b) avec un effet maximal après 24h. Cette augmentation est indépendante de la stabilité du transcrit, mais agit directement sur le promoteur. En effet, le complexe formé du récepteur aux glucocorticoïdes et de la dexaméthasone interagirait avec le promoteur α ENaC (Venkatesh & Katzberg, 1997). Cette hypothèse a été confirmée; la suppression de la région

proximale contenant le motif GRE entraîne une abolition complète de l'induction de l'expression de l'ARNm α ENaC par la dexaméthasone dans les cellules A549 (Chow et al., 1999) et les épithéliales alvéolaires primaires de rat (Dagenais et al., 2001b). Les effets importants de la dexaméthasone sur l'expression des ARNm α ENaC peuvent être augmentés par la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction. En effet, la cycloheximide renforce la surexpression du messenger par la dexaméthasone (Dagenais et al., 2001b; Itani, Cornish, Liu, & Thomas, 2003). Dans les cellules épithéliales rénales MDCK-C7, ce phénomène de superinduction est provoqué par l'activation de la voie de signalisation MAPK p38 qui implique possiblement des co-activateurs (Mahadevan & Edwards, 1991). L'aldostérone, un minéralocorticoïde impliqué dans l'homéostasie rénale, stimule également l'expression de l'ARNm α ENaC (May, Puoti, Gaeggeler, Horisberger, & Rossier, 1997) via le motif GRE présent sur le promoteur grâce à la formation d'un complexe aldostérone/récepteur aux glucocorticoïdes ou aldostérone/récepteur aux minéralocorticoïdes (Mick et al., 2001).

Le motif GRE n'est pas seulement impliqué dans la stimulation de la transcription du gène α ENaC. L'activation transitoire de la voie de signalisation de Ras/ERK1/2 par la molécule TPA provoque une chute de l'ARNm α ENaC dans les cellules parotides de rat. Cette modulation du transcrit α ENaC, indépendante de la stabilité, agit via une inhibition de l'activité de son promoteur dans une région incluant le motif GRE (Lin, Zentner, Ho, Kim, & Ann, 1999; Zentner, Lin, Wen, Kim, & Ann, 1998). L'activation de Ras/ERK1/2 entraîne une interaction entre HMGI-C, un facteur de transcription qui altère la conformation de l'ADN, et le facteur de transcription PIAS3. Cette interaction inhibe l'augmentation de la transcription du gène α ENaC impliquant le motif GRE stimulé par la dexaméthasone (Zentner et al., 2001). Le H₂O₂ peut également inhiber l'effet de la dexaméthasone sur la transcription en agissant sur le motif GRE suite à l'activation de la voie MAPK ERK1/2 (Wang et al., 2000). La cytokine pro-inflammatoire TNF- α entraîne également une chute de l'expression transcriptionnelle du gène α ENaC selon deux mécanismes distincts. La cytokine agit selon un mécanisme « stéroïde-dépendant » où le TNF- α inhibe fortement la transcription du gène α ENaC induite par la dexaméthasone via le motif GRE. Le TNF- α réprime également la transcription par un mécanisme stéroïde-indépendant, où la cytokine peut inhiber la transcription malgré l'absence du motif GRE dans le promoteur [*Observations non publiées*]. L'interleukine-1 réprime également l'activité du promoteur suite à l'activation de la voie de signalisation MAPK p38.

Cette activation provoque une diminution de la translocation du complexe GR au noyau, l'empêchant ainsi de se fixer au motif GRE (Roux et al., 2005). Le condensat de fumée de cigarette (CFC) abolit également la transcription du gène α ENaC via la région GRE dont le retrait élimine l'effet délétère du condensat sur le promoteur. L'action du CFC s'effectue indépendamment de son effet sur le stress oxydatif, puisque l'utilisation d'un antioxydant n'empêche pas l'action inhibitrice du CFC (Xu, Ferro, & Chu, 2007).

La cytokine TGF- β inhibe l'expression transcriptionnelle du gène α ENaC par l'activation transitoire de la MAPK ERK1/2 dans les cellules épithéliales alvéolaires de rat selon un mécanisme dépendant du motif GRE (Frank et al., 2003). Un autre mécanisme a aussi été suggéré dans les tubules rénaux murins pour expliquer la modulation négative du gène α ENaC par le TGF- β . L'activation de la voie de signalisation des Smads dans les cellules mpkCCD provoque également une inhibition de l'expression du transcrit α ENaC possiblement par l'action de Smad4. Sa surexpression entraîne une inhibition de l'activité transcriptionnelle. Ainsi, Smad4 pourrait agir directement sur le promoteur α ENaC où un site de liaison Smad a été identifié (Chang et al., 2008).

1.5.2.2. Élément de réponse à l'AMPc (CRE)

On retrouve un élément de réponse à l'AMPc (CRE) sur la région promotrice du gène α ENaC, par contre, son importance dans la modulation transcriptionnelle n'est pas bien définie. L'AMPc, un second messenger, induit l'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires de rat avec un effet maximal à 8h (Dagenais et al., 2001b). L'induction transitoire de l'expression génique α ENaC observée dans ces cellules correspond au patron d'activation retrouvé au niveau des gènes modulés par le motif CRE. Bien que ces résultats suggèrent une activation directe de l'activité du promoteur par CREB, les tests de l'activité du promoteur avec des régions de 1,56 kb et 3 kb n'ont pas permis de montrer une activation directe de la transcription du gène par l'AMPc (Dagenais et al., 2001b; Kohler et al., 2001).

L'AMPc induit également la transcription du gène α ENaC dans les cellules SMG-C6, une lignée épithéliale des glandes submandibulaires. Cette augmentation de la transcription du gène α ENaC survient après 24h de traitement. Les longs délais d'activation rapportés pour la stimulation des ARNm α ENaC par l'AMPc (de 8h à 24h) suggèrent donc que l'activation du

promoteur α ENaC se fait de façon indirecte via l'activation d'autre(s) gène(s), par exemple Sgk1 (Vasquez et al., 2008), ou que l'AMPc pourrait moduler l'expression des ARNm α ENaC en modulant la stabilité du transcrit (Dagenais et al., 2001b; Mustafa et al., 2008).

1.5.2.3. Dot1a/AF9 – Aldostérone

L'aldostérone n'induit pas seulement l'expression de l'ARNm α ENaC via les récepteurs aux minéralocorticoïdes ou aux glucocorticoïdes, mais également via le complexe Dot1a/AF9. Ce complexe est formé de l'histone méthyltransférase Dot1a et du facteur de transcription AF9. Ce complexe favorise l'hyperméthylation de l'histone H3 provoquant la répression du promoteur α ENaC (Reisenauer, Wang, Xia, & Zhang, 2010; Zhang, Xia, Reisenauer, Hemenway, & Kone, 2006; Zhang et al., 2013). Un autre mécanisme de répression transcriptionnelle de α ENaC via AF9 est le recrutement de Rnf2 et la mono-ubiquitination de l'histone H2A. En effet, il a été montré que le recrutement de Rnf2 sur le site de liaison AF9 du promoteur α ENaC provoque son inhibition (Yu, Kong, & Kone, 2013b). Le mécanisme d'action de l'aldostérone sur ce complexe n'est pas totalement élucidé, mais l'hormone agirait en interférant avec la formation du complexe Dot1a/AF9 ce qui favorise l'hypométhylation de l'histone H3 et par conséquent, une activation de la transcription. L'aldostérone interfère également avec la sirtuine 1 (Sirt1), une histone déacétylase dépendante du NAD^+ , qui inhibe l'expression du gène α ENaC indépendamment de son activité déacétylase. Sirt1 interagit avec le complexe Dot1a et favorise son action inhibitrice sur le promoteur α ENaC (Zhang, Li, Cruz, & Kone, 2009).

Enfin, l'aldostérone pourrait agir via l'action de la Sgk1. La phosphorylation de la protéine AF17 par Sgk1, dont l'expression et l'activation sont favorisées par l'aldostérone, entraîne un mécanisme de compétition entre AF17 et AF9 pour former un complexe avec Dot1a. La création du complexe Dot1a/AF17 favorise la translocation du complexe vers le cytoplasme, ce qui lève par le fait même la répression du promoteur dépendante de Dot1a (Reisenauer et al., 2009). Les produits de glycation avancée (AGE) induisent à l'instar de l'aldostérone une augmentation de la transcription de l'ARNm α ENaC, qui se fait par l'activation de Sgk1 indépendamment des voies de signalisation des MAPK (Chang et al., 2007).

1.5.2.4. Autres modulations transcriptionnelles

La transcription du gène α ENaC est également modulée transcriptionnellement par le rythme circadien. La protéine circadienne Per1 régule positivement la transcription basale du gène, ainsi que celle induite par l'aldostérone. Cette modulation résulte d'interactions avec des éléments E-box situés sur le promoteur α ENaC (Richards et al., 2012; Richards, Jeffers, All, Cheng, & Gumz, 2013).

La modulation de l'expression du transcrit α ENaC n'est pas seulement sous le contrôle de facteurs externes, mais implique également des canaux ioniques. Dans les cellules épithéliales alvéolaires de rat, l'activation des canaux potassiques KVLQT1 et K_{ATP} favorise l'expression de l'ARNm α ENaC par une augmentation de l'activité de son promoteur. À l'opposé, l'inhibition de ces canaux entraîne une chute de l'expression génique suite à l'activation de la voie de signalisation MAPK ERK1/2 (Bardou et al., 2012). L'activation de cette voie de signalisation par le TGF- α et l'EGF provoque également l'inhibition de l'expression du transcrit α ENaC (Liu, Duke, Malik, Yue, & Eaton, 2009).

Les LPS inhibent la transcription de l'ARNm α ENaC via l'activation de la voie de signalisation MAPK ERK1/2 et l'inhibition de la MAPK ERK5. Il a été proposé que cette inhibition pourrait impliquer une action directe de NF- κ B sur le promoteur α ENaC (Baines et al., 2010). Cependant, cette hypothèse devra être confirmée, puisque l'interaction de NF- κ B n'a été démontrée qu'avec la séquence consensus dégénérée sans observer l'effet direct sur l'activité du promoteur α ENaC. De plus, l'inhibition de NF- κ B ne peut bloquer l'effet des LPS sur l'expression de l'ARNm α ENaC suggérant l'implication d'autres mécanismes de modulation dans les cellules épithéliales alvéolaires [*Observations non publiées*].

1.5.3. Modulation post-transcriptionnelle

Suite à sa transcription, l'ARNm va subir différentes modifications post-transcriptionnelles qui vont affecter son destin dans la cellule. Sous le terme de régulation post-transcriptionnelle, on inclut tous les mécanismes qui affectent directement un transcrit après sa transcription. Parmi ces mécanismes, on note l'ajout de la coiffe de 7-méthylguanosine sur le premier nucléotide de l'ARNm, l'épissage (alternatif ou non) du transcrit et enfin la polyadénylation en 3' d'environ 200 résidus d'adénosine. À ces modifications de l'ARNm, s'ajoutent également tous les mécanismes pouvant affecter soit la

stabilité du transcrit dans la cellule, soit la traduction de celui-ci. L'ensemble de ces phénomènes est observé dans la modulation post-transcriptionnelle complexe de l'ARNm α ENaC.

1.5.3.1. Modulation de la traduction

La régulation de l'expression de l'ARNm α ENaC possédant des régions 5' non traduites (5'UTR) de différentes tailles dans plusieurs tissus ou à différents stades du développement embryonnaire suggère l'existence d'une régulation traductionnelle par son 5'UTR. Par exemple, les cellules fœtales expriment l'ARNm α ENaC, malgré le fait que le poumon soit un organe sécrétoire à ce stade du développement (Smith et al., 2000). À ce stade on retrouve un ARNm de plus longue taille en 5' dans la région non traduite par rapport à ce qui est retrouvé chez l'adulte (Otulakowski et al., 1999). Une analyse par mutagenèse dirigée a ainsi démontré que le 5'UTR de l'ARNm α ENaC joue un rôle dans l'expression traductionnelle du gène α ENaC. Cette analyse a mis en lumière que la région 5'UTR du messenger possédait des domaines qui activaient ou inhibaient la traduction et qui pouvaient donc altérer l'expression protéique du gène (Otulakowski, Freywald, Wen, & O'Brodovich, 2001). Cependant, la modulation des différents variants au niveau du 5'UTR durant le développement embryonnaire ne serait pas l'élément déclencheur par lequel le poumon passerait d'un organe sécréteur à un organe d'absorption à la naissance (Banasikowska, Post, Cutz, O'Brodovich, & Otulakowski, 2004a). Cette répression traductionnelle serait plutôt un mécanisme supplémentaire dans la modulation de l'expression du canal ENaC. Les acteurs-clés de la clairance alvéolaire à la naissance seraient plutôt les catécholamines et la tension d'oxygène. En effet, la clairance alvéolaire élevée est favorisée par la présence de catécholamines circulant dans le sang telle qu'observée chez *Cavia porcellus*. De plus, la baisse importante de la clairance alvéolaire observée quelques jours après la naissance corrèle avec la chute d'épinéphrine dans le sang (Finley, Norlin, Baines, & Folkesson, 1998). Parallèlement aux catécholamines, la tension d'oxygène augmente également la conductance du sodium de l'épithélium alvéolaire (Richard et al., 2003) et favorise l'expression du canal ENaC (Otulakowski, Rafii, Harris, & O'Brodovich, 2006).

1.5.3.2. Épissage alternatif

L'épissage alternatif est également un mécanisme post-transcriptionnel observé dans la modulation du canal α ENaC. Chez le rat, deux variants ont été observés où des codons-stop entraînent une perte de 199 et 216 acides aminés de la protéine, ce qui résulte dans un canal ENaC non fonctionnel, lorsqu'exprimé dans l'ovocyte de *Xenopus*, car le canal produit a perdu un de ses domaines transmembranaires essentiels à son activité. (Li, Xu, Guggino, & Snyder, 1995).

Ce type de régulation d'épissage alternatif a également été observé chez la souris. En effet, au cours du développement embryonnaire, on détecte un transcrit α ENaC de 1,2 kb dans le côlon distal. Au cours de la gestation, ce transcrit tronqué est remplacé progressivement par la forme mature de 3,5 kb. Le transcrit de 1,2 kb a perdu le domaine cytoplasmique N-terminal, le premier domaine transmembranaire et une partie du domaine extracellulaire ce qui résulte dans un canal non fonctionnel (Dagenais, Kothary, & Berthiaume, 1997). Cet épissage du transcrit α ENaC est un mécanisme qui empêche probablement les effets délétères d'une réabsorption de Na^+ dans le côlon distal immature durant la gestation.

1.5.3.3. Modulation de la stabilité

Il existe peu d'information sur la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC. La totalité des études effectuées sur l'analyse de la stabilité de l'ARNm utilise des inhibiteurs de la transcription afin de mesurer la demi-vie du transcrit α ENaC. Une revue de la littérature montre que la demi-vie pour l'ARNm α ENaC est estimée entre 8 et 24h [Tableau 4]. À ce jour, très peu de conditions expérimentales sont connues pour moduler la stabilité de l'ARNm α ENaC. Malgré son activation marquée de la transcription, la dexaméthasone diminue la demi-vie du messenger de 15h à 13,1h dans les cellules épithéliales alvéolaires (Dagenais et al., 2001b). Tel que mentionné précédemment, le TNF- α inhibe de 70% l'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires. Cependant, seulement 25% de cette inhibition peut s'expliquer par une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur. La demi-vie du transcrit pour sa part passe de 15h à 10h (Dagenais et al., 2004) faisant du contrôle de la stabilité le mécanisme principal par lequel le TNF- α module le niveau d'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires (Dagenais et al., 2004).

Tableau 4. Estimation de la demi-vie de l'ARNm α ENaC.

Auteur	Méthode	Origine	T_{1/2} (h)	Référence
Zentner, MD	Act. D 5 μ g/mL	Cellules parotides	~ 8 h	(Zentner et al., 1998)
Otulakowski, G	Act. D 5 μ g/mL	Cellules épithéliales pulmonaires fœtales distales	22 h	(Otulakowski et al., 1999)
Mick, VE	Act. D 1 μ M	Cellules MDCK-C7	14 h	(Mick et al., 2001)
Itani, OA	Act. D 1 μ M	Cellules MDCK-C7	~ 9 h	(Itani et al., 2003)
Dagenais, A	Act. D 5 μ g/mL	Cellules épithéliales alvéolaires	15 h	(Dagenais et al., 2004)
Mustafa, SB	Act. D 1 μ M	Cellules SMG-C6 Glande submandibulaire	17 h	(Mustafa et al., 2008)

1.6. Modulation de la stabilité de l'ARNm

La modulation de la stabilité est un mécanisme important dans la régulation de l'expression de l'ARNm α ENaC en condition inflammatoire tel qu'observé avec le TNF- α . Il est donc important de bien définir la stabilité représentée sous la forme de la demi-vie d'un ARNm et comprendre de quelles façons celle-ci peut être modulée.

1.6.1. Définition de la demi-vie d'un ARNm

Les ARNm des cellules eucaryotes sont synthétisés et dégradés par des machineries indépendantes qui sont localisées dans différents compartiments cellulaires. Les ARNm fonctionnels sont localisés dans le cytoplasme où se trouvent les ribosomes permettant la traduction subséquente des transcrits. La synthèse des ARNm s'effectue exclusivement par l'ARN polymérase II et sa machinerie transcriptionnelle dans le noyau (Vannini & Cramer, 2012). La vitesse à laquelle les gènes sont transcrits se définit comme étant le taux de transcription (TR). Le TR est défini par le changement dans la concentration d'ARNm ([ARNm]) durant une période de temps définie (t), comme indiqué dans l'équation 1. Cette

équation correspond à une cinétique d'ordre zéro où TR est indépendant de la concentration en ARNm [ARNm], mais dépendant de la concentration en nucléotides.

Équation 1. Taux de transcription de l'ARNm

$$TR = \frac{d[ARNm]}{dt}$$

Afin de déterminer la mesure de la stabilité d'un ARNm, nous pouvons considérer le cytoplasme comme un réservoir où les molécules d'ARNm sont contenues et dégradées. Il est nécessaire ici de mentionner que c'est la concentration d'ARNm qui est le paramètre clé et non la quantité d'ARNm dans la cellule. Cet aspect est sans importance dans le cas de cellules avec un volume constant. Cependant, cette distinction devient cruciale dans le cas de cellules en croissance ou lors de comparaison de cellules ayant des volumes cytoplasmiques différents. Donc, les ARNm cytoplasmiques seront dégradés par divers mécanismes suivant un taux de dégradation (DR) dépendant de la concentration d'ARNm durant un période de temps définie. Cette cinétique de dégradation est considérée comme étant une cinétique de premier ordre, c'est-à-dire que la vitesse de dégradation sera proportionnelle à la concentration d'un seul réactif, soit l'ARNm (Ross, 1995).

Équation 2. Taux de dégradation de l'ARNm

$$DR = \frac{d[ARNm]}{dt} = k_{decay}[ARNm]$$

La variable k_{decay} représente la constante de dégradation d'un ARNm donné. Cette valeur nous permet ensuite d'obtenir la mesure de la demi-vie pour un ARNm. En effet, la variable k_{decay} est généralement transformée en demi-vie, puisque cette valeur est intuitivement

intelligible. La demi-vie d'un ARNm est définie par le temps requis pour réduire la concentration d'ARNm de la moitié de sa valeur d'origine. La résolution de l'équation 2 par un calcul intégral nous permet donc d'obtenir l'équation 3 définissant la demi-vie ($T_{1/2}$).

Équation 3. Demi-vie d'un ARNm

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{decay}}$$

Ainsi, les taux de transcription et de dégradation définissent conjointement le niveau d'expression d'un ARNm à l'équilibre (steady-state). Une cellule dans un environnement contrôlé présentera un équilibre de l'expression des ARNm où $TR = DR$. Dans le cas d'une modulation suite à différents stress environnementaux de la transcription via l'activité du promoteur, ou de la stabilité, une altération de l'équilibre de l'expression du transcrit a lieu. Ceci mène à une augmentation ou une diminution de la concentration de l'ARNm.

1.6.2. Techniques de mesure de la stabilité

La mesure de la stabilité d'un transcrit est un élément important dans la compréhension de la modulation d'un ARNm et de son impact sur le métabolisme d'une cellule. En effet, une variation dans sa biodisponibilité pourra avoir une conséquence directe sur l'efficacité de la traduction et la quantité de protéines présentes dans la cellule. Pour ces raisons, plusieurs techniques ont été développées afin de déterminer la demi-vie des ARNm. Quelques-unes sont décrites ci-dessous.

1.6.2.1. « Pulse-chase » d'UTP modifiés

Les cellules peuvent utiliser le 4-thiouridine (4sU) et le 4-thiouracile (4tU) comme précurseurs de l'uracile triphosphate (UTP) (Cleary, Meiering, Jan, Guymon, & Boothroyd, 2005; Johnson, Rudin, Blossey, Ilan, & Ilan, 1991; Kenzelmann et al., 2007). Le 4sU peut être incorporé directement dans les cellules de mammifères (Rabani et al., 2011), alors que le 4tU requiert l'expression d'un uracile phosphoribosyltransférase (Friedel & Dolken, 2009). Dans

les deux cas, ces précurseurs nucléotidiques sulfurés présents dans le milieu de culture seront incorporés dans les ARNm nouvellement synthétisés plutôt que l'UTP. Le marquage avec le thio-UTP est effectué sur une période de temps suffisamment long afin de permettre l'incorporation des UTP marqués dans tous les ARNm. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture exempt d'UTP marqué et les ARNm sont récoltés à différents temps. Les ARNm sulfurés sont purifiés à l'aide d'une colonne d'agarose couplé au mercure (Johnson et al., 1991) et hybridés sur une puce à ADN. La concentration d'ARNm peut également être mesurée par PCR. Une courbe de dégradation permettra alors la mesure directe de la demi-vie des ARNm d'intérêt (Munchel, Shultzaberger, Takizawa, & Weis, 2011). Par contre, cette technique présente un inconvénient majeur. Il est possible qu'il y ait un recyclage des UTP marqués dans la cellule suite à la dégradation d'ARNm entraînant une surestimation de la demi-vie.

Pour cette raison, cette technique a été adaptée à une courte période de temps, permettant de marquer uniquement les ARNm nouvellement synthétisés. Ceux-ci sont purifiés comme précédemment et hybridés sur une puce à ADN. Parallèlement, l'ARN total non marqué est également utilisé sur une autre puce à ADN. Le niveau d'ARNm nouvellement synthétisé permet d'obtenir le taux de transcription (TR), alors que l'ARN total permet l'obtention de la concentration d'ARNm ([ARNm]). Avec ces valeurs, il est possible d'obtenir la demi-vie de façon indirecte. En effet, si le TR est considéré constant durant la période de marquage, la [ARNm] obtenue pour la fraction marquée peut être utilisée pour calculer le TR à partir de l'intégration de l'équation 1. Puisque l'état d'équilibre est assumé dans la cellule où $TR=DR$, la détermination simultanée de la [ARNm] totale de la fraction non marquée nous permet d'obtenir la constante k_{decay} ce qui permet d'estimer grâce à l'équation 2 la valeur de la demi-vie (Miller et al., 2011; Rabani et al., 2011).

Cette méthode permet d'évaluer la demi-vie de plusieurs ARNm simultanément avec un minimum de perturbation cellulaire. Par contre, elle ne permet pas d'obtenir une mesure directe de la demi-vie d'un transcrit. Il est également difficile de concevoir l'utilisation de cette technique dans le cadre de modulation d'un ARNm à la suite d'un stimulus, par exemple, inflammatoire. En effet, cette technique nous oblige à assumer que les ARNm sont à l'équilibre et que $TR=DR$. Tout changement de TR ou DR dans le temps par rapport aux

mesures qui ont été faites rend caduque les constantes et les équations qui en découlent empêchant une estimation adéquate de la demi-vie.

1.6.2.2. Inhibiteurs de la transcription

L'utilisation d'inhibiteurs de la transcription est une technique relativement simple pour mesurer la cinétique de dégradation d'un ARNm. Globalement, un inhibiteur de la transcription est ajouté aux cellules. L'actinomycine D (Act. D), l' α -amanitine et le 5,6-dichloro-1b-1-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) sont les inhibiteurs de la transcription généralement utilisés dans le cadre de cette technique. L'actinomycine D affecte les trois types d'ARN polymérase avec une sélectivité variable (Bensaude, 2011). Cette molécule interfère avec la transcription en s'intercalant dans l'ADN, préférentiellement au sein des séquences riches en GC (Trask & Muller, 1988). Contrairement à l'actinomycine D, l' α -amanitine présente une haute spécificité et une haute affinité pour l'ARN polymérase II. L' α -amanitine se fixe près du site catalytique de l'ARN polymérase prévenant ainsi l'incorporation nucléotidique et la translocation des transcrits (Brueckner & Cramer, 2008). Quant au DRB, celui-ci agit en interagissant directement avec l'appareil transcriptionnel de l'ARN polymérase II, soit la kinase CDK9 (Bensaude, 2011).

La concentration d'un ARNm est mesurée après différents temps d'incubation en présence de l'inhibiteur de la transcription pour déterminer le profil et le taux de dégradation de l'ARNm dans le temps. Théoriquement, suite à l'inhibition de la transcription, seule la machinerie de dégradation de l'ARNm est fonctionnelle. L'expression de l'ARNm à l'équilibre est brisée et la concentration d'ARNm diminue progressivement à une vitesse directement dépendante de la constante k_{decay} (Équation 2) ce qui nous permet d'estimer la demi-vie en utilisant l'équation 3. L'avantage de cette approche par rapport à la technique précédente, est la possibilité d'estimer directement la demi-vie et de comparer comment des traitements différents pourraient affecter la stabilité d'un transcrit. L'inconvénient principal de cette technique est que les inhibiteurs de la transcription peuvent avoir un impact négatif important sur la physiologie de la cellule (Ljungman, 2007). En effet, les drogues utilisées pour cette technique pourraient affecter la synthèse de microARNs (miARNs) ou même la synthèse de protéines modulant la stabilité des ARNm ce qui va affecter la courbe de dégradation des transcrits. D'autre part, il est possible que les molécules mentionnées

n'inhibent pas complètement la machinerie transcriptionnelle selon leur sélectivité, leur affinité et la concentration utilisée (Pelechano & Perez-Ortin, 2008).

1.6.2.3. Système d'induction transcriptionnelle

Les systèmes d'induction de promoteur spécifique permettent de mesurer la demi-vie d'ARNm spécifique. Préalablement à l'induction, le promoteur est silencieux, puis celui-ci est induit par un stimulus spécifique durant une période de temps définie. Par la suite, le promoteur est de nouveau mis dans un état silencieux. Cette méthode permet de mesurer la chute d'un ARNm spécifique selon les mêmes calculs qu'avec des inhibiteurs de la transcription. Deux types de systèmes d'induction sont couramment utilisés, soit le promoteur *c-fos* induit par le sérum et le système inductible Tet-Off/On.

1.6.2.3.1. Promoteur c-fos induit par le sérum

Cette technique permet d'insérer le gène d'intérêt en aval du promoteur inductible au sérum *c-fos* (Ross, 1995). Par la suite, la construction est transfectée dans les cellules qui devront être mises en culture durant 24 à 36h en présence d'un milieu de culture pauvre en sérum (0,5%). Cette condition expérimentale force les cellules à entrer en phase de quiescence G0, ce qui réprime le promoteur *c-fos*. Par la suite, les cellules sont exposées à un milieu de culture composé de sérum (10-15%), ce qui permet l'entrée des cellules en phase G1 et induit le promoteur *c-fos* durant une période transitoire de 15 à 30min. De cette façon, le transcrit d'intérêt est synthétisé durant une phase brève et la dégradation de l'ARNm peut ensuite être évaluée dans le temps. Cette technique permet d'éviter l'utilisation d'inhibiteur de la transcription pouvant être toxique à la cellule. Cependant, la synchronisation du cycle cellulaire empêche l'évaluation de la stabilité réelle d'un transcrit durant l'interphase. De plus, on peut supposer que plusieurs gènes seront modulés différemment lors de la synchronisation. En outre, ce promoteur peut également être modulé par différents stimuli, tels que l'AMPc (Fisch, Prywes, Simon, & Roeder, 1989), les rayons ultraviolets (Gonzales & Bowden, 2002) et le H₂O₂ (Li & Spector, 1997) restreignant son utilisation pour le calcul de demi-vie en condition normale.

1.6.2.3.2. Promoteur Tet-Off/On

Il existe plusieurs types de systèmes inductibles contrôlés par la tétracycline développés par différentes compagnies. Le système Tet Advanced Inducible Gene Expression (seconde génération) de Clontech Laboratories Inc. est détaillé ci-dessous. Ce système permet une puissante expression d'un gène d'intérêt sous le contrôle de la tétracycline. Il existe deux types de systèmes d'induction, soit le Tet-Off (tTA) (Gossen & Bujard, 1992) et le Tet-On (rtTA) (Gossen et al., 1995). Dans les deux cas, un facteur de transcription tTA-Adv. ou rtTA-Adv. interagit avec le promoteur P_{Tight} afin de permettre l'expression d'un gène d'intérêt. L'interaction entre le facteur de transcription et son promoteur est contrôlée par la présence ou l'absence de la tétracycline ou de son dérivé, la doxycycline (Dox) [Figure 10]. Les systèmes Tet-Off et Tet-On sont décrits ci-après.

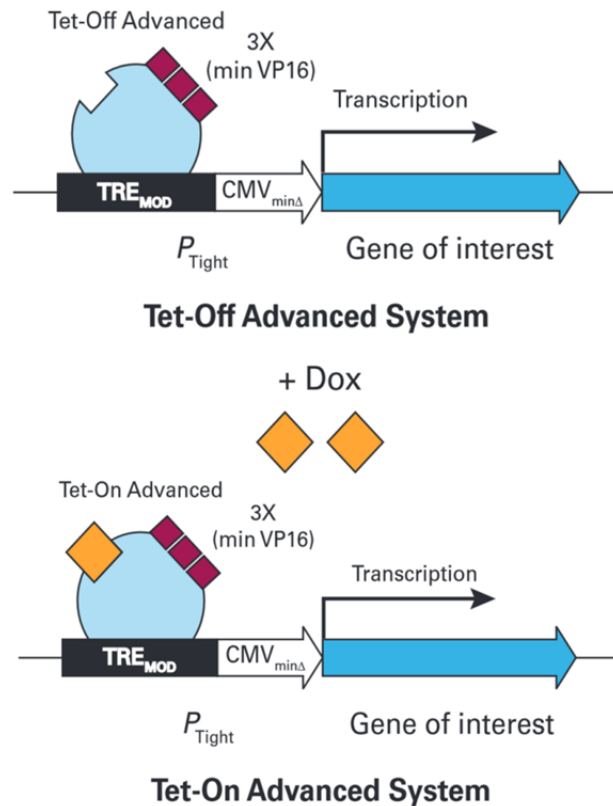


Figure 10. Système d'induction transcriptionnelle Tet-Off et Tet-On.

Dans le système Tet-Off, la protéine tTA-Adv. qui possède des domaines de transactivation de la protéine VP16, s'associe au promoteur P_{Tight} . Cette association permet la transcription du gène d'intérêt. Dans le système Tet-On, l'interaction entre la protéine tTA-Adv. et le promoteur P_{Tight} nécessite la présence de la doxycycline afin d'activer la transcription.

Pour le système Tet-Off, tTA-Adv. est un facteur de transcription hybride composé du répresseur procaryote (*Escherichia coli*) TetR fusionné à trois domaines de transactivation transcriptionnelle de la protéine virale HSV VP16. P_{Tight} est un promoteur synthétique comprenant une séquence minimale du promoteur du cytomégalo virus (CMV) fusionnée à 7 répétitions des séquences de l'opérateur *tet* (*tetO*). De cette façon, la transcription du gène situé en aval de P_{Tight} est dépendante de l'interaction de TetR avec *tetO*. En présence de tétracycline, le répresseur TetR perd son affinité avec l'opérateur *tetO* conduisant à un arrêt de la transcription (Gossen & Bujard, 1992) [Figure 10].

Dans le cas du système Tet-On, son facteur de transcription rtTA-Adv. diffère de tTA-Adv. par quelques mutations à l'intérieur du répresseur TetR. Il en résulte une inversion complète de la réponse à la tétracycline par le facteur de transcription. Ainsi, rtTA-Adv. requiert la présence de tétracycline pour permettre sa liaison au promoteur P_{Tight} via l'opéron *tetO* (Gossen et al., 1995).

Les caractéristiques de ce système en font un modèle idéal pour l'étude spécifique de l'expression d'ARNm dans les cellules eucaryotes. En effet, l'origine procaryote des composantes TetR et *tetO* fait en sorte que le système TetOff est pratiquement inerte (pas d'activation des gènes non spécifiques) dans un environnement eucaryote. Les propriétés pharmacologiques de la doxycycline présentent également une faible toxicité pour les cellules eucaryotes (Clontech Laboratories, 2012). De plus, cette approche permet la détermination de la demi-vie d'un ARNm spécifique dans n'importe quelle condition expérimentale. Par contre, ce système nécessite la transfection d'une construction codant pour le gène que l'on veut étudier, en plus du vecteur exprimant le facteur de transcription Tet-Off/On.

1.6.3. Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm

L'ARNm d'un gène codant pour une protéine possède une structure complexe. La coiffe 7mGpppN en 5' protège l'ARNm de la dégradation par les ribonucléases et permet l'initiation de la traduction. La séquence non traduite en 5' précède la séquence codante pour une protéine et peut jouer un rôle dans la stabilité et la traduction du messenger. La séquence non traduite en 3' suit la séquence codante et précède la queue polyadénylée essentielle à la stabilité et la traduction du messenger.

Le niveau d'expression d'un gène dans la cellule est contrôlé par différents mécanismes allant de la transcription, aux modifications post-transcriptionnelles et à la traduction. La modulation post-transcriptionnelle des ARNm est probablement la méthode la plus efficace pour moduler rapidement l'expression génique d'un transcrit. La modulation post-transcriptionnelle de l'expression génique implique la stabilité des transcrits, l'efficacité de la traduction ainsi que la localisation des messagers (qui ne sera pas discutée ici) (Grzybowska, Wilczynska, & Siedlecki, 2001). Le 3'UTR de l'ARNm joue un rôle important dans ces mécanismes de modulation. Une étude récente a démontré que contrairement au 5'UTR, il existe une corrélation exponentielle entre la longueur du 3'UTR et la complexité cellulaire et la morphologie d'un organisme. Cette corrélation suggère que le 3'UTR à l'instar des régions codantes du messager, a été soumis à la sélection naturelle pour permettre une modulation post-transcriptionnelle de plus en plus complexe tout au cours de l'évolution (Chen, Chen, Juan, & Huang, 2012). Le 3'UTR comporte plusieurs sites de liaison pour des protéines et des miARNs qui vont affecter directement la stabilité ou la traduction du transcrit.

1.6.3.1. Modulation de la stabilité

La régulation de la stabilité de l'ARNm est une étape importante dans le contrôle de l'expression génique. Un changement dans la stabilité d'un transcrit se reflète généralement sur la concentration de la protéine codée dans la cellule. La stabilité du transcrit est dictée par des séquences *cis* dans le 3'UTR qui favorisent la stabilité ou la dégradation de l'ARNm (Palanisamy, Jakymiw, Van Tubergen, D'Silva, & Kirkwood, 2012).

1.6.3.1.1. miARNs

La majorité des motifs retrouvés dans le 3'UTR sont généralement constitués d'une séquence de 8 nucléotides et environ la moitié d'entre eux sont complémentaires à la séquence reconnue par des miARNs (Xie et al., 2005). Les miARNs sont des agents de modulation post-transcriptionnelle très importants dans la cellule. Bien que les sites d'attachement des miARNs puissent se retrouver dans la séquence codante (ORF) ainsi que dans le 5'UTR, on retrouve ces sites de liaisons préférentiellement dans le 3'UTR. Cette préférence démontre l'importance de cette région dans les processus de modulation post-transcriptionnelle (Barrett, Fletcher, & Wilton, 2012). Les miARNs sont des ARN composés de 21 à 26 nucléotides et sont produits à

partir de transcrits qui forment des structures en tige-boucle. Les structures en tiges-boucle (*hairpin*) [Figure 11] font partie des structures secondaires essentielles de l'ARN. Celles-ci peuvent jouer plusieurs rôles dans le métabolisme des ARN tels que le repliement de l'ARN, les interactions avec les ribozymes, la modulation par les miARNs, la reconnaissance d'ARN par les protéines, etc.

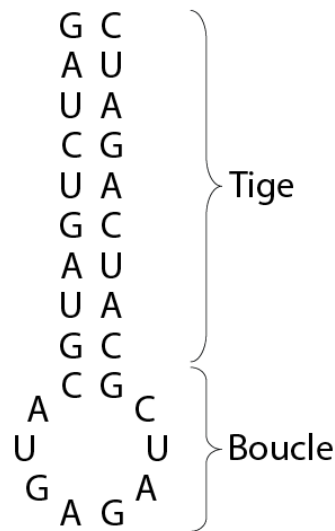


Figure 11. Structure en tige-boucle

Exemple de structure en tige-boucle (créée à partir de RNAfold Webserver)

Le complexe formé de Drosha et DGCR8 produit les pré-miARNs dans le noyau en clivant les pri-miARNs (Lee et al., 2003). Suite à son transfert dans le cytoplasme par l'Exportin-5, le pre-miARN est de nouveau clivé par le complexe cytoplasmique Dicer (Lund, Guttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004). Le miARN mature est ensuite couplé au complexe RISC (RNA-induced silencing complex) (Gregory, Chendrimada, Cooch, & Shiekhattar, 2005). La dégradation d'un ARNm par un miARN requiert une association parfaite pour favoriser le clivage de l'ARNm par la protéine Ago2 présente dans le complexe RISC comme dans le cas de miR-196 qui induit la dégradation de HOXB8 (Yekta, Shih, &

Bartel, 2004). Quelques exceptions suggèrent qu'un léger mésappariement peut tout de même induire le clivage du messager (Mallory et al., 2004).

1.6.3.1.2. Stabilité et dégradation des ARNm interagissant avec les protéines liant l'ARN

Séquences *cis* – ARE

Il existe également des séquences *cis* dans le 3'UTR qui sont reconnues par des protéines liant l'ARN (RBPs – *RNA-binding proteins*). Les séquences *cis* les plus connues sont les séquences riches en adénosines et en uridines nommées « AU-rich element » (ARE). Environ 8% de la totalité des transcrits possèdent des éléments « AU-riches » et plusieurs d'entre eux codent pour des cytokines impliquées dans l'inflammation (TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-10, etc.). Les séquences ARE correspondent à des motifs AUUUA de 50 à 150pb qui se regroupent en trois classes. La classe I représente des pentamères AUUUA regroupés près de séquences riches en uridines. La classe II représente des nonamères UUAUUUAU également regroupés dans une région « U-riche ». La classe III se distingue des classes I et II puisqu'elle correspond à des régions « U-riches » sans pentamères précis (Palanisamy et al., 2012). Les motifs ARE fonctionnels existent sous la forme structurée en tige-boucle, mais peuvent également exister sous une forme linéaire dont la séquence nucléotidique devient très importante (Ray et al., 2009). Les transcrits présentant des séquences ARE plus longues possèdent des demi-vies plus courtes, puisqu'il a une association de RBP plus importante sur l'ARN (Raghavan et al., 2004). Ceci suggère que le motif ARE aurait un effet déstabilisateur par défaut sur l'ARNm (Khabar, 2010). Les RBP associées aux ARE favorisent la dégradation de l'ARNm à partir de son extrémité 3' par des exonucléases contrairement aux miARNs qui impliquent les endonucléases (Mignone, Gissi, Liuni, & Pesole, 2002). Les séquences ARE de classes I et III induisent une déadénylation cytoplasmique synchrone. Tous les ARNm seront déadénylés à la même vitesse jusqu'à l'obtention d'une queue polyadénylée d'une longueur de 30-60 nucléotides provoquant la dégradation des transcrits. À l'inverse, les séquences ARE de classe II génèrent des ARNm intermédiaires sans queue polyA via une déadénylation cytoplasmique asynchrone (Xu, Chen, & Shyu, 1997).

Les motifs ARE peuvent également avoir une fonction stabilisatrice sur l'ARNm selon la nature des protéines RBP qui vont s'y lier (Lopez de Silanes, Quesada, & Esteller, 2007).

Par exemple, les protéines RBP de la famille ELAV (HuR, HuB, HuC et HuD) sont connues pour stabiliser le transcrit, alors que la AU-rich binding factor-1 (AUF1) et la tristétraproline (TTP) ont un rôle déstabilisateur. Par contre, ces dernières favorisent la dégradation de l'ARNm selon des mécanismes distincts. Par exemple, le mécanisme d'action d'AUF1 présente une approche indirecte. Suite à la reconnaissance d'un motif ARE par AUF1, celle-ci recrute Hsc70/Hsp70, eIF4G et PABP pour former un complexe protéique. La dislocation d'eIF4G suite à la formation de ce complexe favorise l'ubiquitinylation d'AUF1 et entraîne la dégradation du complexe par le protéasome. Puisque la queue polyA de l'ARNm n'est plus protégée par des protéines PABP, celle-ci est déadénylée et l'ARNm est subséquentement dégradé (Laroia, Cuesta, Brewer, & Schneider, 1999). À l'opposé, TTP provoque directement la dégradation de l'ARNm ciblé. TTP déstabilise le messenger en y recrutant des déadénylases et des exonucléases qui forment l'exosome (Xu et al., 1997).

Séquence *cis* – GURE

Il existe également des séquences riches en guanosines et en uridines nommées « GU-rich element » (GURE). À l'instar des ARE, ces séquences « GU-riches » conservées dans le 3'UTR ont été découvertes dans les ARNm possédant un turnover rapide. La principale protéine qui s'associe au GURE est la CUG triplet repeat, RNA binding protein 1 (CUGBP1). Elle a été originalement reconnue comme liant une séquence CUG répétée chez des patients atteints de dystrophie myotonique de type I (Vlasova et al., 2008). CUGBP1 est une protéine essentielle à la dégradation des ARNm, puisqu'un knock-out de la protéine stabilise fortement les transcrits possédant le motif GURE (Vlasova-St Louis & Bohjanen, 2011). Son mode de fonctionnement qui est conservé dans l'évolution implique le recrutement de la Poly(A) ribonuclease (PARN) et une déadénylation du messenger. Chez les organismes inférieurs, les séquences « GU-riches » seraient surtout impliquées dans le développement, suggérant un rôle similaire chez les mammifères (Wu, Li, Zhao, & Mao, 2010). Il existe une séquence similaire au GURE nommée « nanos response element » (NRE) correspondant à des séquences de trinuécléotides UGU qui permet de recruter la famille de protéine PUF (Spasov & Jurecic, 2003). Les protéines de la famille PUF peuvent également reconnaître une séquence de deux motifs UAAU distincte des séquences « AU-riches » habituelles (Yosefzon et al., 2011). Chez l'humain, il existe les protéines PUM1 et PUM2 qui se fixent au NRE et induisent la dégradation de l'ARNm. Le mécanisme implique le recrutement de corépresseurs, tel que la

CNOT déadénylase, qui rend l'ARNm vulnérable à la dégradation (Van Etten et al., 2012). La similitude entre le GURE et le NRE suggère une interaction entre les différentes protéines impliquées. En effet, les séquences « GU-riches » reconnues par CUGBP1 sont semblables à celles reconnues par PUM1/2, ainsi qu'aux séquences « U-riches » reconnues par HuR (Lee, Lee, Wilusz, Tian, & Wilusz, 2010). Ceci suggère que selon l'état cellulaire, les éléments *cis* dans le 3'UTR pourraient entraîner une compétition ou une coopération dans l'attachement des RBP aux séquences du 3'UTR déterminant le destin d'un ARNm. Par exemple, CUGBP1 et PUM1/2 vont déstabiliser un transcrite alors que HuR stabiliserait celui-ci. Cette multiplicité des RBP s'attachant au 3'UTR permet une modulation très fine du niveau de messenger dans la cellule [Figure 12].

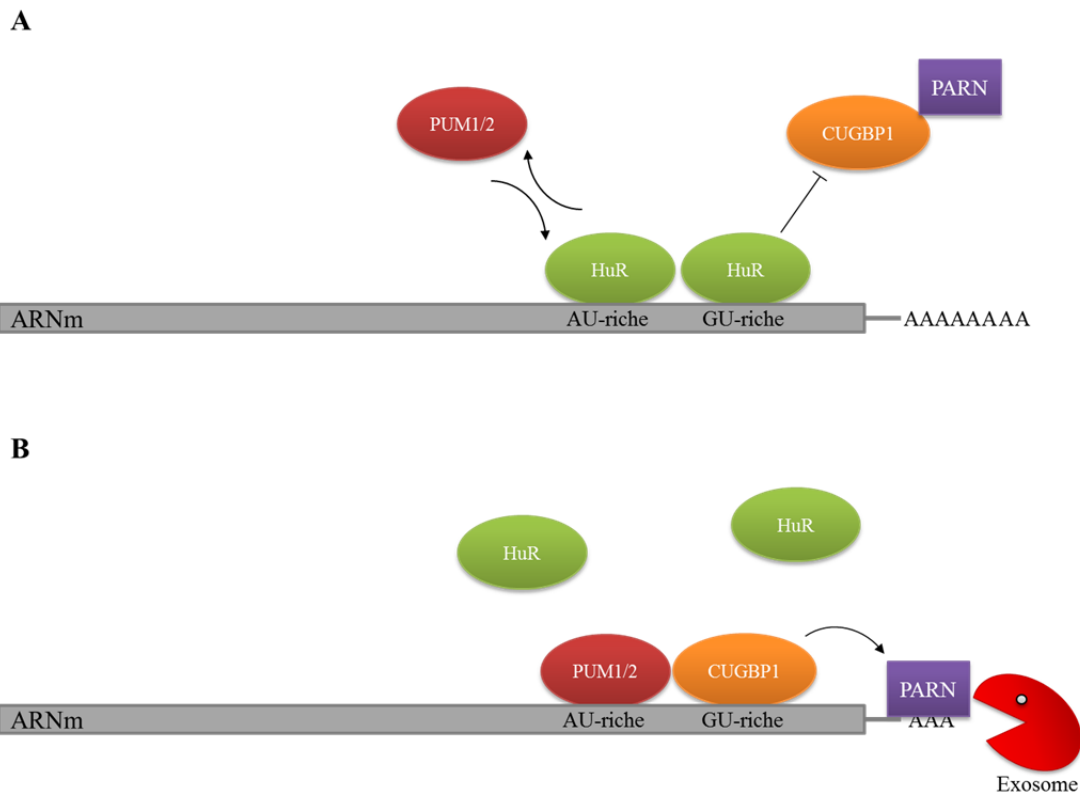


Figure 12. Mécanisme de compétition/coopération dans la modulation de la stabilité d'ARNm possédant des séquences ARE et GURE

- (A) HuR est en compétition avec PUM1/2 pour la liaison à l'ARNm et le protège contre la dégradation par l'exosome.
- (B) PUM1/2 et CUGBP1 coopèrent pour dégrader l'ARNm via les séquences GURE. L'éjection de HuR favorise le recrutement de la déadénylase PARN et de l'exosome, ce qui entraîne la dégradation du transcrite.

Séquences *cis* – CURE

Il y a également des séquences riches en cytosines et en uridines nommées « CU-rich element » (CURE) dans le 3'UTR de certains ARNm. Contrairement aux ARE et GURE, le CURE possède un rôle stabilisateur en recrutant diverses ribonucléoprotéines, ainsi que des RBP comme HuR, HuD et l'Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein (IGF2BP) (Bell et al., 2013). Cependant, la modulation des ARNm possédant un CURE semble être complexe. Par exemple, le 3'UTR de l'ARNm de MARCKS possède un motif « CU-riche ». L'ajout de son 3'UTR en aval du gène rapporteur luciférase entraîne une réduction de l'activité luciférase. Néanmoins, une augmentation de l'expression de HuR dans les cellules entraîne une stabilisation du transcrit MARCKS via le CURE (Wein, Rossler, Klug, & Herget, 2003). Il se pourrait donc que la structure secondaire de base de ce transcrit facilite le recrutement de l'exosome ou que des RBP déstabilisatrices non identifiées puissent reconnaître ces séquences « CU-riche » et entrer en compétition avec HuR.

1.6.3.1.3. Structures secondaires de l'ARN

Des séquences spécifiques dans le 3'UTR peuvent affecter la stabilité d'un ARNm, mais celle-ci peut dépendre également de la structure secondaire du messager. Il existe un « Iron responsive element » (IRE) qui forme une structure en tige-boucle. Contrairement aux exemples précédents, ce n'est pas la séquence primaire ni l'attachement de RBP qui sont importants ici, mais bien l'existence de la structure secondaire tige-boucle. L'IRE peut interagir avec des « iron regulatory proteins » (IRP) selon la concentration en fer. L'ARNm du récepteur de la transferrine (TfR) possède un IRE dans son 3'UTR. Lorsque le niveau de fer augmente dans la cellule, les IRP se dissocient de l'IRE ce qui favorise la dégradation de l'ARNm en exposant des sites de clivage aux endonucléases (Hentze & Kuhn, 1996; Posch, Sutterluety, Skern, & Seiser, 1999).

Les différents mécanismes de modulation de la stabilité (RBP et miARNs) de l'ARNm peuvent également interagir pour médier des réponses cellulaires efficaces et très précises. Des RBP recrutées par des ARE peuvent entraîner un changement de conformation de l'ARNm qui influencera le recrutement de miARNs ou de RBP supplémentaires. C'est le cas du TNF- α où il y a une collaboration entre miARNs et RBP pour déstabiliser le transcrit. L'attachement de miR-16 sur le 3'UTR permet au complexe RISC de favoriser l'attachement de TTP sur le

motif ARE et d'induire une dégradation de l'ARNm en plus d'affecter la traduction (Jing et al., 2005). Il peut également y avoir un processus de compétition pour stabiliser un ARNm. L'ARNm de CAT-1 possède un motif ARE reconnu par miR-122 et HuR. Suite à un stress, HuR peut réprimer l'effet déstabilisateur de miR-122 possiblement en empêchant le clivage du messenger par le complexe RISC (Bhattacharyya, Habermacher, Martine, Closs, & Filipowicz, 2006). Ainsi, la modulation de la stabilité d'un ARNm est complexe et le 3'UTR joue un rôle de premier plan dans cette modulation post-transcriptionnelle.

1.6.3.2. Modulation de la traduction

La traduction est une autre étape importante dans l'expression génique. Il s'agit de la dernière étape pouvant être modulée avant la production d'une protéine. Les séquences des ARNm jouent un rôle prédominant dans le contrôle de la traduction et par le fait même de la synthèse protéique et du protéome exprimé à tout instant dans la cellule (Schwanhauser et al., 2011). Jusqu'à présent le 5'UTR était défini comme le principal responsable du contrôle traductionnel. Il semble aujourd'hui que le 3'UTR soit également impliqué dans ce processus.

1.6.3.2.1. miARNs

Les miARNs présentés précédemment sont également impliqués dans la modulation de la traduction. Le mode d'action requiert une association partielle avec l'ARNm via une séquence « *seed* » dans le 5' du miARN qui permet le recrutement d'Ago2 et l'inhibition de la traduction. L'inhibition peut se faire à l'étape de l'initiation de la traduction, mais également durant l'élongation (Barrett et al., 2012). Étonnamment, les miARNs peuvent également favoriser la traduction d'ARNm. Dans le cas de l'ARNm TNF- α , sa traduction est inhibée dans les cellules prolifératives. Par contre, en arrêt de cycle cellulaire, un motif ARE recrute miR369-3 et induit la traduction (Vasudevan, Tong, & Steitz, 2007). Dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*, xlmir16 augmente la traduction de Myt1 kinase, afin de maintenir l'état immature de l'oocyte (Mortensen, Serra, Steitz, & Vasudevan, 2011). L'état du cycle cellulaire semble donc être un facteur important dans l'impact des miARNs sur la traduction. De plus, un ARNm peut être modulé par différents miARNs simultanément pouvant conduire à une régulation très fine de la traduction.

1.6.3.2.1. Protéines liant l'ARN

La traduction peut également être inhibée par les RBPs en interagissant avec les protéines de la traduction ou avec les sous-unités ribosomales (Pichon et al., 2012). Chez la drosophile, la protéine Bicoid (BCD) via son motif « arginine-riche », lie le « BCD response element » de l'ARNm caudal (*cad*). Cette liaison bloque l'interaction entre eIF4E et eIF4G à l'extrémité 5' réprimant ainsi la traduction (Niessing, Blanke, & Jackle, 2002).

L'ARNm lipoxigénase *r15-LOX* est régulé traductionnellement via un motif « CU-riche » nommé « Differentiation control element » (DICE) par les ribonucléoprotéines hnRNP K et hnRNP E1 qui lient son 3'UTR. La sous-unité ribosomale 40S peut alors se lier au codon d'initiation AUG, mais le complexe protéique en 3'UTR empêche le recrutement de la sous-unité 60S pour former le ribosome actif 80S (Ostareck, Ostareck-Lederer, Shatsky, & Hentze, 2001). Le motif GURE pourrait également moduler la traduction. L'équivalent de CUGBP1 dans la drosophile a la capacité de réprimer la traduction de certains ARNm (Ezzeddine et al., 2002). Un essai luciférase comportant les séquences NRE, similaires au GURE, a démontré une baisse importante de l'activité luciférase en présence de la protéine PUM1/2 suggérant une inhibition de la traduction et de la stabilité du transcrit (Van Etten et al., 2012). Les RBP seraient également modulées par le cycle cellulaire. Des cellules mises en culture sans sérum, ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire en G1/G0, ont démontré une traduction accrue de l'ARNm TNF- α . Le mécanisme implique FXR-1 et Ago2 qui s'associent aux séquences ARE et favorisent la traduction (Vasudevan & Steitz, 2007).

Certains cas présentés plus haut démontrent une interaction 5'-3' dépendante de RBP pour inhiber la traduction. Il est également possible d'observer une interaction 5'-3' sans la présence de RBP. L'ARNm de *p53* présente une complémentarité entre son 5'UTR et son 3'UTR qui ont la possibilité de former une structure d'ARN bicaténaire. Cette séquence interagit avec le facteur de traduction RPL26 et favorise la traduction du messenger *p53* suite à un dommage à l'ADN (Chen & Kastan, 2010). Cette circularisation de l'ARN peut expliquer pourquoi la traduction peut être si facilement inhibée par la liaison d'une RBP ou d'un miARN qui modifie la conformation du transcrit.

1.6.3.3. Impact du stress inflammatoire sur la modulation de la stabilité et de la traduction d'ARNm par le 3'UTR

L'inflammation est un phénomène complexe qui module l'expression de nombreux gènes. Plusieurs ARNm peuvent être modulés de façon post-transcriptionnelle par un stress inflammatoire. La modulation de l'inflammation elle-même est fortement régulée par la stabilité et la traduction de transcrits, telle qu'observée dans le cas de l'expression du TNF- α . Lors d'un stress inflammatoire, les récepteurs IL-1 β ou TLR entraînent la phosphorylation de P38 et de MK2. Certains facteurs de croissance peuvent également activer la PI3K puis Akt. L'activation de ces voies de signalisation peut induire la phosphorylation de la protéine TTP associée au motif ARE. P-TTP se dissocie du messenger et forme un complexe avec « 14-3-3 proteins » qui séquestre TTP dans la cellule. La dissociation de TTP stabilise le transcrit et augmente sa traduction menant à une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (Palanisamy et al., 2012).

L'inflammation affecte la prolifération et la survie cellulaire. Par exemple, un traitement au TNF- α induit l'expression de p21 qui est essentielle à la survie cellulaire en inhibant l'activation de la caspase 3 et en bloquant Ask1 (Abbas & Dutta, 2009). Le TNF- α agit en activant la cascade de phosphorylation suivante: Ras \rightarrow ERK1/2 \rightarrow GEF-H1 \rightarrow Rho \rightarrow ZONAB. L'activation du facteur de transcription ZONAB favorise sa liaison avec l'ARNm p21, le stabilise et augmente sa traduction (Nie, Balda, & Matter, 2012). Les LPS favorisent la production d'oxyde nitrique (NO) qui est connu pour moduler l'expression génique. Le NO stabilise plusieurs transcrits et inhibe également la traduction de plusieurs autres via des motifs DICE et CURE qui recrutent hnRNP K et hnRNP E2/E1 suite à l'activation de la MAPK ERK1/2 (Skalweit et al., 2003). Les LPS modulent également les miARNs. Récemment, miR-513a-5p a été impliqué dans la modulation de l'apoptose par les LPS via l'inhibition de XIAP. L'inhibition de l'expression de XIAP se traduit par une hausse de l'activité de la caspase 3 et du clivage de PARP menant à l'apoptose (Shin, Moon, Park, & Ha, 2012).

L'inflammation est présente dans l'asthme et sa chronicité cause un remodelage des voies aériennes. La stabilité des ARNm est importante dans ce processus. L'expression de plusieurs gènes responsables du remodelage est contrôlée de façon post-transcriptionnelle, comme c'est le cas pour la fibronectine (Ammit, 2005). Le TGF- β stimule l'expression de

celle-ci dans les fibroblastes pulmonaires humains. Sa transcription est quatre fois plus élevée parallèlement à une augmentation de la demi-vie du transcrit de 13 à 21,8 h (Kucich et al., 2000). Cette variation de la stabilité pourrait impliquer des RBP modulées par l'activation de p38, puisque le 3'UTR de l'ARNm de la fibronectine contient un motif ARE (Caput et al., 1986). Récemment, une étude a démontré que l'inhibition de HuR par des siARNs réduit de plus de la moitié l'expression de la fibronectine induite par le TGF- β , suggérant l'implication de HuR dans la modulation de la stabilité de l'ARNm fibronectine (Bai et al., 2012).

1.7. Hypothèse et Objectifs

La modulation du canal α ENaC a été caractérisée à plusieurs niveaux. Les connaissances sont nombreuses en ce qui concerne la modulation de l'activité du canal à la membrane cellulaire, son expression protéique, ainsi que son activation par clivage protéolytique et tous les mécanismes régulant finement la dégradation et le recyclage du canal. Par contre, peu de travaux se sont intéressés aux mécanismes qui modulent le niveau des ARNm α ENaC lors d'un stress pathophysiologique dans les cellules épithéliales alvéolaires.

Il existe de nombreux stress pathophysiologiques qui peuvent interférer avec le bon fonctionnement de l'appareil respiratoire. Parmi ceux-ci, les stress inflammatoires (Dagenais et al., 2004; Roux et al., 2005), oxydatifs (Xu & Chu, 2007) et infectieux (Dagenais, Gosselin, Guilbault, Radzioch, & Berthiaume, 2005a; Hussain et al., 2013) ont tous la particularité d'avoir pour conséquence une inhibition de l'expression de l'ARNm α ENaC. Cette modulation à la baisse du transcrit α ENaC est une étape importante qui s'inscrit dans un programme concerté pour diminuer l'expression et la fonction du canal dans les cellules alvéolaires soumises à un stress pathophysiologique. Il existe par exemple une corrélation directe entre le niveau des ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires traitées au TNF- α et le courant ENaC détecté dans ces cellules (Dagenais et al., 2004). De même, la diminution de clairance liquidienne dans les poumons transplantés est associée à une diminution des ARNm α et β ENaC, ainsi qu'à une diminution de la protéine α ENaC essentielle au fonctionnement du canal (Sugita et al., 2003b). Qu'il y ait un lien direct ou indirect entre la diminution du transcrit et celle de la protéine ou de l'activité du canal, il est clair qu'une modulation très stricte de la quantité des ARNm α ENaC est mise en place en condition pro-inflammatoire.

L'expression d'un ARNm dans la cellule peut être affectée par l'activité transcriptionnelle de son promoteur, mais également par la modulation de la stabilité du messenger. Dans le cas du transcrit α ENaC, le rôle de son promoteur en condition de stress pathophysiologique a été mis en lumière à plusieurs reprises, tel que décrit dans le chapitre 1.5.2. À l'opposé, l'implication de la stabilité dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC a été peu investiguée à quelques exceptions, et il n'existe aucune étude sur les mécanismes impliqués dans cette modulation. De même, si un rôle des séquences 5'UTR de

α ENaC a été démontré dans la modulation de la traduction (Banasikowska, Post, Cutz, O'Brodovich, & Otulakowski, 2004b; Otulakowski et al., 2001; Otulakowski, Rafii, & O'Brodovich, 2004), le rôle du 3'UTR du messenger dans le contrôle de l'expression génique de ENaC n'a pas été étudié jusqu'à présent.

1.7.1. Hypothèse de recherche

Notre hypothèse de recherche postule que l'inflammation ou le stress cellulaire pourraient inhiber l'expression de l'ARNm α ENaC via une modulation de sa stabilité. Cette modulation impliquerait l'attachement de facteurs protéiques *trans* au 3'UTR de l'ARNm α ENaC. Afin de vérifier cette hypothèse, différentes stratégies ont été développées et sont décrites dans les objectifs suivants.

1.7.2 Objectif général

Caractériser les mécanismes de modulation de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires lors de différents stress pathophysiologiques et déterminer si cette modulation pourrait s'expliquer en partie par une régulation de la stabilité du transcrit.

1.7.3. Objectifs spécifiques

1.7.3.1. Objectif no.1

- Définir par quels mécanismes et par quelles voies de signalisation des stress pathophysiologiques de natures différentes vont affecter l'expression des ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires.

Pour cet objectif, la cytokine TNF- α , quoique pertinente dans un contexte pathophysiologique, n'a pas été utilisée dans l'induction d'un stress inflammatoire. En effet, cette cytokine provoque une modulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle complexe au niveau de l'ARNm α ENaC (Dagenais et al., 2006; Dagenais et al., 2004). C'est pourquoi, dans le cadre de cet objectif, nous avons tenté de développer deux modèles de stress dont la modulation de l'ARNm α ENaC puisse impliquer de façon spécifique soit l'activité transcriptionnelle du promoteur α ENaC, soit la modulation de la stabilité du transcrit. Pour cette raison, nous avons comparé comment les LPS de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

(Baines et al., 2010) utilisés ici pour induire un stress inflammatoire et comment la cycloheximide connue également pour induire un stress cellulaire (Dagenais et al., 2001b) affectent le niveau des ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires. La cycloheximide n'est pas connue comme étant un modèle physiologique pour les cellules épithéliales alvéolaires. Cependant, d'un point de vue expérimental, c'est un modèle intéressant puisque cette drogue inhibe de façon importante et rapide l'expression de l'ARNm α ENaC (Dagenais et al., 2001b; Migneault et al., 2013). Bien que nous ne connaissions pas la nature exacte du stress cellulaire induit par la cycloheximide aux concentrations utilisées dans notre étude, il est possible que celle-ci entraîne une certaine réponse inflammatoire, différente de celle induite par les LPS, dans les cellules épithéliales alvéolaires.

1.7.3.2. Objectif no.2

- Définir le rôle du 3'UTR dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC.

En moyenne, la taille du 3'UTR est approximativement de 500 nucléotides chez le rat (Chen et al., 2012). Dans le cas du 3'UTR de l'ARNm α ENaC du rat, celui-ci représente près de 900 nucléotides, soit environ le tiers du transcrit. Cette taille est nettement supérieure à la moyenne retrouvée chez le rat, suggérant un rôle du 3'UTR α ENaC dans la modulation post-transcriptionnelle du messenger. Pour cet objectif, un système d'expression Tet-Off a été développé afin de déterminer le rôle des séquences du 3'UTR α ENaC dans la modulation de la stabilité du transcrit dans les cellules épithéliales alvéolaires en conditions physiologique et pro-inflammatoire.

1.7.3.3. Objectif no.3

- Caractériser la modulation de la stabilité de l'ARNm par les protéines liant l'ARN (RBP).

La région 3'UTR des ARNm possède des séquences *cis* pouvant servir de site d'attachement à divers facteurs modulant la stabilité de l'ARNm α ENaC tels que les protéines liant l'ARN. Pour cet objectif, les protéines capables de s'attacher aux séquences 3'UTR α ENaC ont été purifiées par chromatographie d'affinité et identifiées par spectrométrie de masse. Par la suite, l'impact de plusieurs de ces protéines sur l'expression des ARNm α ENaC a été étudié dans les cellules épithéliales alvéolaires surexprimant ces RBP.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2.1. Chirurgie

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant entre 175 et 200g ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale (1,2mL par 500g) d'une solution saline kétamine (100mg/mL) et xylazine (100mg/mL). Le rat a d'abord été rasé de l'abdomen jusqu'au cou puis désinfecté par les passages successifs suivants : 1x chlorexidine, 3x éthanol 70% et 3x iode. Une incision a été effectuée dans la peau de l'abdomen jusqu'au cou suivie d'une incision dans le tissu musculaire abdominal afin de retirer les côtes. La veine cave abdominale a ensuite été sectionnée pour une exsanguination. Suite à la thoracotomie, une trachéotomie a été effectuée afin d'insérer une aiguille 18G½ liée à une valve stopcock à 3 voies pour permettre la ventilation des poumons lors de la perfusion ainsi que l'ajout d'élastase pour la digestion enzymatique des cellules épithéliales. Parallèlement, une incision du ventricule droit a été effectuée afin d'y insérer un cathéter dans l'artère pulmonaire. Pour permettre une meilleure perfusion des poumons, les deux oreillettes ont également été sectionnées. La ventilation des poumons via la trachée permet la perfusion des poumons avec la solution II (voir Annexe 1) à partir du cathéter inséré dans le ventricule. Suite à la perfusion, le bloc cœur-poumons a été prélevé et un lavage broncho-alvéolaire a été effectué à 10 reprises via la trachée à l'aide de la solution I (voir Annexe 1) afin d'éliminer un maximum de macrophages alvéolaires. Une solution d'élastase (10mL à 4U/mL) a été injectée par la suite à quatre répétitions (1 x 1min suivi de 3 x 10min) pour un total de 160U d'élastase par rat, afin de digérer le tissu pulmonaire. Durant ces incubations, le bloc cœur-poumons fut maintenu dans un bain-marie à 37°C, dans une solution de SGGS (sodium glucose gentamycine sepra).

2.2. Isolation des cellules épithéliales alvéolaires et culture cellulaire

Les poumons ont par la suite été libérés des structures médiastinales pour être émincés pendant 5min aux ciseaux dans 5mL de solution II contenant de la désoxyribonucléase (DNase) I (250 ug/mL). Les activités enzymatiques de l'élastase et de la DNase I ont été bloquées par l'ajout de 5mL de SVF à la suspension cellulaire. Celle-ci a été mise sous faible agitation durant cinq minutes et les cellules digérées ont été filtrées successivement à travers un montage de filtres de porosité de plus en plus fine (deux gazes, filtres de 150µm, et de 30µm) pour éliminer les fragments non digérés. Le filtrat a été centrifugé à 200 g durant 10 min à 4°C et le culot resuspendu dans 7,5mL de MEM sans SVF (voir Annexe 1). Les macrophages pulmonaires ont par la suite été éliminés des cellules épithéliales alvéolaires par une adsorption de ceux-ci pendant 35min en présence de 5% CO₂ à 37°C sur des pétris bactériologiques recouverts d'IgG de rat (Dobbs, Gonzalez, & Williams, 1986). Les cellules ont de nouveau été centrifugées selon les conditions précédentes et le culot a été resuspendu avec du MEM supplémenté avec 10% SVF et 367,9µM Septra. Suite au décompte à l'hématimètre des cellules viables en présence de bleu trypan, les cellules épithéliales alvéolaires ont étéensemencées à une densité de 1x10⁶ cellules/cm² dans un milieu MEM + 10% SVF + Septra. Au troisième jour de culture, le milieu fut remplacé par du MEM + 10% SVF sans Septra. Les cellules ont pu être utilisées pour les expériences dès le quatrième jour de culture (~64 heures de culture) lorsque les cellules sont confluentes. Comme cette technique d'isolation cellulaire est utilisée de façon routinière au laboratoire et qu'elle a été bien caractérisée par nous (Feng et al., 1993) ainsi que d'autres groupes (Brochiero et al., 2004; Dobbs et al., 1986; Jones, Miles, Lantz, Hinton, & Castranova, 1982), nous n'avons pas effectué d'autres tests pour valider ce système cellulaire. En effet, cette technique permet l'obtention d'une population mixte de cellules épithéliales alvéolaires (Type II ≥ 80% et Type I).

2.3. Réactifs

Le milieu de culture MEM, le sérum de veau fœtal (SVF) et le TNF- α recombinant de rat ont été obtenus de Life Technologies Inc. (Burlington, ON). L'élastase pancréatique porcine a été obtenue de Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ). Le Septra provient de Triton Pharma inc. (Montréal, QC) et la gentamycine de Sandoz (Boucherville, QC). Les IgGs de rat, les lipopolysaccharides de *Pseudomonas aeruginosa* (serotype 10, souche ATCC 27316), la cycloheximide, l'émétine, l'actinomycine D et la doxycycline proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Les inhibiteurs des MAP kinases (PD98059, SB203580) et de JNK (JNK inhibitor II) ont été achetés chez Calbiochem (Gibbstown, NJ), l'inhibiteur PD184352 chez LC Laboratories (Woburn, MA) et l'inhibiteur Birb796 de Selleck Chemicals LLC (Houston, TX).

2.4. Vecteurs et Clones

Toutes les constructions ont été produites par une technique de clonage par digestion enzymatique présentée dans le tableau 5, à l'exception des plasmides pLENTI 7.3 qui ont été clonés par recombinaison homologue avec le vecteur pDONR 221. Les vecteurs pGL3-Basic et pRL-SV40 proviennent de Promega Corporation (Madison, WI), pDONR 221, pLENTI 7.3 et pcDNA3 de Life Technologies, pTet-Off Advanced et pTRE-tight de Clontech Laboratories inc. (Mountain View, CA) et pGEX-6P1, donné généreusement par le Dr Simon Rousseau (Meakins-Christie, McGill), provient de GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA). La séquence de l'épitope V5, ajouté en amont des séquences α ENaC dans les plasmides pTRE-tight, correspond à 5'GGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTC TACG 3' et permet l'amplification spécifique de l'ARNm α ENaC recombinant par RT-qPCR par rapport au transcrit endogène.

Tableau 5. Nomenclatures des différentes constructions

Vecteur	Séquence du transcrit - Référence NCBI	Enzymes de restriction
pGL3- α ENaC-promoteur	Fragment 2,9-kb souris (Dagenais et al., 2001a)	<i>Bam</i> HI – <i>Msc</i> I
pLENTI-Luc-3'UTR-comp	Luc + NM_031548.2 – nu. 2466 - 3373	Recombinaison
pLENTI-Luc -3'UTR-del	Luc + NM_031548.2 – nu. 2466 - 2844	Recombinaison
pTRE-Luc-3'UTR-comp	Luc + NM_031548.2 – nu. 2466- 3373	<i>Nhe</i> I – <i>Cla</i> I
pTRE-Luc-3'UTR-del	Luc + NM_031548.2 – nu. 2466- 2844	<i>Nhe</i> I – <i>Cla</i> I
pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp	NM_031548.2 – nu. 366 - 3373	<i>Nhe</i> I – <i>Cla</i> I
pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-del1	NM_031548.2 – nu. 366 - 3096	<i>Nhe</i> I – <i>Cla</i> I
pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-del2	NM_031548.2 – nu. 366 - 2907	<i>Nhe</i> I – <i>Cla</i> I
pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-del3	NM_031548.2 – nu. 366 - 2844	<i>Nhe</i> I – <i>Cla</i> I
pcDNA3-hnRNP K	NM_057141.1 – nu. 28 - 1419	<i>Eco</i> RI – <i>Not</i> I
pcDNA3-DHX36	NM_001107678.1 – nu. 77 - 3079	<i>Hind</i> III – <i>Xho</i> I
pcDNA3-Tial1	NM_001013193.1 – nu. 209 - 1387	<i>Hind</i> III – <i>Xho</i> I
pGEX-hnRNP K	NM_057141.1 – nu. 28 - 1419	<i>Eco</i> RI – <i>Xho</i> I

2.5. Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse semi-quantitative (RT-PCR)

L'ARN total de cellulesensemencées dans des puits de 24mm a été extrait à l'aide du réactif TRIzol selon les indications du manufacturier. (Life Technologies Inc.). Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir de 3µg d'ARN total par la transcriptase inverse MMLV-RT (Life Technologies Inc.) en présence d'oligonucléotides oligo-dT (Roche Diagnostics, Laval, QC). L'ADNc a servi de matrice pour l'amplification en chaîne à l'aide de la *Taq* polymérase (Life Technologies Inc.) en utilisant des oligonucléotides spécifiques aux séquences des ARNm α ENaC (1µM) et β -actine (0,25µM) [Tableau 6].

Tableau 6. Oligonucléotides utilisés pour le RT-PCR semi-quantitatif

Oligonucléotides	Séquence 5' → 3'
α ENaC S	GAGCCTGCCTTTATGGATGA
α ENaC AS	GAGCTTTGCAACTCCGTTTC
β actine S	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG
β actine AS	GCCATCTCTTGCTCGAAGTC

L'amplification par RT-PCR semi-quantitative a été réalisée selon un protocole bien établi dans le laboratoire (Migneault et al., 2013). Afin de demeurer dans la phase exponentielle de l'amplification, la réaction a duré 19 cycles pour l'amplicon α ENaC et 15 cycles pour l'amplicon β -actine. Les produits ont été séparés sur gel d'agarose 1%, colorés au SyBr Safe (Life Technologies Inc.), puis visualisés par transillumination sur une plaque UV. Pour l'évaluation semi-quantitative de l'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires, le signal a été normalisé par l'expression de l'ARNm β -actine de l'ADNc correspondant.

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

L'ARN total a été obtenu tel que décrit précédemment. Les différents ARNm dont l'expression a été mesurée sont identifiés dans le tableau 7. L'ADNc a été synthétisé à partir de 1µg d'ARN total à l'aide du iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad Laboratories Inc., Mississauga, ON) selon les indications du fabricant. Pour la réaction de PCR en temps réel, 15ng d'ADNc (15µL final) a été amplifié en présence d'oligonucléotide sens et antisens (225nM) [Tableau 7] avec le réactif Platinum SYBR Green qPCR superMix-UDG (Life Technologies Inc.) dans le thermocycleur Rotor-Gene Q 5 Plex (Qiagen, Toronto, ON) (Figure 13A). Dans le cas de l'amplification de l'expression des transcrits V5-αENaC et tTA-Adv, seulement 5ng d'ADNc (10µL final) ont été amplifiés avec le SsoAdvanced Universal SYBR Green qPCR Supermix (BioRad Laboratories Inc.) dans le thermocycleur StepOne Plus® d'Applied Biosystems (Life Technologies inc.) Une incubation de 10min à 95°C permettant d'activer la *Taq* polymérase a précédé une amplification de 40 cycles selon les paramètres suivants : une phase de dénaturation de 10sec à 95°C, une phase d'appariement des amorces de 15sec à 58°C et une phase d'élongation de 20sec à 72°C. Des courbes de fusion à haute résolution ont permis de confirmer la nature et la spécificité des amplicons produits et l'absence de contamination par des sous-produits (Figure 13B). Le signal d'amplification des ADNc a été évalué de façon arbitraire en nombre de copies par rapport à une courbe standard provenant de cellules non traitées. Les signaux ont également été normalisés soit par l'expression de la β-actine soit de l'ARNr 5S. Dans le cas de l'expression de V5-αENaC, le signal a été normalisé par le signal de tTA-Adv afin de considérer également pour la normalisation l'efficacité de la transfection selon la méthode des delta-delta-Ct. Enfin, l'expression des différents ARNm étudiés a été exprimée en pourcentage d'expression après traitement par rapport à des cellules non traitées provenant du même animal.

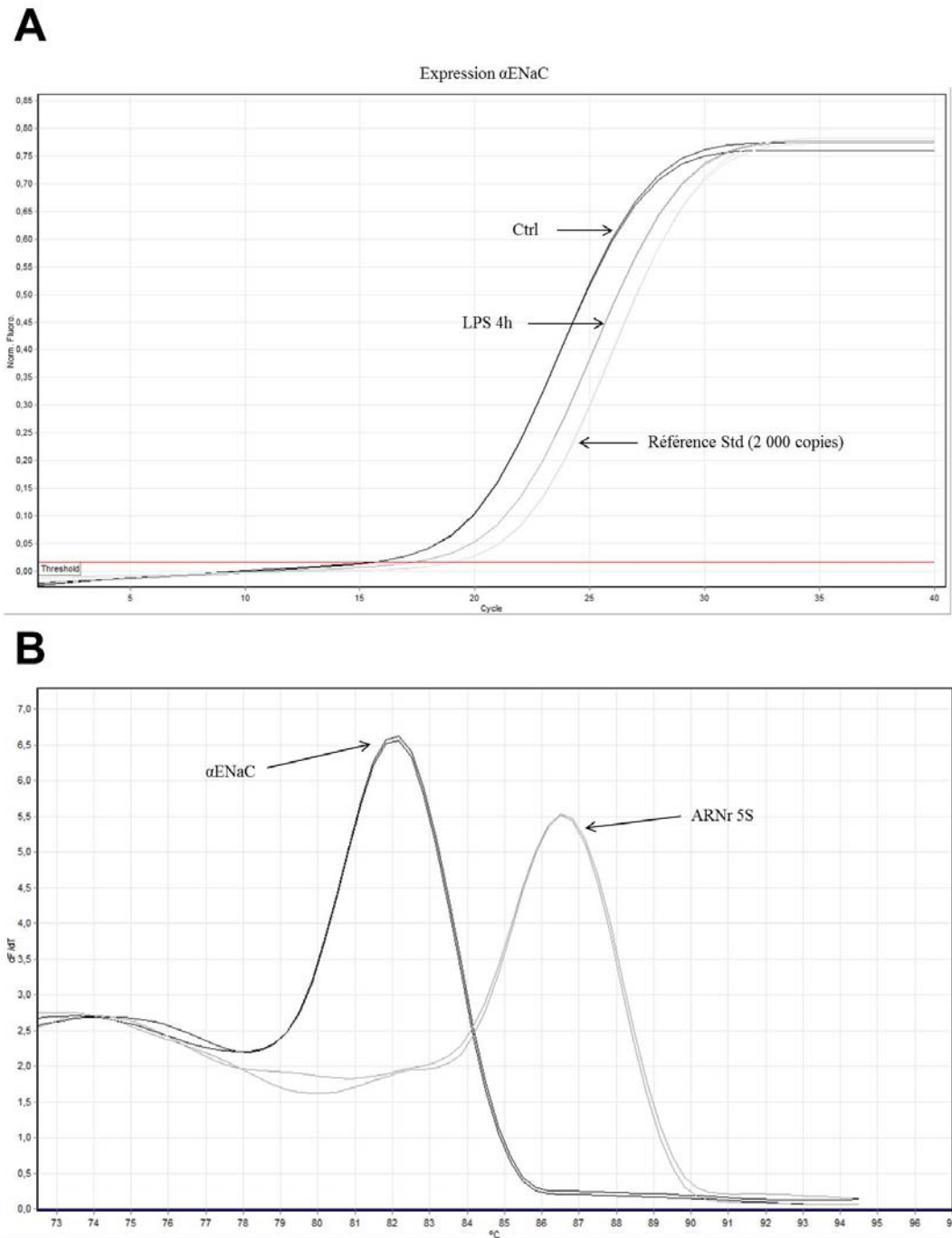


Figure 13. Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR)

(A) Représentation d'une réaction d'amplification du gène α ENaC à l'aide du thermocycleur Rotor-Gene Q 5 Plex. (B) Représentation de courbes de fusion à haute résolution confirmant la spécificité des amplicons et l'absence de contamination.

Tableau 7. Oligonucléotides utilisés pour le RT-PCR en temps réel

Oligonucléotides	Séquence 5' → 3'
αENaC rt S	CGTCACTGTCTGCACCCTTA
αENaC rt AS	CCTGGCGAGTGTAGGAAGAG
βactine rt S	ACCGTGAAAAGATGACCCAGAT
βactine rt AS	CACAGCCTGGATGGCTACGT
IL-1α rt S	CCGGGTGGTGGTGTGTCAGCAA
IL-1α rt AS	AGCTGTGAGGTGCTGATCTGGGTT
IL-1β rt S	CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGCAGC
IL-1β rt AS	AGCCCAAGTCAAGGGCTTGGAA
TNF-α rt S	ACTTCGGGGTGATCGGTCCCA
TNF-α rt AS	TGGTTTGCTACGACGTGGGCT
5S rRNA rt S	ACAGCCATACCACCCTGAAC
5S rRNA rt AS	AAGCCTACAGCACCCGGTAT
Luciferase rt S	ATCCATCTTGCTCCAACACC
Luciferase rt AS	TTTTCCGTCATCGTCTTTCC
Renilla Luc. rt S	ATCGGACCCAGGATTCTTTT
Renilla Luc. rt AS	ACTCGCTCAACGAACGATTT
V5 rt S	CCTAACCCTCTCCTCGGTCT
V5 rt AS	TTGAATTGGTTGCCCTTCAT
tTA-Ad rt S	GCCTGACGACAAGGAAACTC
tTA-Ad rt AS	AGTGGGTATGATGCCTGTCC

2.7. Détection de l'activité des caspases 3/7

Les cellules épithéliales alvéolaires ont étéensemencées à une densité de $6,25 \times 10^5$ cellules par puits sur une plaque de 24 puits. À partir du jour 4, les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide (0,1, 1,0 ou $8,8\mu\text{M}$) ou des LPS ($15\mu\text{g}/\text{mL}$) durant 2, 4, 6 ou 24h. La mesure de l'activité des caspases 3/7 a été effectuée avec le kit Caspase-Glo 3/7 assay (Promega Corporation) selon les instructions du fabricant. Brièvement, suite à l'incubation des cellules avec la cycloheximide ou les LPS, un volume de $100\mu\text{L}$ de réactif Caspase-Glo a été ajouté dans chaque puits contenant préalablement $100\mu\text{L}$ de milieu de culture. Suite à une faible agitation de 30s, la plaque a été incubée à 25°C durant 30min. $100\mu\text{L}$ du mélange de réaction a ensuite été transféré dans une plaque 96 puits où l'activité des caspases 3/7 a été mesuré par luminescence avec un luminomètre Synergy 2 (Biotek, Winooski, VT). Un dosage de protéines par la technique de Bradford (BioRad Laboratories Inc.) a été effectué avec le $100\mu\text{L}$ restant afin de normaliser l'activité des caspases 3/7 par rapport à la quantité de protéines.

2.8. Détection de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

Les cellules épithéliales alvéolaires ont étéensemencées à une densité de $1,6 \times 10^5$ cellules par puits sur une plaque de 96 puits. Les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide ($1,0\mu\text{M}$) ou des LPS ($15\mu\text{g}/\text{mL}$) durant 4 ou 24h dans $200\mu\text{L}$ de milieu MEM exempt de SVF. Suite à l'incubation, la mort cellulaire représentée par l'activité de la LDH détectée dans le milieu de culture a été mesurée avec le kit LDH Cytotoxicity Assay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) selon les instructions du fabricant. Brièvement, la plaque a été centrifugée à 400 g durant 5min, puis $100\mu\text{L}$ du milieu de culture a été transféré dans une plaque de 96 puits en présence de $100\mu\text{L}$ de la solution de réaction. La plaque a été incubée à 25°C durant 30min sous faible agitation, puis une lecture de l'absorbance à 490nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre. Parallèlement à l'incubation, les cellules ont été lysées avec $200\mu\text{L}$ de Triton X-10 0,5% durant 30min, puis $100\mu\text{L}$ de ce lysat a été utilisé pour mesurer l'absorbance selon les indications précédentes, afin de normaliser l'activité de la LDH.

2.9. Immunobuvardage de type Western

L'expression des différentes protéines étudiées a été mesurée à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western. Les cellules épithéliales traitées ou transfectées ont été rincées à deux reprises avec du PBS et lysées avec 200µL de tampon de lyse (voir Annexe 2) supplémenté avec des cocktails d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Life Technologies Inc.) durant 15min sous agitation à 4°C. Les cellules ont ensuite été collectées avec un racloir en caoutchouc (policeman) puis centrifugées à 12 000 g durant 10min à 4°C, afin de récupérer le surnageant. La concentration protéique du surnageant a été évaluée à l'aide de la technique de Bradford. La quantité de protéines totales à utiliser a été évaluée selon une courbe de concentration variant de 5 à 50µg, dépendamment de l'anticorps primaire utilisé. Les protéines totales ont été solubilisées dans un tampon d'électrophorèse (voir Annexe 2) et incubées à 95°C durant 10min afin de permettre la dénaturation des protéines. La séparation des échantillons protéiques a été effectuée à l'aide d'un gel de polyacrylamide 10% dénaturant (SDS-PAGE) dans un tampon de migration (voir Annexe 2). La migration a été effectuée durant 30min à 90V, suivi de 1h à 120V. Les échantillons ont ensuite été transférés dans un tampon de transfert (voir Annexe 2) sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) préalablement activée au méthanol durant 10sec. Le transfert a été effectué à 70V durant 1h30 à l'aide du système de transfert Criterion (BioRad Laboratories Inc.). Suite au transfert, les membranes ont été saturées avec une solution de tampon salin tris-Tween 0,1% (TBST) (ou de tampon salin phosphate-Tween 0,1% (PBST)) contenant 5% (p/v) de lait écrémé ou 5% (p/v) d'albumine de sérum bovin (BSA) sous agitation durant 1h à température de pièce. Une fois saturées, les membranes ont été rincées à trois reprises avec une solution TBST (ou PBST) sous agitation durant 15min. Les membranes ont ensuite été incubées durant une nuit en présence de l'anticorps primaire [Tableau 8], puis rincées à trois reprises dans une solution TBST (ou PBST). Suite au rinçage, les membranes ont été incubées durant 1h sous agitation à la température de la pièce avec les anticorps secondaires liés à la peroxydase de raifort appropriés à l'anticorps primaire utilisé dans une solution TBST (ou PBST) contenant 5% (p/v) de lait écrémé ou BSA [Tableau 8]. Suite aux lavages (3x 15min TBST ou PBST), les membranes ont été incubées en présence du réactif luminescent Immun-Star WesternC Kit (BioRad Laboratories Inc.), puis l'expression des protéines a été mesurée à l'aide du système

de chimioluminescence ChemiDoc XRS+ (BioRad Laboratories Inc.). L'intensité de chaque bande spécifique a été quantifiée avec le programme Image Lab (BioRad Laboratories Inc.).

Tableau 8. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les protéines étudiées.

Protéine	Anticorps primaire	Anticorps secondaire (SantaCruz Biotechnologies)
ERK1/2 (p42/44) phosphorylé	Anti-pERK1/2 1:1000 TBST lait 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-lapin 1:4000 TBST lait 5%
ERK1/2 (p42/44) total	Anti-ERK1/2 1:1000 TBST lait 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-souris 1:4000 TBST lait 5%
p38 phosphorylé.	Anti-p-p38 1:1000 PSBT BSA 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-lapin 1:4000 PBST lait 5%
p38 total	Anti-p38 1:1000 TBST BSA 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-lapin 1:4000 TBST lait 5%
JNK (p46/54) phosphorylé.	Anti-p-JNK 1:1000 TBST BSA 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-lapin 1:4000 TBST lait 5%
JNK (p46/54) total	Anti-JNK 1:1000 TBST BSA 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-lapin 1:4000 TBST lait 5%
DHX36	Anti-DHX36 1:1000 TBST BSA 5% (Abcam Inc.)	Anti-lapin 1:2000 TBST lait 5%
hnRNP K	Anti-hnRNPK 1:1000 TBST BSA 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-lapin 1:2000 TBST lait 5%
Tial1	Anti-Tial1 1:1000 TBST BSA 5% (Abcam Inc.)	Anti-lapin 1:2000 TBST lait 5%
Glutathion S-transférase (GST)	Anti-GST 1 :1000 TBST BSA 5% (Cell Signaling Technology)	Anti-souris 1:2000 TBST lait 5%

2.10. Transfection transitoire des cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules épithéliales alvéolaires sont des cellules en culture primaire qui sont très difficiles à transférer. Les techniques de transfection usuelles utilisées en laboratoire, notamment les liposomes, ont présenté des efficacités de transfection médiocres. La transfection par électroporation avec le système NEON (Life Technologies Inc.) a permis d'obtenir un taux d'efficacité de transfection variant entre 25 et 30% tel qu'analysé par le nombre de cellules positives exprimant GFP.

Suite à leur isolation, les cellules épithéliales alvéolaires ont étéensemencées à une densité de 14×10^6 cellules dans un pètri de culture cellulaire de 100mm. Au jour 2, les cellules ont été traitées avec 5mL de trypsine 0,05% durant 3min à 37°C pour mettre les cellules en suspension. La trypsine a ensuite été neutralisée avec l'ajout de 14mL de milieu de culture MEM + 10% SVF sans antibiotique, puis les cellules ont été centrifugées à 300 g durant 5min. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1mL de PBS et centrifugées une seconde fois. Parallèlement, le décompte des cellules vivantes a été déterminé à l'hématimètre en présence de bleu trypan. Le culot a été resuspendu dans le tampon de resuspension R du système de transfection NEON à une concentration à 4×10^7 cellules/mL. Le mélange de cellules/ADN a été préparé selon la proportion de 4×10^5 cellules mélangées avec une quantité d'ADN de 0,5, 1 ou 2µg dépendamment du plasmide utilisé. 4×10^5 cellules ont été électroporées dans un embout électrode NEON de 10uL selon les conditions suivantes : deux pulses, 20ms par pulse à un voltage de 1450V. Suite à l'électroporation, les cellules ont immédiatement été déposées dans un puits contenant 1mL de milieu de culture MEM + 10% SVF exempt d'antibiotique. Au jour 4, le milieu de culture a été remplacé par un milieu MEM + 10% SVF contenant des antibiotiques et les cellules ont pu subir un traitement ou être utilisées au jour 5 selon l'expérience effectuée.

2.11. Détection de l'activité luciférase

La modulation de l'activité du promoteur α ENaC et l'implication de la région 3'UTR dans l'expression de l'ARNm α ENaC ont été évaluées par l'utilisation du système rapporteur luciférase. L'enzyme luciférase catalyse une réaction d'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 qui permet l'émission de lumière à une longueur d'onde de 562nm

parallèlement à la production d'oxyluciférine. Afin d'évaluer l'activité transcriptionnelle du promoteur α ENaC, celui-ci a été cloné en amont du gène luciférase (LUC) provenant de la luciole (*Photinus pyralis*). Afin d'évaluer le rôle de la région 3'UTR du messenger α ENaC sur la stabilité du transcrit, cette région a été clonée en aval de la luciférase et l'activité enzymatique déterminée par luminométrie. L'intensité de l'activité luciférase mesurée nous a permis de déterminer rapidement si le 3'UTR α ENaC pouvait moduler de façon exogène soit la traduction, soit la stabilité post-transcriptionnelle de la luciférase.

Pour mesurer l'activité du promoteur, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pGL3- α ENaC-promoteur comprenant le promoteur α ENaC murin en amont du gène LUC (Dagenais et al., 2001a; Dagenais et al., 2006; Dagenais et al., 2004). Dans le cas de l'évaluation du rôle du 3'UTR, les cellules ont été transfectées avec les plasmides pLENTI-Luc-3'UTR-comp ou pLENTI-Luc-3'UTR-del possédant respectivement un fragment de 894bp et 374 bp du 3'UTR α ENaC de rat (Migneault et al., 2013). Dans les deux cas, le plasmide pRL-SV40 codant pour la luciférase de *Renilla reniformis* sous le contrôle du promoteur SV40 a également été co-transfecté afin de normaliser le signal luciférase pour le niveau de transfection d'une condition et d'un tube à l'autre. Les mesures de l'activité de LUC et de la *Renilla Luciferase* ont été effectuées à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corporation) selon les indications du fabricant. Brièvement, les cellules transfectées ont été rincées au PBS de 48 à 72h post-transfection et lysées avec 250 μ L de tampon « Passive Lysis Buffer » durant 15min sous faible agitation. Suite à l'incubation, 100 μ L du réactif LARII a été déposé dans une plaque blanche de 96 puits pour chaque condition expérimentale (en duplicata). Une première mesure de luminescence, représentant le bruit de fond, a été effectuée à 562nm à l'aide d'un luminomètre. Par la suite, 20 μ L du lysat cellulaire a été ajouté au réactif LARII et l'activité de LUC mesurée par luminométrie à 562 nm. Finalement, 100 μ L du réactif *Stop and Glow* a été ajouté dans chaque puits afin d'arrêter la réaction précédente et de mesurer l'activité de la *Renilla Luciferase* pour permettre la normalisation du signal.

2.12. Développement du système Tet-Off

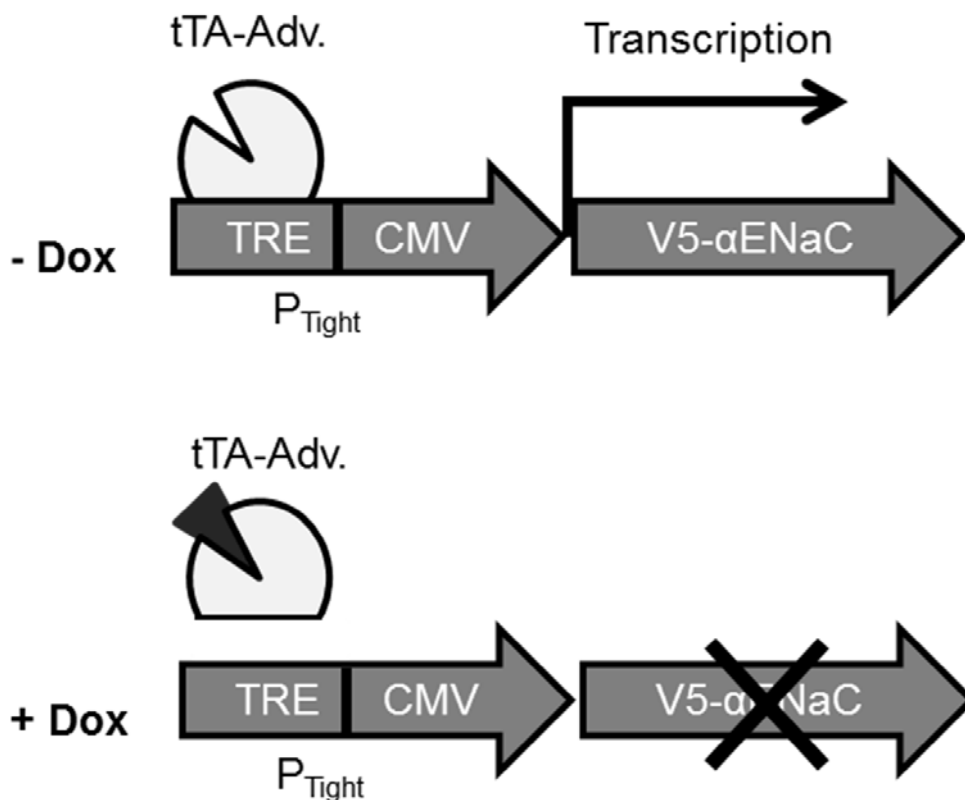


Figure 14. Système de contrôle transcriptionnel Tet-Off avec V5-αENaC

En absence de doxycycline, la protéine tTA-Adv. s'associe au promoteur P_{Tight} ce qui permet la transcription du gène V5-αENaC. Suite à l'ajout de doxycycline, la protéine tTA-Adv se dissocie du promoteur provoquant l'arrêt de la transcription du gène V5-αENaC.

Un modèle Tet-Off a été développé afin d'étudier l'implication du 3'UTR de l'ARNm αENaC dans la modulation du messager, permettant l'évaluation de la demi-vie du messager αENaC lorsque la doxycycline vient inhiber spécifiquement l'expression de αENaC exprimé dans ce système [Figure 14]. La séquence codante de l'ARNm αENaC et différentes tailles de son 3'UTR (NM_031548.2) ont été insérées en aval du promoteur P_{Tight}. Une séquence de l'épitope V5 a également été insérée immédiatement en amont de la séquence codante de αENaC. Cette séquence permet une amplification spécifique par qPCR de l'ARNm αENaC provenant du système Tet-Off par rapport au messager αENaC endogène. La demi-vie de l'ARNm V5-αENaC a par la suite été mesurée sur une période de 6h après l'arrêt de la transcription par la doxycycline.

2.13. Isolation de protéines liant l'ARNm α ENaC par chromatographie d'affinité

La figure 15 représente les différentes étapes de cette technique.

2.13.1. Synthèse de l'ARN biotinylé

Deux matrices d'ADN ont été synthétisées : une matrice correspondant au 3'UTR complet de l'ARNm α ENaC et une matrice correspondant à la séquence inverse de l'ARNm β -actine qui a servi de contrôle négatif (non spécifique). L'ADN servant de matrice pour la synthèse de l'ARN biotinylé a été synthétisé par PCR classique à partir d'oligonucléotides comportant la séquence promotrice de l'ARN polymérase T7 [Tableau 9].

Tableau 9. Oligonucléotides utilisés pour la synthèse de la matrice d'ADN.

Oligonucléotides	Séquence 5' → 3'
T7 3'UTR α ENaC rat S	TAATACGACTCACTATAGGGGATCCTCTCACCCAGCCCTG
T7 3'UTR α ENaC rat AS	TTTATTGAGTACCTGCCTACCCGTCCCAAGTGGGAGAC
T7 Irrelevant β act. S	TAATACGACTCACTATAGGGGCCATCTCTTGCTCGAAGTC
T7 Irrelevant β act. AS	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG

Les ARN biotinylés ont été synthétisés avec le système AmpliScribe T7-Flash Biotin-RNA Transcription de la compagnie Epicentre Technologies Corp. (Chicago, IL) selon les instructions du fabricant. Ce système permet l'incorporation de la biotine sur les nucléotides d'uridine triphosphate. Brièvement, 1 μ g de la matrice d'ADN (3'UTR α ENaC ou non spécifique) a été combiné aux réactifs du système de transcription *in vitro* pour un volume total de 20 μ L, puis incubée à 37°C durant 4h. La matrice d'ADN a ensuite été dégradée par un traitement à la DNase I durant 15min à 37°C. L'ARN biotinylé a finalement été purifié par extraction à l'aide du réactif TRIzol selon les conditions du manufacturier.

2.13.2. Immobilisation de l'ARN biotinylé sur les billes magnétiques

1µg de billes magnétiques Dynabeads M-280 (Life Technologies Inc.) ont subi des séries de rinçage : 3 rinçages avec 200µL du tampon « Binding & Washing » 1X, 2 rinçages intercalé de 2min d'incubation avec 200µL de la solution DEPC-A (voir Annexe 3) et 2 rinçages avec 200µL de la solution DEPC-B (voir Annexe 3). Les billes ont ensuite été resuspendues dans 200µL de solution « Binding & Washing » 2X. Par la suite, 200µL d'ARN biotinylé (10µg) resuspendu dans l'eau ont été ajoutés aux billes et incubés 15min à température de pièce sous faible agitation. Les billes magnétiques ont été rincées à trois reprises avec la solution « Binding & Washing » 1X et resuspendues dans 200µL de la solution tampon B (voir Annexe 3).

2.13.3. Préparation de l'extrait protéique et isolation des protéines liant l'ARN

Après deux rinçages au PBS, les cellules épithéliales alvéolaires ont été lysées avec 200µL de la solution tampon A (voir Annexe 3) pour 15 min à 4°C sous agitation. Les cellules ont ensuite été récoltées avec un racloir en caoutchouc (policeman) puis centrifugées à 12 000 g durant 10min à 4°C, afin de récupérer le surnageant. La concentration protéique du surnageant a été évaluée à l'aide de la technique de Bradford. 200µL d'extrait protéique (200µg/µL) a été ajouté aux billes magnétiques saturées d'ARN biotinylé (200µL), suivi d'une incubation de 1h à 4°C sous faible agitation. Le surnageant contenant les protéines non-liées a été retiré et les billes magnétiques ont été rincées à cinq reprises avec 500µL de la solution de tampon C (voir Annexe 3). Suite au lavage, les billes magnétiques ont été incubées dans 35µL de tampon d'électrophorèse durant 15min à 95°C afin d'éluer et de dénaturer les protéines liant l'ARN biotinylé. Les protéines isolées ont ensuite été séparées sur un gel de polyacrylamide 10% dénaturant SDS-PAGE, puis celui-ci a été coloré au nitrate d'argent ou transféré sur une membrane PVDF afin d'y effectuer un immunobuvardage de type Western.

2.13.4. Identification des protéines isolées par spectrométrie de masse

Suite à la coloration au nitrate d'argent, les bandes qui représentaient un enrichissement avec l'ARN biotinylé 3'UTR α ENaC par rapport au contrôle négatif ont été coupées en chambre blanche et conservées à -80°C . Parallèlement, les bandes qui étaient à la même hauteur dans le contrôle négatif ont également été coupées afin de comparer les niveaux d'enrichissement. Les échantillons ont ensuite été transmis à la plate-forme de protéomique de l'IRCM afin d'y effectuer les étapes de digestion à la trypsine et l'analyse par spectrométrie de masse (LC/MS/MS) des candidats protéiques. Les résultats ont été analysés à l'aide du programme Scaffold 4 (Proteome Software Inc.).

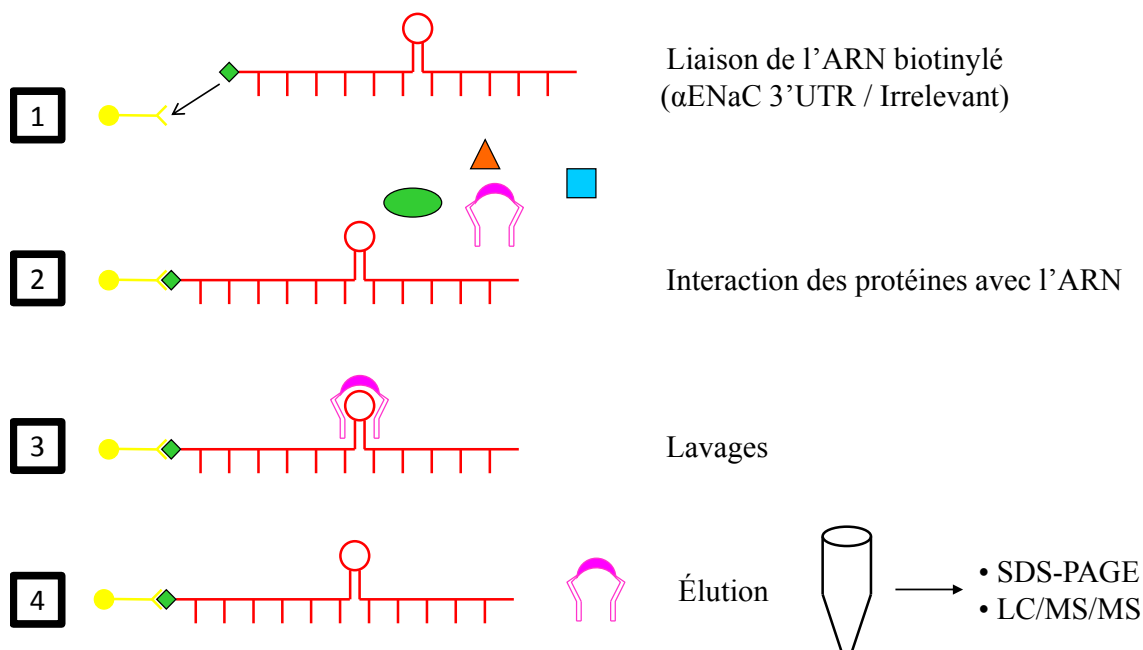


Figure 15. Isolation des protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité

2.14. Isolation de l'ARNm α ENaC par chromatographie d'affinité à l'aide de protéines chimériques GST

La figure 16 représente les différentes étapes de cette technique.

2.14.1. Synthèse de protéines liant l'ARN

Des bactéries *Escherichia coli* DH5 α clonés avec le plasmide pGEX-hnRNP K ont été mises en culture dans un milieu LB 1X durant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 5mL de cette solution bactérienne a été transférée dans 35mL de LB 1X et incubée durant 3h à 37°C sous agitation. Par la suite, de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a été ajoutée à la solution bactérienne pour une concentration finale de 0,38mM et l'incubation s'est poursuivie durant 3h. Les bactéries ont été centrifugées à 4 700 g durant 5min et resuspendues dans 2mL de PBS froid en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase. 250 μ g de lysosymes ont été ajoutés aux bactéries resuspendues puis incubées durant 5min à température ambiante. Les bactéries ont ensuite été lysées en effectuant dix répétitions d'une série de gel dans un bain d'azote (20sec) suivi d'un dégel dans un bain d'eau à 30°C (1min 30sec). Le lysat a été centrifugé à 10 000 g durant 15min afin d'y récupérer le surnageant (Figure 16. Étape 1).

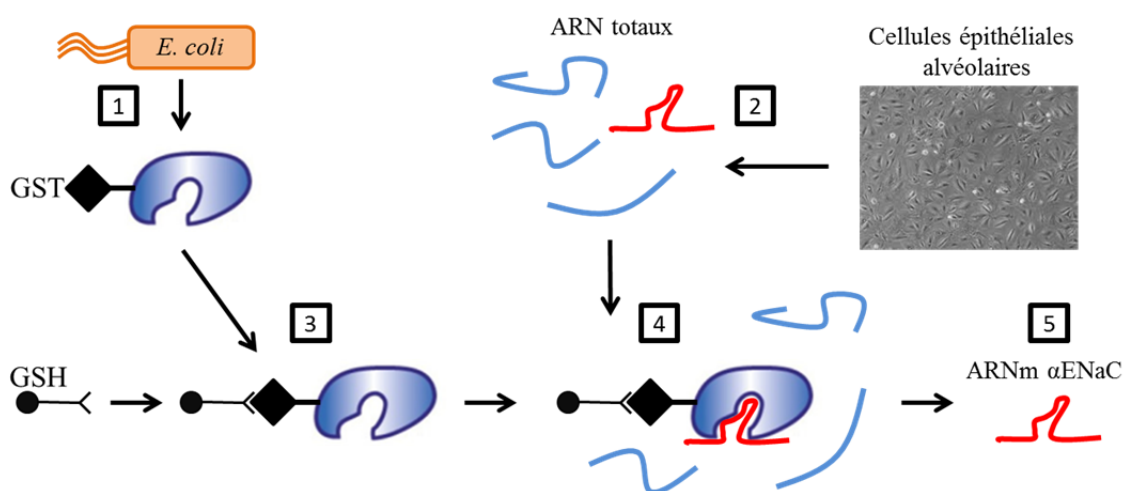


Figure 16. Isolation de l'ARNm α ENaC liant des protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité

2.14.2. Immobilisation des protéines GST-hnRNPK sur les billes magnétiques

200µL de billes magnétiques Glutathione Magnetic Beads (Pierce Biotechnology Inc.) ont subi deux rinçages de 400µL avec du tampon « Binding & Washing » 1X (voir Annexe 4). Les billes ont ensuite été resuspendues dans 400µL de solution « Binding & Washing » 1X, puis 200µL de lysat bactérien a été ajouté aux billes. Le mélange billes-protéines a été incubé durant une nuit à 4°C sous faible agitation. Les billes magnétiques ont été rincées à trois reprises avec 400µL de la solution « Binding & Washing » 1X et resuspendues dans 400µL de la solution tampon RIPA (voir Annexe 4) (Figure 16. Étape 3).

2.14.3. Isolation des ARN liant la protéine hnRNPK

20µg d'ARN totaux provenant de cellulesensemencées dans des pétris de 100mm ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol selon les indications du manufacturier (Life Technologies Inc.) (Figure 16. Étape 2) et ont été ajoutés aux billes magnétiques resuspendues dans le tampon RIPA. Celles-ci ont été incubées durant une nuit à 4°C sous faible agitation puis ont été rincées à trois reprises avec 400µL de la solution tampon RIPA (Figure 16. Étape 4). Suite au lavage, les billes magnétiques ont été incubées dans 1mL de TRIzol, puis les ARN ayant fixé la protéine GST-hnRNPK ont été extraits selon les indications du fabricant (Figure 16. Étape 5).

2.14.4. Mesure de l'enrichissement de l'ARNm α ENaC

L'ADNc a été synthétisé à partir de 500ng d'ARN extrait des billes GST-hnRNP K à l'aide du iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad Laboratories Inc.) selon les indications du fabricant. Pour la réaction de PCR en temps réel, 5ng d'ADNc (10µL final) a été amplifié avec le SsoAdvanced Universal SYBR Green qPCR Supermix (BioRad Laboratories Inc.) dans le thermocycleur Applied Biosystems StepOne Plus (Life Technologies inc.) selon les conditions expérimentales précédentes.

2.15. Analyses statistiques

Tous les résultats expérimentaux ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. Différents tests statistiques ont été effectués en fonction des résultats analysés. Un test ANOVA à un facteur suivi d'un test *post hoc* de Bonferroni ou un test Kruskal-Wallis suivi d'un test *post hoc* de Dunn ont été effectués lors de comparaisons entre différentes conditions expérimentales. Un « One-sample t-test » a été accompli dans le cas de la comparaison entre une condition expérimentale et son contrôle appareillé (100%). Les tests de Student et de Mann-Whitney ont été utilisés afin de comparer deux conditions expérimentales spécifiques. Finalement, la régression non linéaire « One-phase decay » a permis d'évaluer les courbes de dégradation de l'ARNm α ENaC. Dans tous les cas, un résultat fut considéré significatif lorsque le test statistique présente un $P < 0,05$.

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Modulation de l'ARNm α ENaC par différents stress

3.1.1. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la cycloheximide 1,0 μ M ou des LPS 15 μ g/mL durant une période de 15min à 24h afin d'observer l'impact de ces molécules sur la modulation de l'ARNm α ENaC. L'expression de l'ARNm α ENaC a été progressivement inhibée par les deux traitements. Dans le cas de la cycloheximide, la modulation de l'ARNm α ENaC a présenté une variation en fonction du temps ($R^2=0,8414$) avec une dégradation de 50% de l'ARNm α ENaC suite à 4h de traitement à la cycloheximide [Figure 17A]. La modulation de l'expression du messenger α ENaC par les LPS fut très similaire à celle causée par la cycloheximide avec une corrélation dépendante au temps ($R^2=0,7779$) et également une inhibition de l'expression de 50% après 4h de traitement aux LPS [Figure 17B]. Dans les deux cas, les niveaux d'ARNm α ENaC ont atteint un plateau d'expression correspondant à 35% comparé aux cellules non traitées après 6h de traitement.

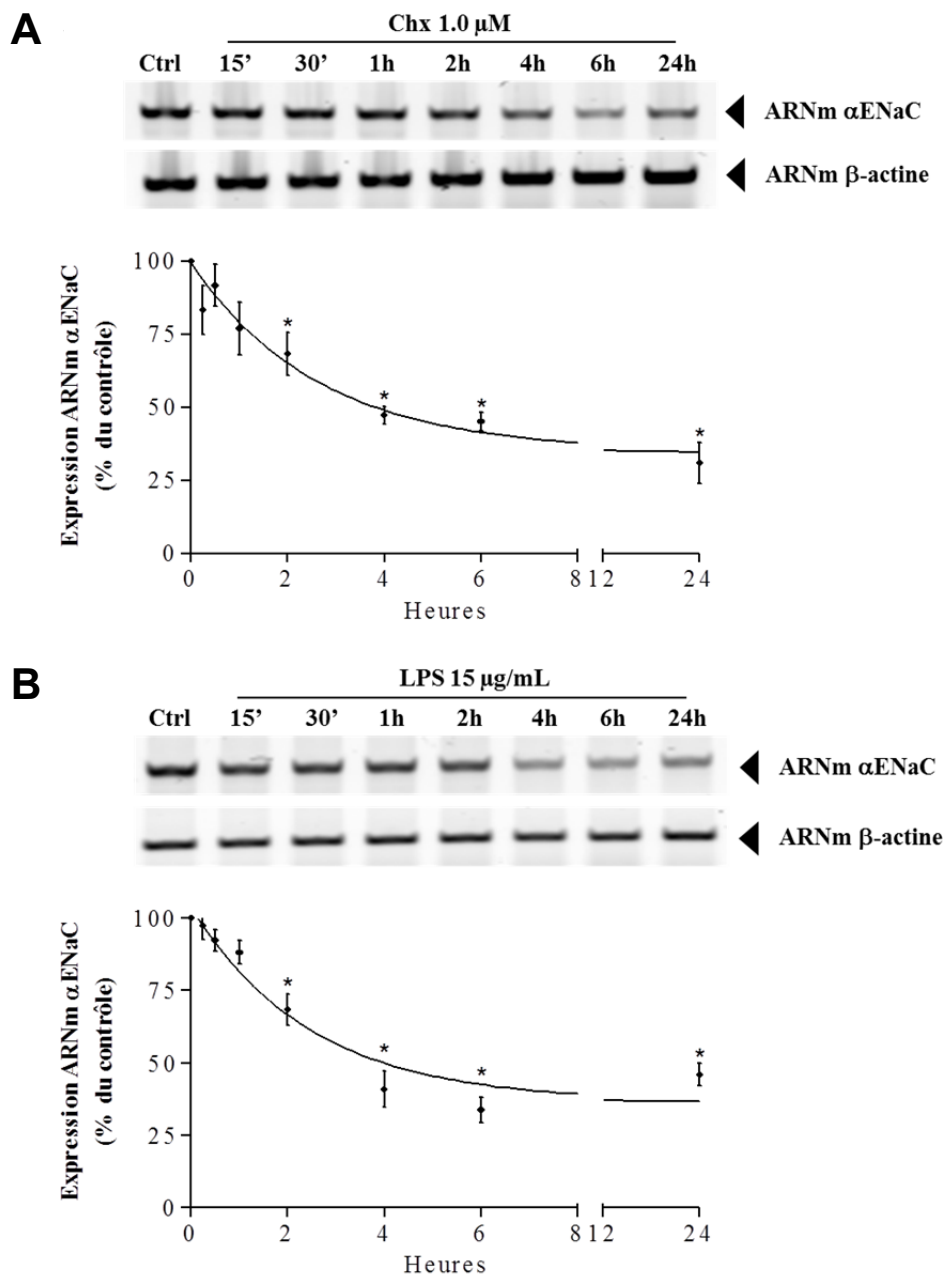


Figure 17. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées durant 15min à 24h avec de la cycloheximide 1,0 μ M (A) ou des LPS 15 μ g/mL (B). La dégradation de l'ARNm α ENaC a été déterminée par RT-*q*PCR et est également représentée par un gel d'agarose provenant d'une RT-PCR classique suite aux traitements respectifs. Les données sont exprimées en % d'expression de l'ARNm α ENaC comparé aux cellules non traitées \pm ESM après la normalisation avec la β -actine. La corrélation temporelle a été déterminée par une régression non linéaire « One-phase decay » : $R^2=0.8414$ pour la cycloheximide (Chx) (A) et $R^2=0.7779$ pour les LPS (B) (Test Kruskal-Wallis; * : $P<0.0001$ vs contrôle (Ctrl) $t = 0$; $n\geq 3$)

3.1.2. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC de façon « dose-dépendante » par la cycloheximide

La cycloheximide est connue pour être un inhibiteur de la traduction. Afin de mieux comprendre comment cette molécule affecte l'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires, celles-ci ont été traitées avec différentes concentrations de cycloheximide (0,1 à 8,8 μ M) durant 6h. Tel que démontré auparavant (Dagenais et al., 2001a), la cycloheximide aux concentrations de 5,0 et 8,8 μ M a inhibé de façon significative ($P < 0,05$) l'expression de l'ARNm α ENaC qui chute à 30% du niveau d'expression des cellules non traitées après 6h. Les concentrations plus faibles de cycloheximide (0,1, 0,5 et 1,0 μ M), considérées comme étant trop faibles pour inhiber la synthèse protéique dans des cellules épithéliales rénales (Itani et al., 2003), ont également inhibé l'expression de l'ARNm α ENaC [Figure 18].

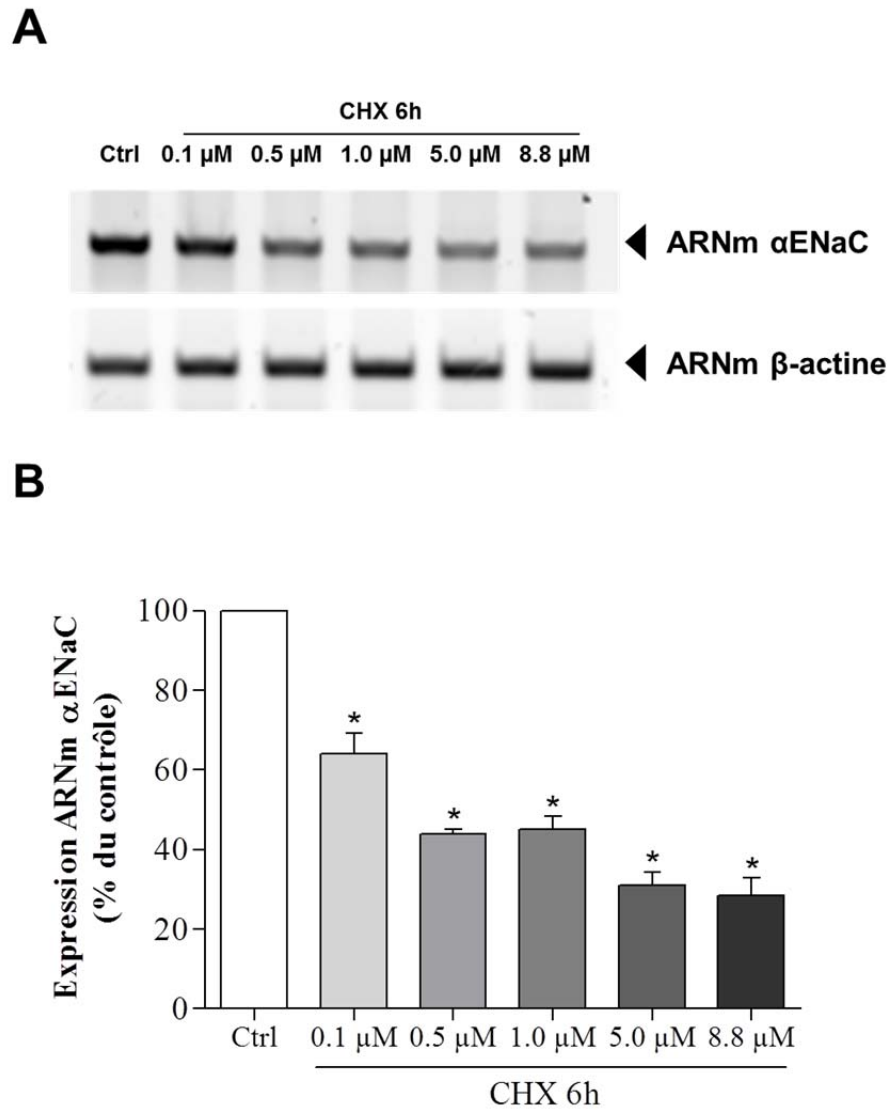


Figure 18. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC de façon « dose-dépendante » par la cycloheximide.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la cycloheximide (Chx) à des concentrations de 0,1 à 8,8 μ M durant 6h. (A) Un gel d'agarose démontrant la dégradation « dose-dépendante » de l'ARNm α ENaC suite à une RT-PCR. (B) L'expression du messager α ENaC déterminée par RT-*q*PCR est présentée pour chaque concentration de cycloheximide utilisée. Les données sont présentées sous la forme de % \pm ESM comparé aux cellules non traitées suite à une normalisation avec la β -actine. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle (Ctrl) $t = 0$; $n \geq 3$)

3.1.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par l'émétine

Afin d'évaluer l'importance de la synthèse protéique *de novo* sur l'expression de l'ARNm α ENaC, des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de l'émétine 20 μ M, un inhibiteur de la traduction. Des traitements effectués sur une période de 6h ont été incapables de moduler l'expression de l'ARNm α ENaC [Figure 19].

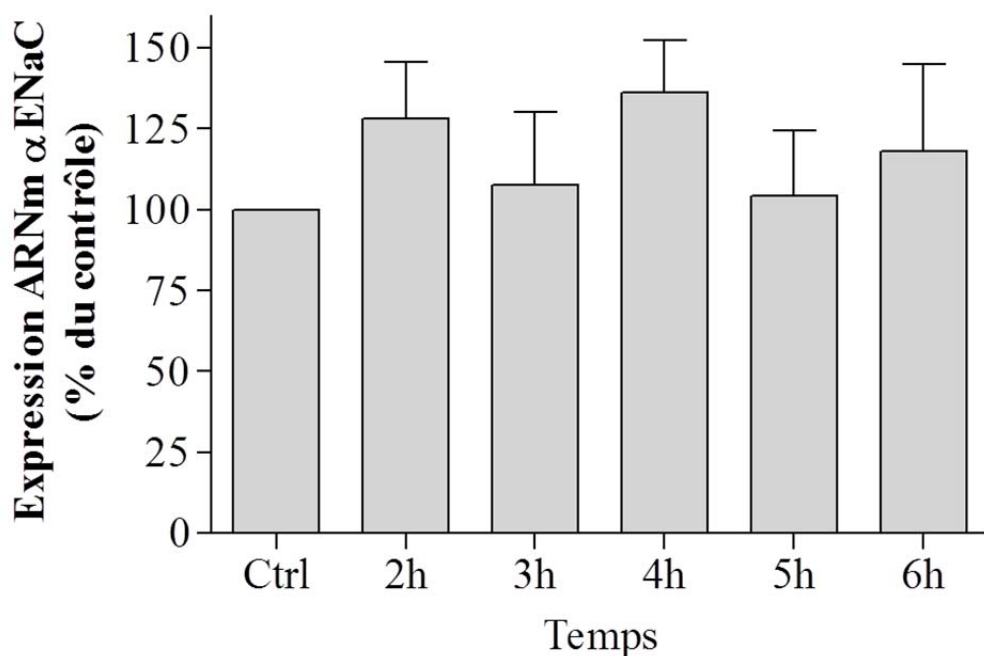


Figure 19. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par l'émétine.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de l'émétine 20 μ M durant 2-6h. L'expression de l'ARNm α ENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm α ENaC comparé aux cellules contrôles non traitées (Ctrl; $t = 0$) \pm ESM après la normalisation avec la β -actine. (Test ANOVA à un facteur; $n \geq 5$)

3.1.4. Effet de la cycloheximide et des LPS sur la mort cellulaire causée par apoptose et par nécrose

La chute de l'expression d'un ARNm peut être causée par différents mécanismes de régulation de celui-ci, mais pourrait également s'expliquer par une augmentation de la mort cellulaire. La cycloheximide et les LPS sont des molécules connues pour induire de la mortalité cellulaire (Kumagai et al., 2009; Song, Shi, Harken, & Meng, 2003). Pour cette raison, nous avons testé si les conditions expérimentales utilisées pouvaient induire de l'apoptose, estimée par l'activité des caspases 3-7, ou de la nécrose, estimée par l'activité de la LDH relarguée dans le milieu de culture. Les cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées à différentes concentrations de cycloheximide (0,1, 1,0 et 8,8 μ M) pour des périodes de 2 à 24h, alors que l'effet des LPS 15 μ g/mL a été testé après 4 à 24h de traitement. La cycloheximide 0,1 et 1,0 μ M a inhibé de façon significative ($P < 0,05$) l'activité des caspases 3-7 après 24h de traitement alors qu'à une concentration de 8,8 μ M, il y a eu une augmentation significative de celle-ci à 2 et 4h [Figure 20A]. Les LPS pour leur part ont induit une augmentation significative de l'activité des caspases 3-7 à 24h de traitement ($P < 0,05$), mais pas à 4h [Figure 20B]. Enfin, les traitements à la cycloheximide et aux LPS n'ont entraîné aucune modulation significative de la libération de la LDH [Figure 21].

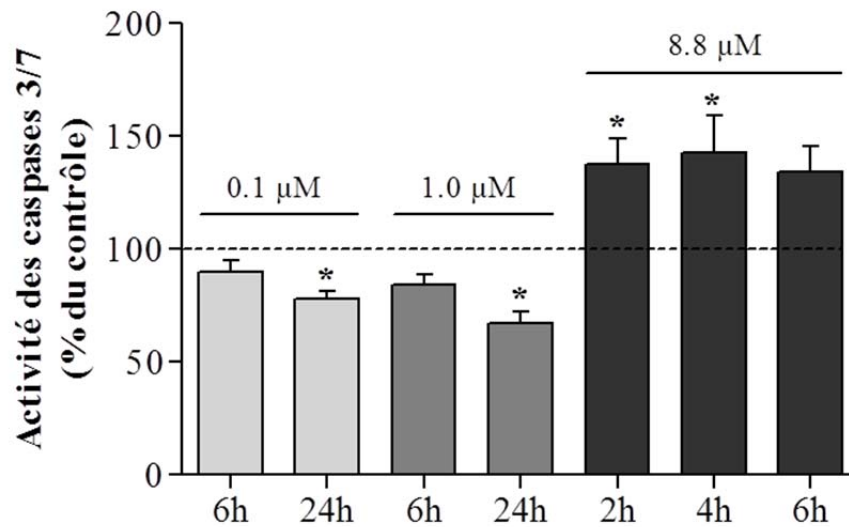
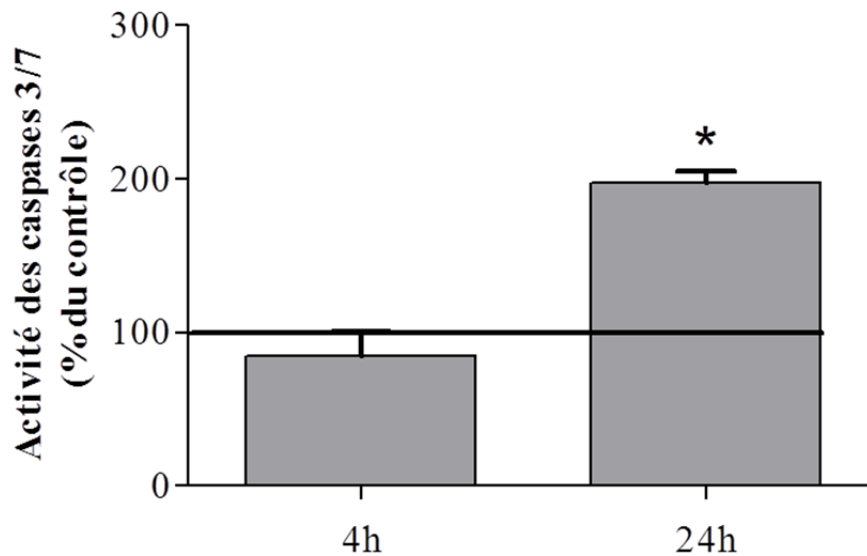
A**B**

Figure 20. Effet de la cycloheximide et des LPS sur l'activité des caspases 3 et 7.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la cycloheximide (0,1, 1,0 et 8,8μM) (A) et des LPS (15μg/mL) (B) durant 2, 4, 6 ou 24h. L'activité des caspases 3/7 a été évaluée avec le kit Caspase-Glo 3/7 assay (Promega Corporation) et est présentée sous la forme de % ± ESM par rapport aux cellules non traitées suite à la normalisation avec la quantité totale (μg) de protéines. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle; n≥4)

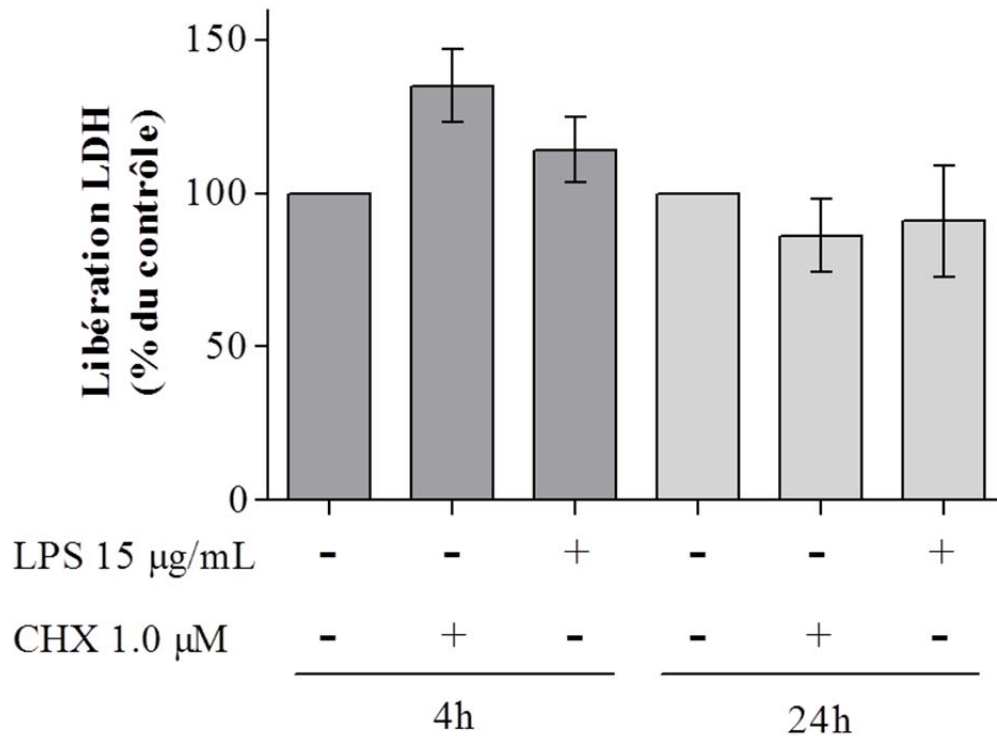


Figure 21. Effet de la cycloheximide et des LPS sur la libération de la LDH.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la cycloheximide (Chx) 1,0µM (colonne 2 et 5) ou des LPS 15µg/mL (colonne 3 et 6) durant 4h (colonne 1-3) ou 24h (colonne 4-6). La libération de LDH a été mesurée à l'aide du kit LDH Cytotoxicity Assay (Cayman Chemical) et est présentée sous la forme de % ± ESM par rapport aux cellules non traitées et est normalisée avec le niveau de LDH total. (Test Kruskal-Wallis; $n \geq 4$)

3.1.5. Modulation des voies de signalisation par la cycloheximide et les LPS

Nous avons testé par la suite la nature des voies de signalisation induites par la cycloheximide et les LPS pour déterminer si des voies de transduction communes pouvaient expliquer la modulation de l'ARNm α ENaC. Les niveaux d'expression et d'activation des MAPK ERK et p38, ainsi que de la SAPK JNK ont été analysés par immunobuvardage de type Western pour des périodes s'étalant de 5min à 24h de traitement après stimulation à la cycloheximide 1,0 μ M ou aux LPS 15 μ g/mL. Les cellules exposées à la cycloheximide ont présenté une activation soutenue de la MAPK p-ERK1/2 de 15min à 24h de traitement [Figure 22A]. La MAPK p38 a montré une activation significative ($P < 0,05$) à tous les temps testés avec un pic d'activation après 15-30 min suivie par une activation faible, mais soutenue jusqu'à 24h [Figure 23A]. La cycloheximide a également activé la SAPK JNK de manière transitoire avec un pic d'activation à 15-30min suivi d'un retour à la normale après environ 2h [Figure 24A].

Les cellules traitées aux LPS ont montré un profil d'activation qui diffère légèrement de celui induit par la cycloheximide. En effet, les MAPK ERK et p38, ainsi que la SAPK JNK ont montré une activation transitoire de celles-ci, détectable à partir de 15min avec des pics d'activation à 30min, suivis d'un retour au niveau de base après 2 à 3h, sans activation soutenue comme ce qui a été observé pour la cycloheximide [Figures 22B, 23B et 24B]. À tous les temps et conditions testées, les niveaux de ERK, p38 et JNK totaux sont demeurés constants, tel que démontré sur les immunobuvardages de type Western [Figure 22-24].

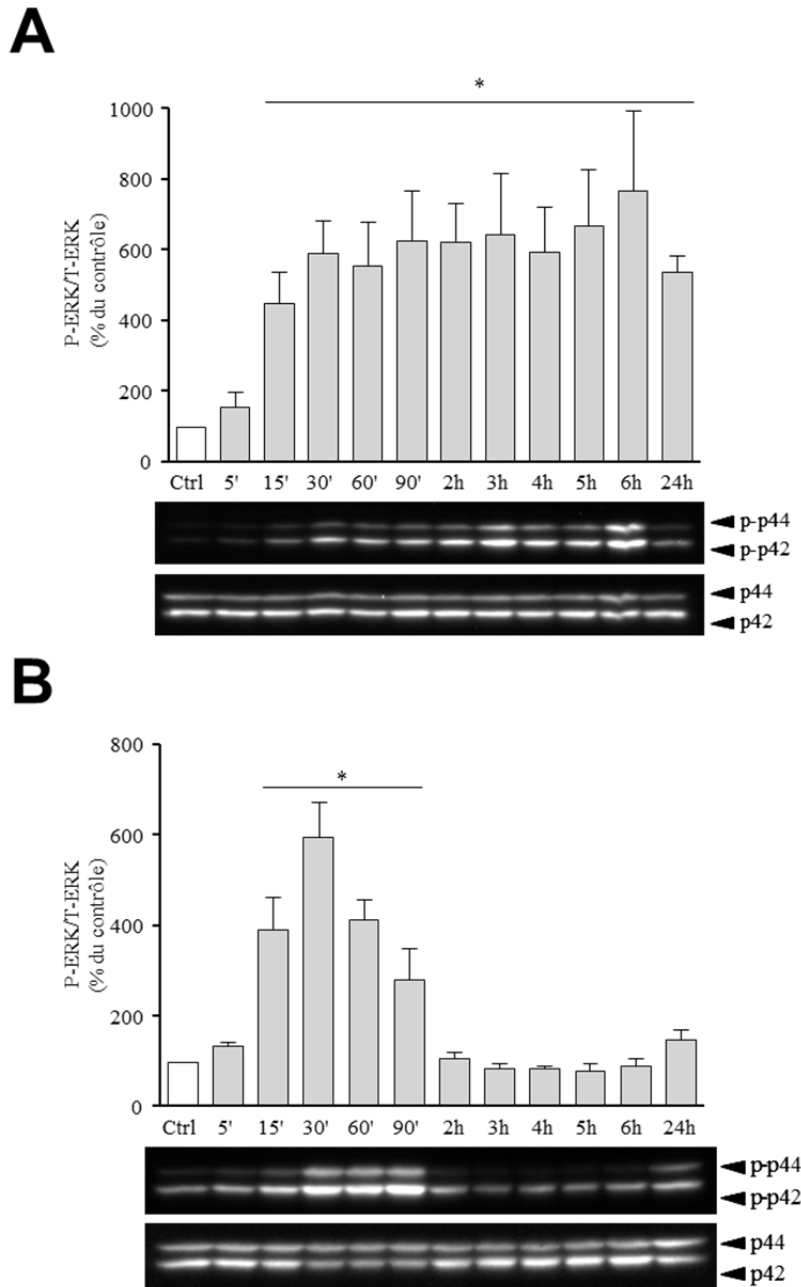


Figure 22. Activation de la voie de signalisation des MAPK ERK par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées sur une période de 5min à 24h avec de la cycloheximide 1,0 μ M (A) ou des LPS 15 μ g/mL (B). Des immunobuvardages de type Western des MAPK p-ERK et ERK sont présentés. L'activation de ERK a été quantifiée à l'aide d'un ratio phospho/total pour chaque temps étudié et exprimée en % d'activation comparée aux cellules non traitées \pm ESM. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : $P < 0.05$ vs contrôle (Ctrl) $t = 0$; $n \geq 3$)

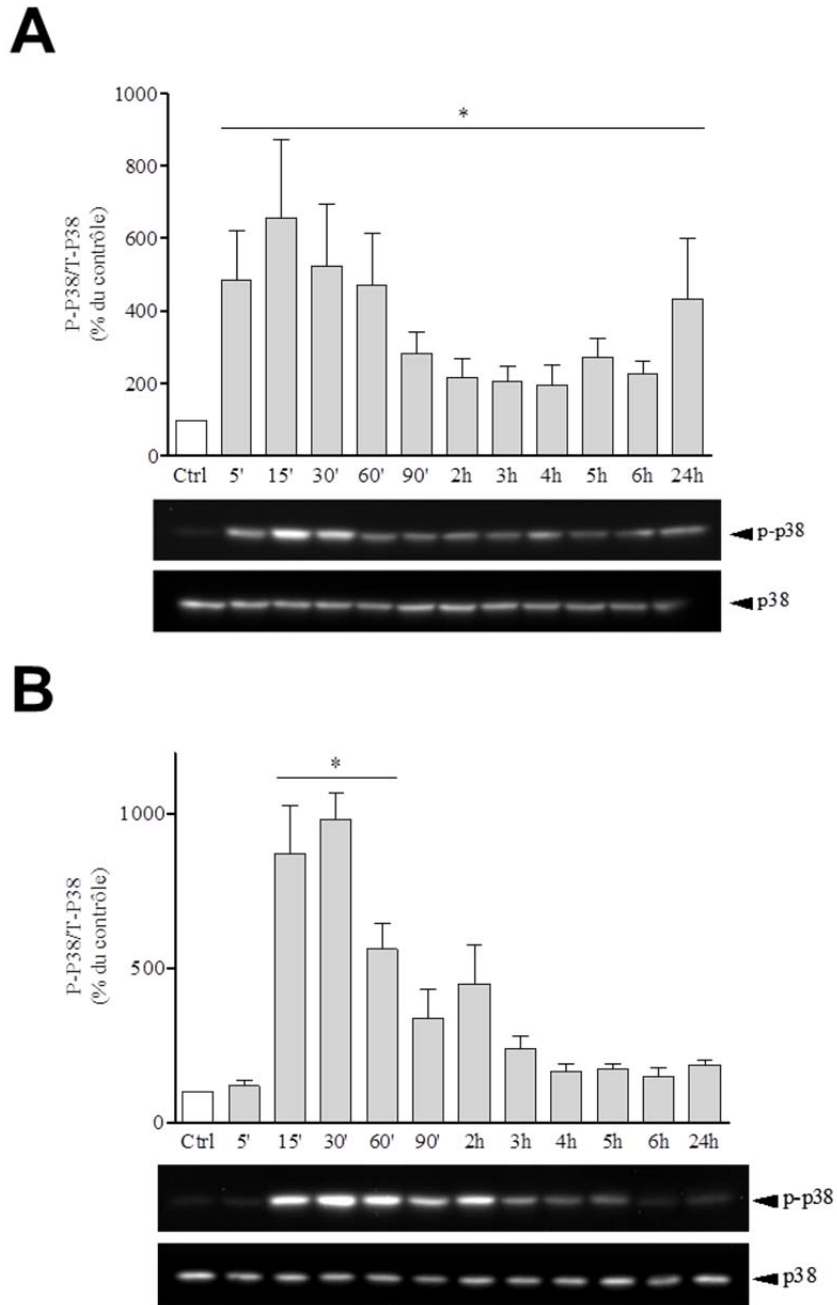


Figure 23. Activation de la voie de signalisation de la MAPK P38 par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées sur une période de 5min à 24h avec de la cycloheximide 1,0 μ M (A) ou des LPS 15 μ g/mL (B). Des immunobuvardages de type Western des MAPK p-p38 et p38 sont présentés. L'activation de p38 a été quantifiée à l'aide d'un ratio phospho/total pour chaque temps étudié et exprimée en % d'activation comparée aux cellules non traitées \pm ESM. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : $P < 0.05$ vs contrôle (Ctrl) $t = 0$; $n \geq 3$)

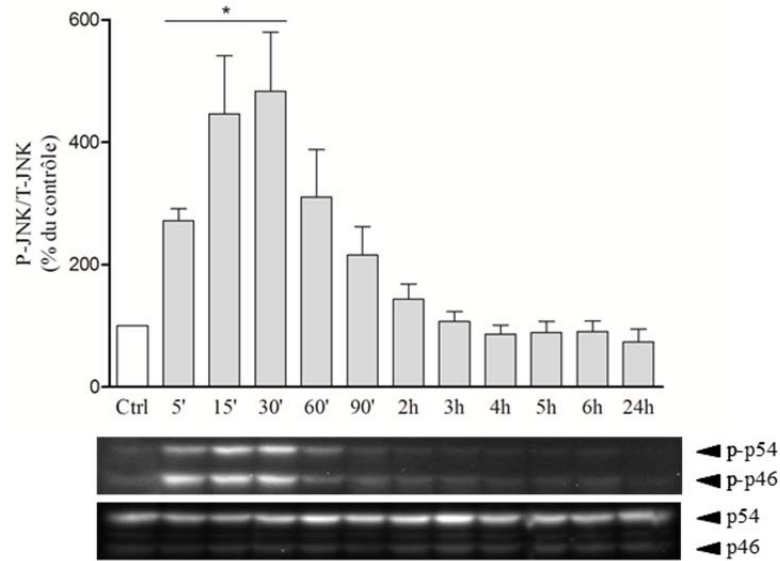
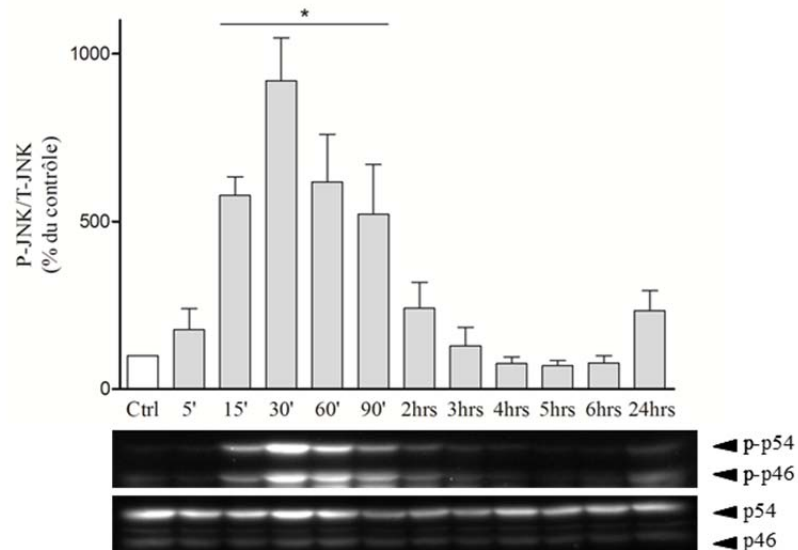
A**B**

Figure 24. Activation de la voie de signalisation des SAPK JNK1-2/3 par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées sur une période de 5min à 24h avec de la cycloheximide 1,0 μ M (A) ou des LPS 15 μ g/mL (B). Des immunobuvardages de type Western des SAPK p-JNK et JNK sont présentés. L'activation de JNK a été quantifiée à l'aide d'un ratio phospho/total pour chaque temps étudié et exprimée en % d'activation comparée aux cellules non traitées \pm ESM. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle (Ctrl) $t = 0$; $n \geq 3$)

3.1.6. Induction d'un stress inflammatoire par la cycloheximide

La cycloheximide n'est pas un stress pathophysiologique rencontré naturellement par les cellules épithéliales alvéolaires (Kominek, 1975). Puisque les cellules épithéliales alvéolaires réagissent souvent à un stress cellulaire en activant une réponse inflammatoire, nous avons testé si la cycloheximide au même titre que les LPS pouvait induire l'activation de plusieurs gènes inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , TNF α). Les deux traitements ont induit une augmentation significative (1 et 2 log) de l'expression des trois cytokines après 1h de traitement comparativement aux cellules non traitées. La modulation de l'expression des cytokines induites par les LPS a été supérieure par un facteur de 1 log à la réponse induite par la cycloheximide (P<0,05) [Figure 25].

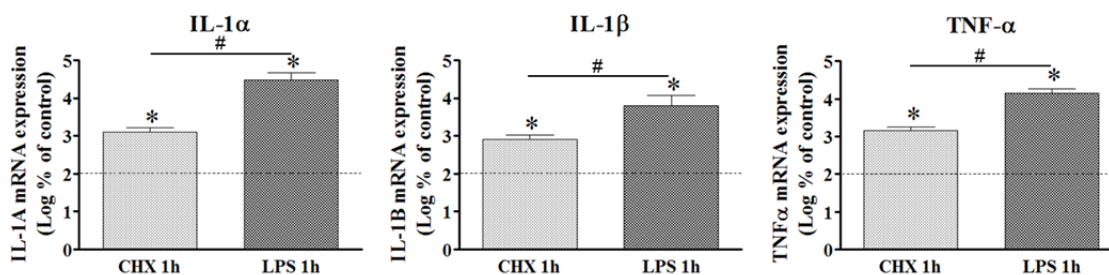


Figure 25. Modulation de l'expression des ARNm des cytokines IL-1 α , IL-1 β et TNF- α . Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la cycloheximide (Chx) (1,0 μ M) ou des LPS (15 μ g/mL) durant 1h. L'expression des ARNm a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % \pm ESM comparé aux cellules non traitées suite à la normalisation avec la β -actine. (One-sample t test * : P<0,05 vs contrôle (ligne hachurée); # : P<0,05 CHX vs LPS; n \geq 5)

3.1.7. Effet de l'inhibition des MAPK ERK1/2, p38 et JNK1-2/3 sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS

Puisque les MAPK ERK1/2, p38 et la SAPK JNK1-2/3 ont été activées par la cycloheximide et les LPS, nous avons évalué à l'aide de différents inhibiteurs quelles voies de signalisation étaient impliquées dans la modulation de l'ARNm α ENaC. Nous avons choisi, lorsque c'était possible d'avoir plus d'un inhibiteur pour une voie de signalisation, d'inhiber celle-ci par des mécanismes distincts. L'activation de la MAPK ERK1/2 a été inhibée par le PD98059 20 μ M ou le PD184352 10 μ M; la MAPK p38 a été inhibée par le SB203580 10 μ M ou le Birb796 100nM, alors que l'activation de la SAPK JNK a été inhibée par le JNK inhibitor II 5 μ M. L'inhibition individuelle de la MAPK ERK1/2 ou p38 a été suffisante pour inhiber l'effet de la cycloheximide sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC [Figure 26]. Par contre, l'inhibition conjointe des voies de signalisation ERK1/2 et p38 a été nécessaire afin de bloquer la chute de l'expression du messenger α ENaC causée par le traitement aux LPS [Figure 27]. Finalement, malgré l'activation de la SAPK JNK1-2/3 par la cycloheximide et les LPS, l'inhibition de cette voie n'a eu aucun impact sur la modulation à la baisse de l'expression de l'ARNm α ENaC dans ces conditions [Figure 26 et 27].

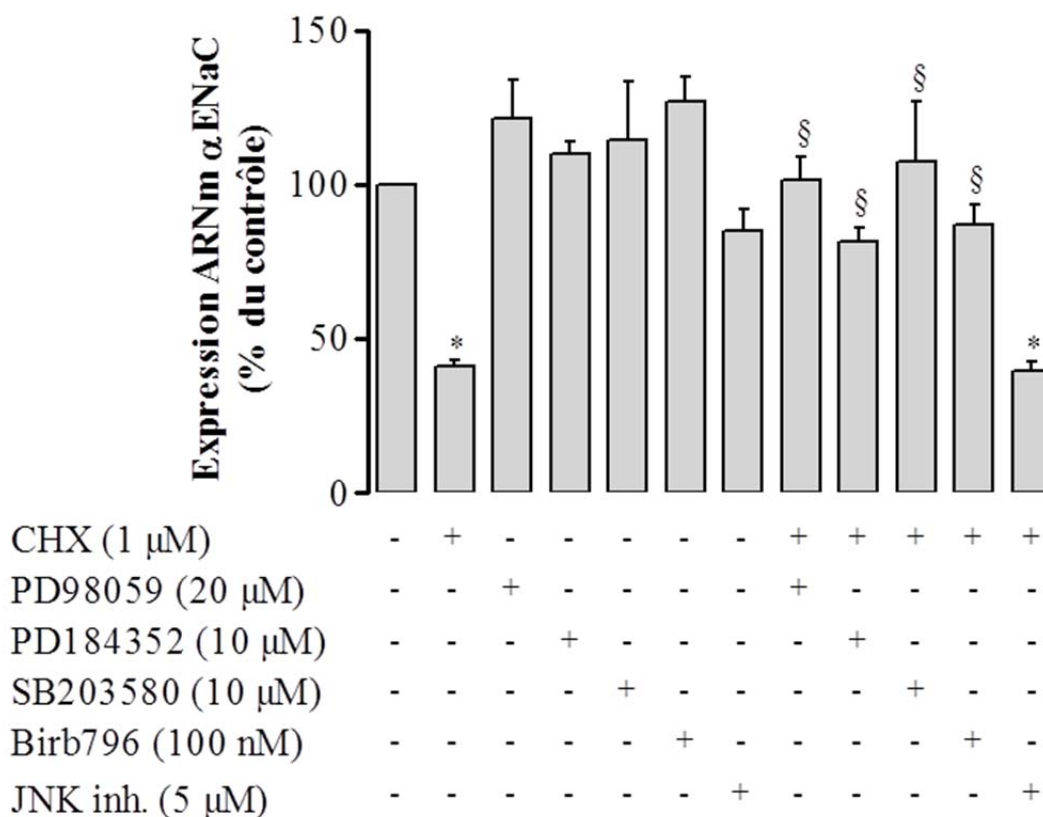


Figure 26. Effets des inhibiteurs de MAPK sur la modulation de l'expression de l'ARNm αENaC par la cycloheximide.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été prétraitées durant 1h avec différents inhibiteurs : PD98059 (inhibiteur de ERK, colonnes 3 et 8), PD184352 (inhibiteur de ERK, colonnes 4 et 9), SB203580 (inhibiteur de p38, colonnes 5 et 10), Birb796 (inhibiteur de p38, colonnes 6 et 11) et JNK inh. II (inhibiteur de JNK, colonnes 7 et 12) suivi d'un traitement de 4h avec de la cycloheximide 1,0μM (colonnes 2, 8-12). Le pourcentage d'expression de l'ARNm αENaC déterminé par RT-qPCR est présenté pour chaque condition expérimentale. Les données sont présentées sous la forme de % ± ESM comparées aux cellules non traitées suite à une normalisation avec la β-actine. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle; § : P<0.05 vs cellules traitées à la cycloheximide; n≥5)

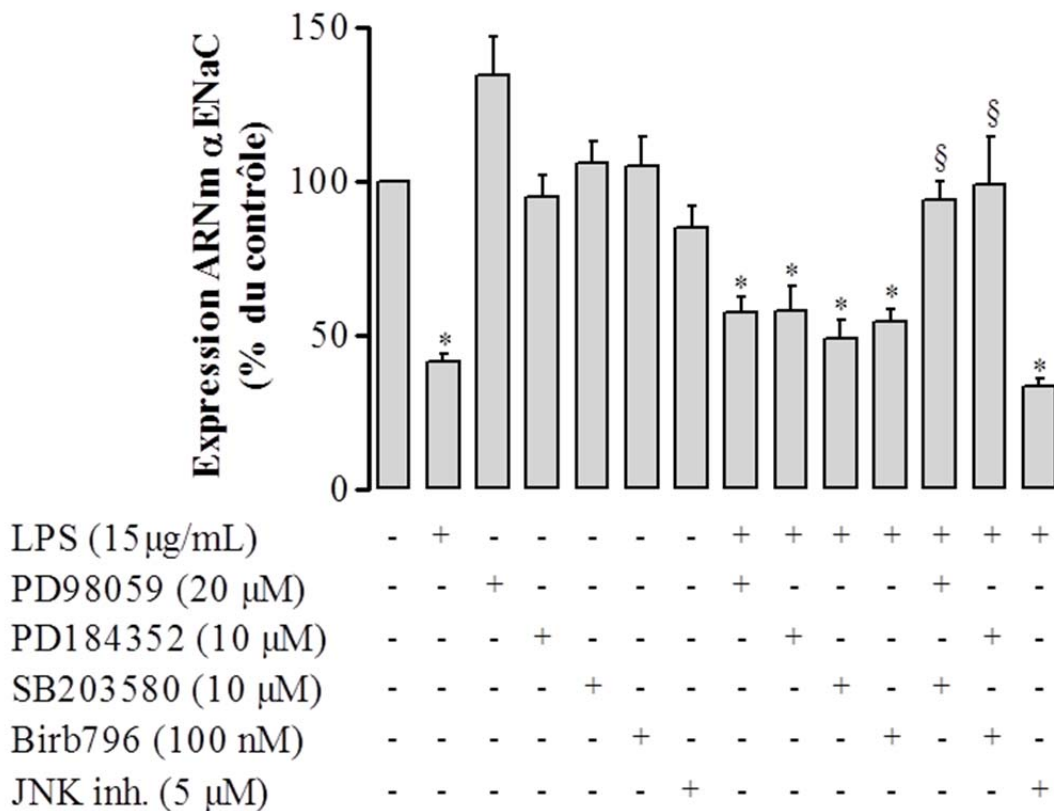


Figure 27. Effets des inhibiteurs de MAPK sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été prétraitées durant 1h avec différents inhibiteurs : PD98059 (inhibiteur de ERK, colonnes 3, 8 et 12), PD184352 (inhibiteur de ERK, colonnes 4, 9 et 13), SB203580 (inhibiteur de p38, colonnes 5, 10 et 12), Birb796 (inhibiteur de p38, colonnes 6, 11 et 13) et JNK inh. II (inhibiteur de JNK, colonnes 7 et 14) suivi d'un traitement de 4h avec des LPS 15 μ g/mL (colonnes 2, 8-14). Le pourcentage d'expression de l'ARNm α ENaC déterminé par RT-*q*PCR est présenté pour chaque condition expérimentale. Les données sont présentées sous la forme de % \pm ESM comparées aux cellules non traitées suite à une normalisation avec la β -actine. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle; § : P<0.05 vs cellules traitées aux LPS; n \geq 5).

N.B. L'utilisation conjointe des inhibiteurs de ERK et p38 n'a pas d'impact sur l'expression de l'ARNm α ENaC. * voir Annexe Figure 2.

3.1.8. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par la cycloheximide et les LPS

Afin de mieux comprendre comment les traitements à la cycloheximide 1,0 μ M et aux LPS 15 μ g/mL affectaient l'expression de l'ARNm α ENaC, nous avons évalué comment ces deux traitements pouvaient affecter l'activité transcriptionnelle du promoteur α ENaC. Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec une construction α ENaC-Luc (pGL3- α ENaC-promoteur) où un fragment de 3kb du promoteur α ENaC murin a été cloné en amont du gène LUC de *Photinus pyralis* (Dagenais et al., 2001a; Dagenais et al., 2006; Dagenais et al., 2004). Le plasmide pRL-SV40 exprimant la luciférase de *Renilla reniformis* a été co-transfecté dans les cellules pour permettre une normalisation du signal lumineux de LUC. Le traitement aux LPS a inhibé de 52% (6h) et 68% (24h) l'activité du promoteur α ENaC par rapport aux cellules non traitées. La cycloheximide, quant à elle, n'a eu aucun impact sur l'activité du promoteur α ENaC après 6h, mais a provoqué une chute significative de 35% de l'activité transcriptionnelle du promoteur après 24h de traitement. Les deux traitements combinés ont également causé une inhibition significative de l'activité du promoteur α ENaC après 24h à 34% de l'activité des cellules contrôles non-traitées [Figure 28].

Puisque l'expression de l'ARNm α ENaC est modulée par les voies de signalisation des MAPK ERK1/2 et p38 [Figure 26 et 27], leur rôle dans la régulation de l'activité de promoteur α ENaC a été investigué. Ainsi, des cellules épithéliales alvéolaires transfectées comme précédemment ont été prétraitées durant 1h avec le PD98059 20 μ M et/ou le SB203580 10 μ M suivi d'un traitement à la cycloheximide 1,0 μ M ou aux LPS 15 μ g/mL pour 24h. Dans le cas du traitement aux LPS, les inhibiteurs ont été uniquement utilisés en combinaison compte tenu de leur incapacité à inhiber l'effet des LPS sur l'expression de l'ARNm α ENaC lorsqu'ils furent utilisés de façon individuelle [Figure 27]. De façon similaire à ce que nous avons trouvé précédemment, l'inhibition individuelle des MAPK ERK1/2 et p38 n'a pu bloquer l'effet de la cycloheximide sur l'activité du promoteur [Figure 29A]. Cependant, une incubation combinée avec les deux inhibiteurs a permis de réduire significativement l'effet des LPS sur l'activité du promoteur α ENaC en passant d'une activité de 32% à 65% comparée aux cellules non traitées [Figure 29B].

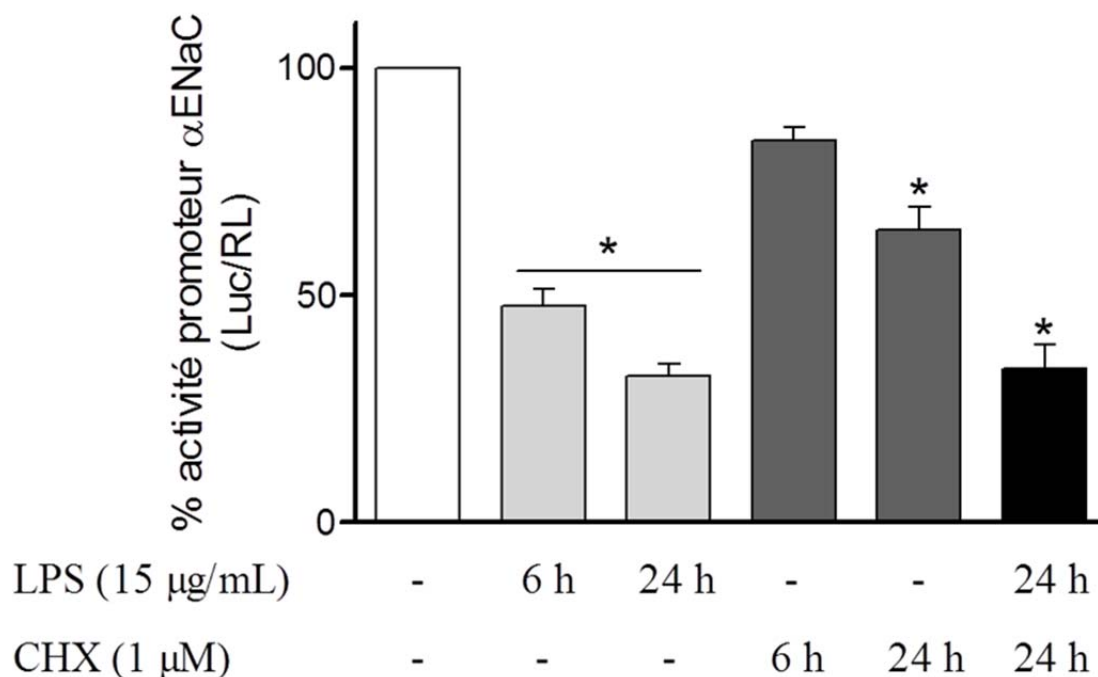


Figure 28. Modulation de l'activité du promoteur αENaC par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec une construction αENaC-Luc où le gène LUC de *Photinus pyralis* est régulé par une région de 3-kb du promoteur αENaC. Ces cellules ont été cotransfectées avec le vecteur pRL-SV40 codant pour la luciférase *Renilla reniformis* (RL) afin de normaliser le signal. Suite à la transfection (48h), les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide (Chx) 1,0µM et/ou des LPS 15µg/mL durant 6 ou 24h. Les signaux émis par LUC et RL ont été mesurés à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corporation). L'activité du promoteur αENaC est exprimée sous la forme du % ± ESM de l'activité luciférase comparée aux cellules non traitées suite à la normalisation avec le signal de la *Renilla reniformis*. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle; n≥6 en duplicata)

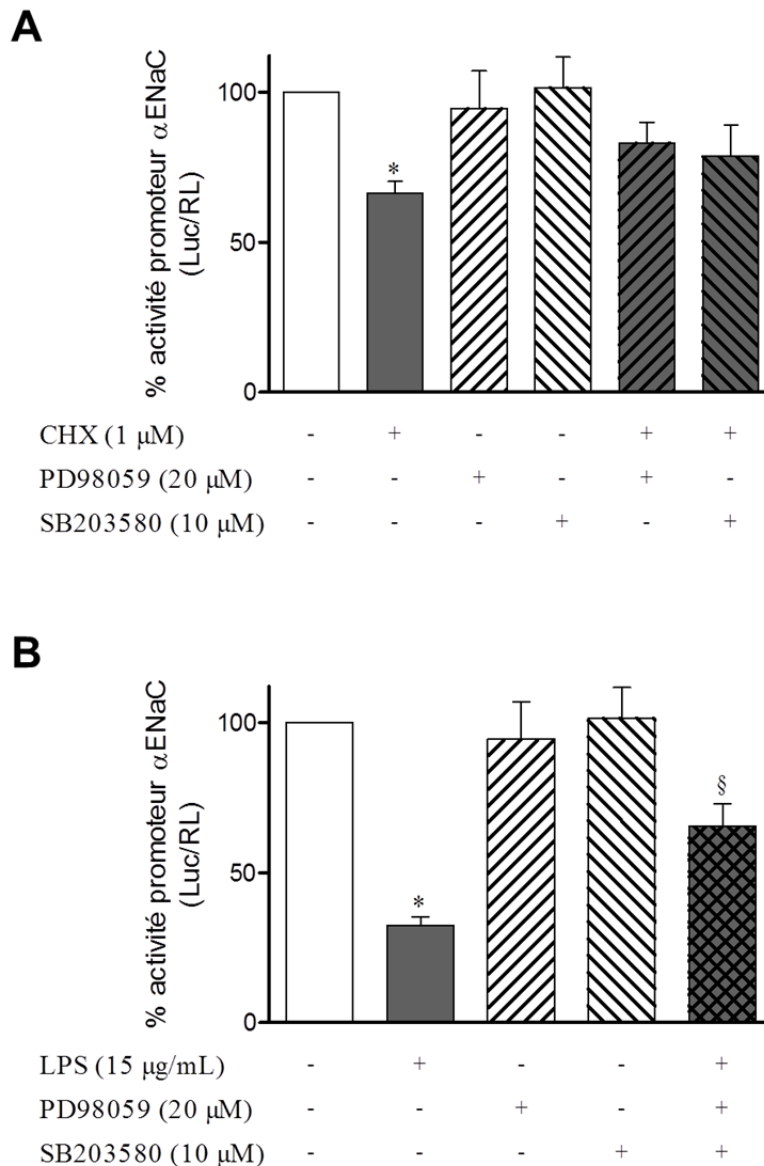


Figure 29. Effet des inhibiteurs des MAPK sur la modulation de l'activité du promoteur α ENaC par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été cotransfectées avec la construction α ENaC-Luc et pRL-SV40 codant pour la luciférase de *Renilla reniformis* (RL) pour la normalisation du signal lumineux. Après 48h, les cellules ont été prétraitées durant 1h avec le PD98059 20 μ M et le SB203580 10 μ M, des inhibiteurs respectifs de ERK et p38. Par la suite, les cellules ont subi un traitement avec de la cycloheximide (Chx) 1,0 μ M (**A**) ou des LPS 15 μ g/mL (**B**) durant 24h. Le signal du gène LUC a été mesuré avec le Dual-Luciferase Reporter Assay System. L'activité du promoteur α ENaC est représentée sous la forme de % \pm ESM de l'activité luciférase comparée aux cellules non traitées suite à la normalisation avec le signal RL. (Test Mann-Whitney; * : P<0.01 vs contrôle; § : P<0.05 vs cellules traitées à la cycloheximide ou aux LPS; n=4 en duplicata)

3.1.9. Impact de l'inhibition de la transcription sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS

Le contrôle de la concentration d'un ARNm dans la cellule dépend du ratio entre l'activité transcriptionnelle de son promoteur, ainsi que de la stabilité du messenger. Traditionnellement, la mesure de la stabilité d'un transcrite est accomplie en inhibant la machinerie transcriptionnelle de la cellule entière à l'aide d'un inhibiteur de la transcription (Chen, Ezzeddine, & Shyu, 2008). Par la suite, la concentration des transcrits est mesurée dans le temps pour déterminer le temps de demi-vie du messenger. Puisque l'utilisation de l'actinomycine D est un traitement courant pour déterminer la demi-vie d'un transcrite, son impact sur la modulation de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS a été étudié. Des cellules épithéliales alvéolaires ont été prétraitées durant 1h avec de l'actinomycine D, puis les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide 1,0 μ M ou des LPS 15 μ g/mL durant 6h. Tel que démontré précédemment, la cycloheximide et les LPS ont entraîné une chute de l'expression de l'ARNm α ENaC comparativement aux cellules non traitées. Par contre, le co-traitement avec l'actinomycine D (temps total de 7h) a complètement aboli l'effet de la cycloheximide et des LPS sur la modulation de l'ARNm α ENaC [Figure 30].

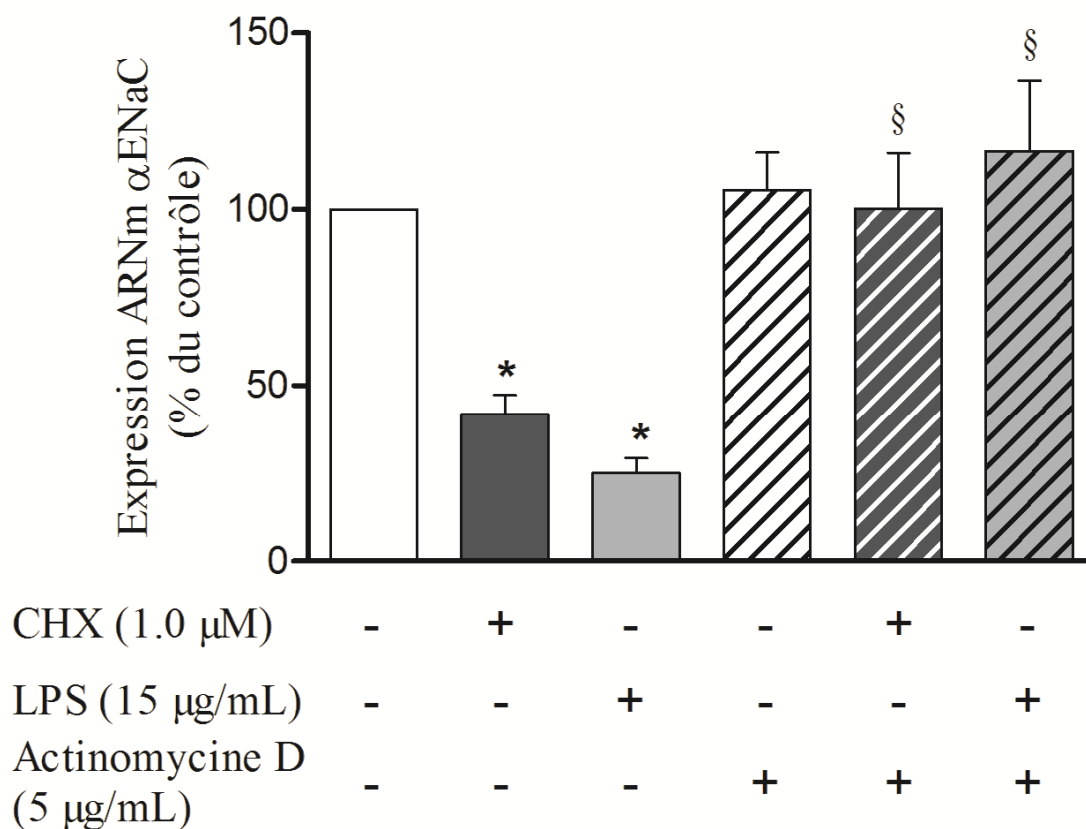


Figure 30. Effet de l'inhibition de la transcription sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été prétraitées avec de l'actinomycine D 5μg/mL durant 1h suivi d'un traitement à la cycloheximide (Chx) 1,0μM ou aux LPS 15μg/mL durant 6h. Le pourcentage d'expression de l'ARNm α ENaC déterminé par RT-*q*PCR est présenté pour chaque condition expérimentale. Les données sont présentées sous la forme de % \pm ESM comparées aux cellules non traitées suite à une normalisation avec l'ARNr 5S. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle; § : P<0.05 vs cellules traitées à la cycloheximide ou aux LPS; n \geq 4)

3.1.10. Impact de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de l'activité luciférase par la cycloheximide et les LPS

Les séquences 3' non traduites d'un transcrit peuvent jouer un rôle important dans la modulation de la stabilité de l'ARNm. Afin d'étudier si le 3'UTR α ENaC pouvait exercer un tel rôle dans la modulation de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS, des constructions chimériques composées de différentes portions de la séquence 3'UTR ont été clonées en aval du gène rapporteur de la luciférase (LUC) de *Photinus pyralis* (Migneault et al., 2013). Le rôle du 3'UTR α ENaC dans la modulation de la stabilité a été estimé en mesurant l'activité luciférase de ces constructions dans les cellules traitées ou non avec de la cycloheximide 1,0 μ M ou des LPS 15 μ g/mL durant 24h. La cycloheximide a inhibé de façon significative l'activité LUC des cellules exprimant la construction avec le fragment complet du 3'UTR α ENaC (894pb) diminuant le niveau d'expression à $59 \pm 4\%$ en comparaison avec les cellules non traitées [Figure 31A]. Dans le cas des cellules transfectées avec la construction chimérique exprimant le segment tronqué de la région distale du 3'UTR α ENaC (374bp), les traitements avec la cycloheximide et les LPS ont été incapables d'inhiber l'activité luciférase dans ces cellules [Figure 31B].

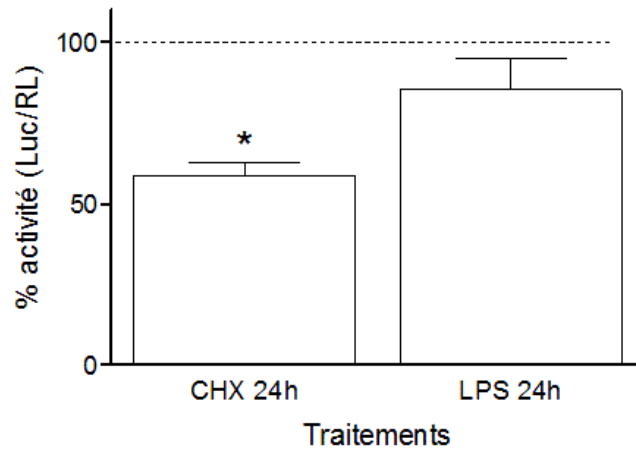
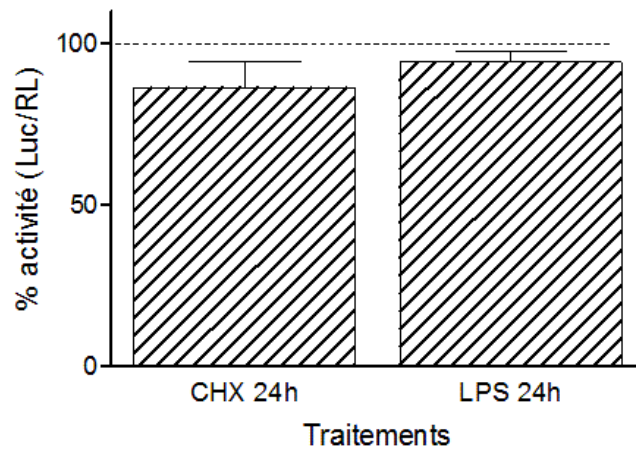
A**B**

Figure 31. Modulation de l'activité luciférase de chimères Luciférase formées de différentes portions de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées par électroporation avec les plasmides pLENTI codant pour le gène LUC de *Photinus pyralis* suivi des séquences du 3'UTR α ENaC complet (894bp) (A) ou du 3'UTR α ENaC dépourvu de sa région 3' distale (374bp) (B). Le plasmide pRL-SV40 codant pour la luciférase *Renilla reniformis* (RL) a été co-transfecté afin de normaliser le signal. Après 48h, les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide (Chx) 1,0 μ M ou des LPS 15 μ g/mL et l'activité luciférase (LUC/RL) fut mesurée après 24h de traitement à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System. L'activité LUC/RL est exprimée sous la forme de % \pm ESM comparé aux cellules non traitées. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.01 vs contrôle; n=5 en duplicata)

3.2. Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de sa stabilité

3.2.1. Implication du 3'UTR α ENaC

Les résultats précédents suggèrent un rôle de la région 3' non traduite dans la modulation de l'expression du transcrit α ENaC en condition de stress cellulaire. Nous avons également voulu observer l'implication du 3'UTR dans la régulation post-transcriptionnelle du messenger α ENaC en condition basale. La mesure de l'activité luciférase peut représenter une modulation de la stabilité de l'ARNm, mais également celui de la traduction de la chimère. Afin de discerner l'implication de ces deux mécanismes dans la modulation de l'expression de la luciférase par le 3'UTR, l'activité luciférase et l'expression de l'ARNm LUC des cellules transfectées ont été mesurées. Des constructions composées du gène rapporteur LUC suivi du 3'UTR α ENaC (894pb) ou dépourvu de sa partie distale (374bp) ont été utilisées. La délétion de la région distale du 3'UTR α ENaC ($\approx \frac{2}{3}$ du 3'UTR) a provoqué une chute significative de l'activité LUC à un niveau correspondant à $36 \pm 14\%$ de l'activité LUC des cellules exprimant le clone avec un 3'UTR α ENaC complet [Figure 32A]. De la même façon, la délétion du 3'UTR α ENaC a également provoqué une chute significative de l'ARNm LUC à $40 \pm 11\%$ du niveau de celui exprimé dans les cellules exprimant le clone avec le 3'UTR α ENaC complet [Figure 32B].

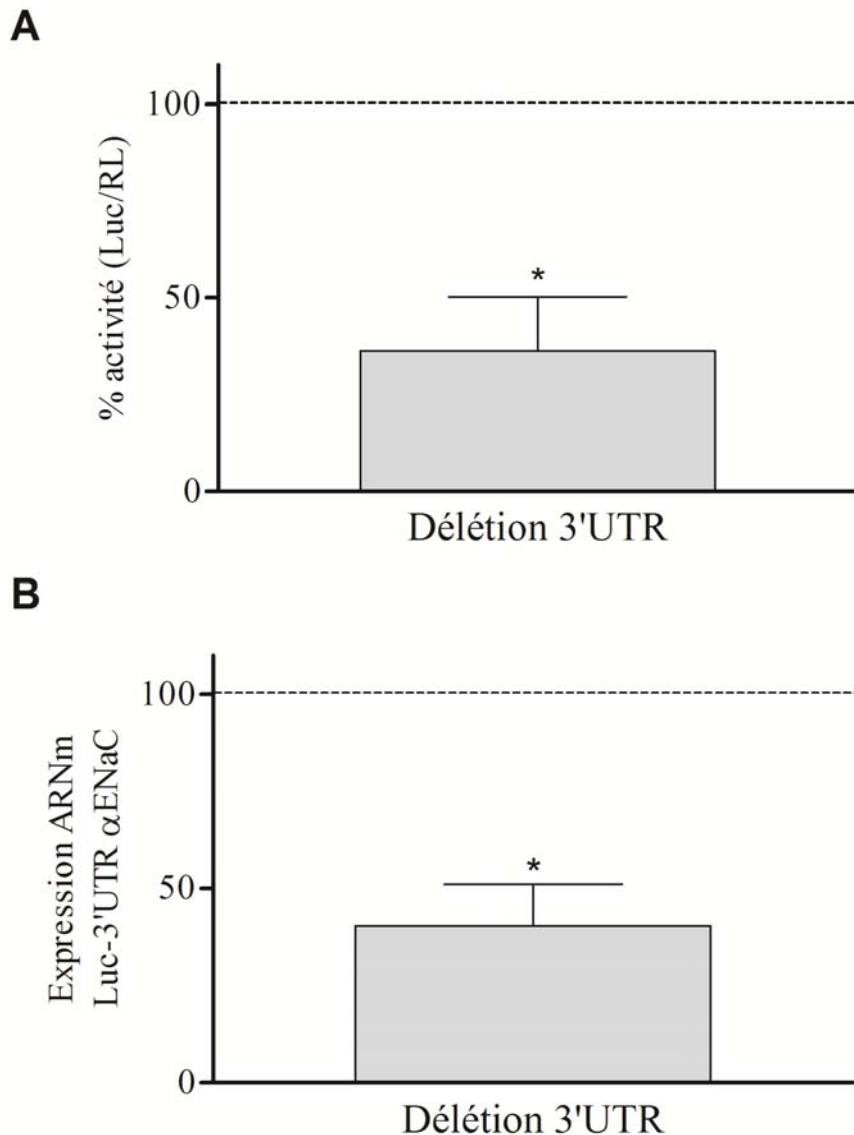


Figure 32. Modulation de l'expression de chimères Luciférase composées de différentes portions du 3'UTR α ENaC.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées par électroporation avec des plasmides pTRE-tight codant pour le gène LUC de *Photinus pyralis* suivi des séquences du 3'UTR α ENaC complet (894bp) ou du 3'UTR α ENaC dépourvu de sa région 3' distale (374bp). Les plasmides pTet-Off et pRL-SV40 ont été cotransfectés afin de permettre respectivement l'expression de pTRE-tight et la luciférase de *Renilla reniformis* (RL) afin de permettre la normalisation du signal luciférase mesurée à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System (A) ou par RT-qPCR (B). L'activité LUC/RL et l'expression de l'ARNm LUC de la chimère Luc-3'UTR α ENaC tronqué sont exprimées sous la forme de % \pm ESM comparés à la chimère Luc- 3'UTR α ENaC complet (en pointillé). (One-sample t test * : $P < 0,05$ vs 3'UTR complet; $n=3$)

3.2.2. Modulation de l'ARNm α ENaC par la doxycycline

Suite aux résultats obtenus avec les chimères Luciférase, nous avons étudié l'impact du 3'UTR sur la demi-vie du transcrit α ENaC. Pour s'y faire, nous avons opté pour un système Tet-Off. La mise en place de ce système pour étudier la courbe de dégradation d'un ARNm nécessite un traitement à la doxycycline pour inhiber l'expression de l'ARNm sous le contrôle de tTA-Adv. La doxycycline est un antibiotique dérivé de la tétracycline. Les cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la doxycycline 1,0 μ g/mL afin d'évaluer son impact sur l'expression de l'ARNm α ENaC. Les traitements effectués sur une période de 1 à 24h n'ont eu aucun impact significatif sur la modulation de l'expression du transcrit [Figure 33].

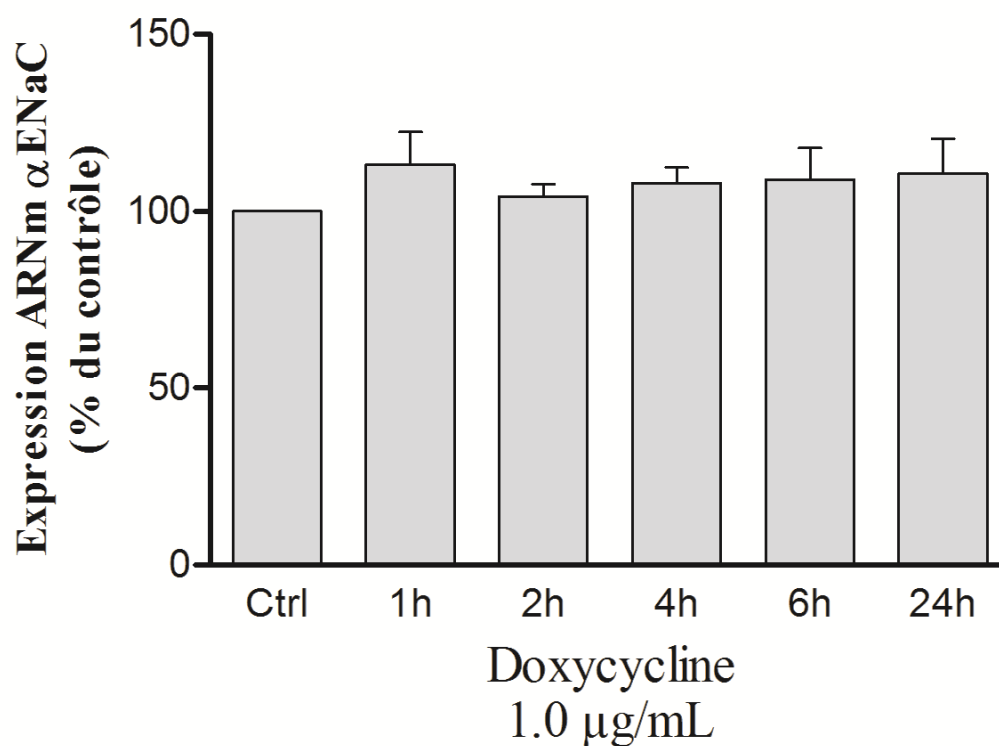


Figure 33. Modulation de l'ARNm α ENaC par la doxycycline.

Les cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées à la doxycycline 1,0 μ g/mL pour une période de 1h à 24h. L'expression de l'ARNm α ENaC a été quantifiée par RT-*q*PCR et exprimée en % d'expression \pm ESM de l'ARNm α ENaC comparé aux cellules non traitées (Ctrl; $t = 0$) après la normalisation avec la β -actine. (Test ANOVA à un facteur; $n=4$)

3.2.3. Mesure de la stabilité de l'ARNm α ENaC à l'aide du système Tet-Off

Afin d'évaluer la stabilité de l'ARNm α ENaC sans l'influence de l'actinomycine D, un système Tet-Off a été développé tel que décrit dans le Chapitre 2 : Matériels et Méthodes. Des cellules épithéliales alvéolaires ont été cotransfectées avec une construction pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp composée de l'épitope V5, de la séquence codante de l'ARNm α ENaC et de sa région 3' non traduite, ainsi que le plasmide pTet-Off permettant l'expression de l'ARNm V5- α ENaC. Un traitement à la doxycycline 1 μ g/mL sur une période de 6h a permis d'obtenir une courbe de dégradation de l'ARNm V5- α ENaC à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay ». Ces courbes de dégradation ont permis d'évaluer la demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC à partir de la constante de dégradation K [Équation 3]. La demi-vie obtenue correspond à un temps moyen de 99 ± 15 min [Figure 34].

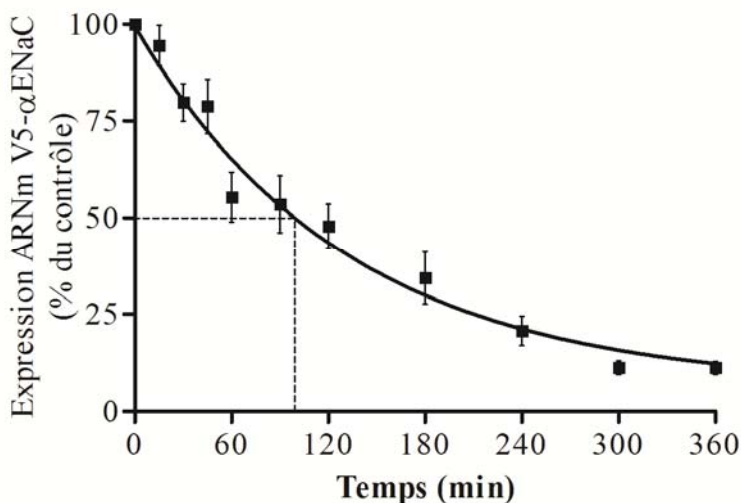


Figure 34. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec le système Tet-Off.

Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec le plasmide pTRE-tight codant pour l'épitope V5 en amont du cadre de lecture ouvert de l'ARNm α ENaC et de son 3'UTR complet. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté pour permettre l'expression de l'ARNm V5- α ENaC. Les cellules ont été traitées avec de la doxycycline 1,0 μ g/mL durant une période de 15min à 6h. L'expression de l'ARNm V5- α ENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5- α ENaC comparé aux cellules non traitées ($t = 0$) \pm ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. (La demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC a été déterminée par l'équation de dégradation obtenue à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay » : $R^2=0.8383$; $n \geq 6$)

3.2.4. Impact de l'inhibition de la transcription sur la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC

Nous avons montré précédemment que la demi-vie des ARNm α ENaC déterminée en présence d'actinomycine D était assez longue [Tableau 4] et d'autre part que l'actinomycine D inhibait les effets de la cycloheximide ou des LPS sur la modulation à la baisse de cet ARNm [Figure 30]. Nous avons voulu tester avec notre système Tet-Off comment l'actinomycine D affectait la stabilité des ARNm α ENaC. Les cellules épithéliales alvéolaires ont été cotransfectées avec la construction pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp et le plasmide pTet-Off. La stabilité des ARNm V5- α ENaC a ensuite été déterminée après un prétraitement de 30min à l'actinomycine D 5 μ g/mL. L'actinomycine D a stabilisé de façon importante l'ARNm α ENaC [Figure 35A] et augmenté son temps de demi-vie à 284 ± 54 min ($\approx 4,7$ h) par rapport aux cellules non traitées (99 ± 15 min) [Figure 35B].

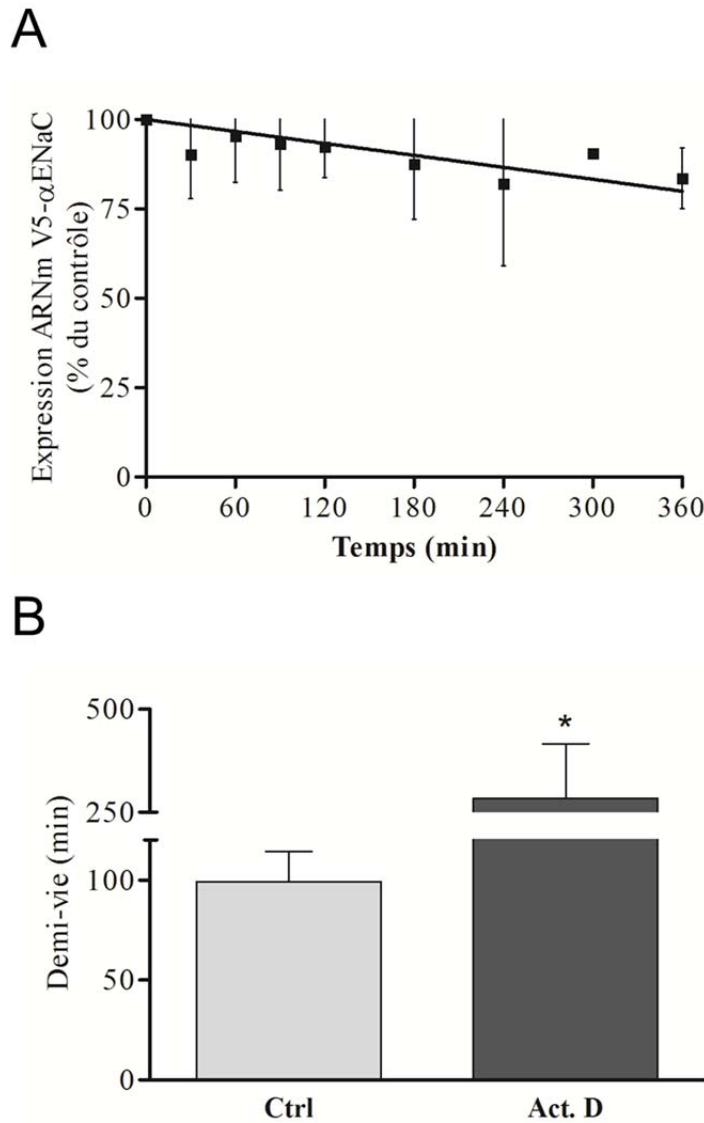


Figure 35. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC par l'actinomycine D.

Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec le plasmide pTRE-tight codant pour l'épitope V5 en amont du cadre de lecture ouvert de l'ARNm αENaC et de son 3'UTR complet. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Les cellules ont été prétraitées durant 30min avec de l'actinomycine D 5,0μg/mL, suivi d'un traitement à la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15min à 6h. **(A)** L'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées ($t = 0$) ± ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. ($n \geq 4$) **(B)** La demi-vie de l'ARNm V5-αENaC de cellules traitées à l'actinomycine D a été comparée à la demi-vie de l'ARNm de cellules non traitées. Les demi-vies ont été mesurées à partir de l'équation de dégradation de l'ARNm V5-αENaC obtenue pour chaque expérience et sont exprimées en minutes ± ESM. (Test de Student non apparié; * : $P < 0.01$ vs contrôle; $n \geq 4$)

3.2.5. Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par différents stress cellulaires et inflammatoires

En utilisant le système Tet-Off, nous avons voulu déterminer si différents stress inflammatoires (LPS, TNF) ou cellulaires (cycloheximide) pouvaient affecter le profil de dégradation des ARNm α ENaC. Les cellules épithéliales alvéolaires ont été cotransfectées avec les plasmides pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp et pTet-Off, et la stabilité des transcrits a été déterminée en présence de doxycycline après un prétraitement de 30 min (cycloheximide 1,0 μ M, LPS 15 μ g/mL) ou de 5h (TNF- α 100ng/mL). La modulation de la stabilité a varié selon le type de stress induit aux cellules épithéliales alvéolaires. Les traitements à la cycloheximide et la cytokine pro-inflammatoire TNF- α ont provoqué une chute de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec une demi-vie respective de 36 ± 4 min et 16 ± 2 min [Figure 36A et C] par rapport à une demi-vie de 99 ± 15 min pour les cellules non traitées [Figure 36D]. Dans ces deux conditions, les ARNm sont dégradés rapidement avant d'atteindre un plateau d'expression constant dans la cellule ($\sim 50\%$). Pour sa part, le traitement aux LPS n'a provoqué aucune modulation significative de la stabilité du messager avec une demi-vie du transcrit V5- α ENaC de 85 ± 8 min [Figure 36B et D].

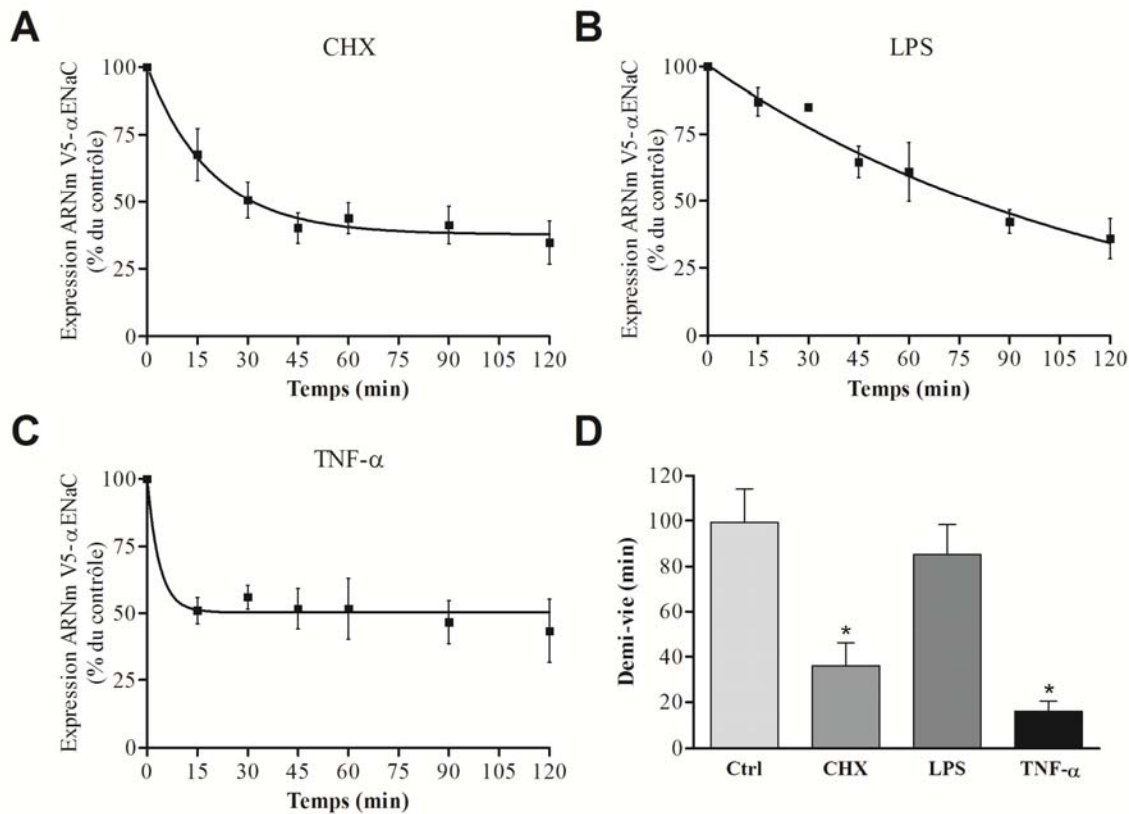


Figure 36. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC par différents stress cellulaires et inflammatoires.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec le plasmide pTRE-tight codant pour l'épitope V5 en amont du cadre de lecture ouvert de l'ARNm αENaC et de son 3'UTR complet. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Les cellules ont été prétraitées durant 30min avec de la cycloheximide (Chx) 1,0μM (A), des LPS 15μg/mL (B) ou durant 5h avec du TNF-α 100ng/mL (C), suivi d'un traitement à la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15min à 120min. L'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées ($t = 0$) ± ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. ($n \geq 3$) (D) Les demi-vies de l'ARNm V5-αENaC des cellules traitées ont été comparées à la demi-vie de l'ARNm de cellules non traitées (Ctrl). Les demi-vies ont été mesurées à partir de l'équation de dégradation de l'ARNm V5-αENaC obtenue pour chaque expérience à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay » (Chx : $R^2=0.6535$; LPS : $R^2=0.8481$; TNF-α : $R^2=0.5904$) et sont exprimées en minutes ± ESM. (Test ANOVA à un facteur et test *post hoc* de Bonferroni; * : $P < 0.01$ vs contrôle; $n \geq 3$)

3.2.6. Caractérisation de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC

3.2.6.1. Identification des régions conservées dans le 3'UTR

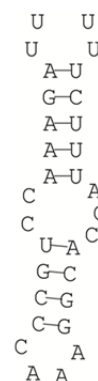
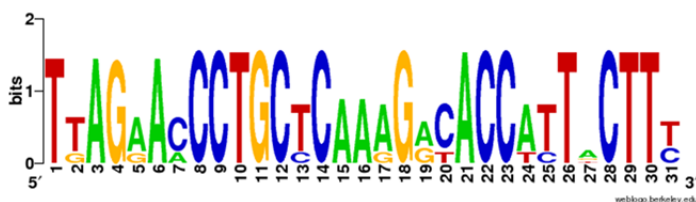
La pression sélective lors de l'évolution est connue pour être moins forte sur les régions 3'UTR que dans les régions codantes. Cependant, si de telles régions ont un rôle dans la modulation de l'expression génique des ARNm α ENaC, on peut s'attendre à ce que différents domaines soient conservés entre les régions 3'UTR α ENaC de différentes espèces. En utilisant cette approche bio-informatique, nous avons trouvé trois séquences consensus conservées entre les espèces qui représentent des domaines potentiellement importants dans la modulation de la stabilité des ARNm α ENaC. L'analyse de ces séquences consensus montre que celles-ci seraient capables de former de façon stable une structure secondaire en épingle à cheveux (structure tige-boucle) comme celles que l'on retrouve fréquemment dans les ARNm pour permettre l'attachement de facteurs *trans* tels que des protéines liant l'ARN. [Figure 37].

Afin d'étudier l'impact de ces séquences conservées sur la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC, une série de mutants de délétion de la région 3'UTR ont été produits pour retrancher progressivement les différents domaines conservés identifiés précédemment. Chaque séquence conservée identifiée précédemment correspond à une région ayant subi une délétion dans le 3'UTR α ENaC. Ces mutants ont été clonés à l'intérieur du vecteur pTRE-tight et codent pour la région codante α ENaC et son 3'UTR \pm tronqué avec l'épitope V5 en amont [Figure 38].

Séquence consensus #1

Rattus	TTAGAAACCTGCCCAAAGGCACCATTTCTTT
Mus	-----CCTGCTCAAAGGCACCTTTGCTTT
Homo	TTAGAACCCTGCTC--AGACACCATTACTTT
Canis	TTAGGACCCTGCTC--AGACACCACTACTTC
Bos	TGAGAACCTGCTC--GGATACCATTACTTC

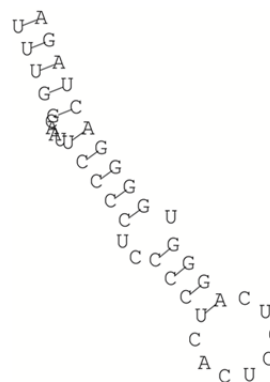
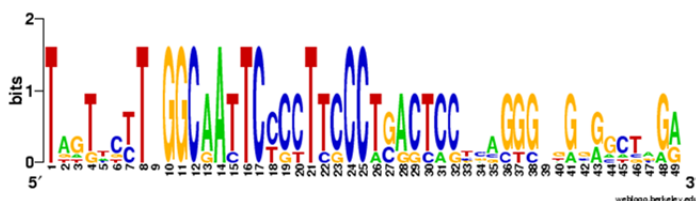
$\Delta G = -7,2$



Séquence consensus #2

Cavia	TAGTTCTTGGGCAATTCCCCTTCCCTGACTCCTCAGGGCTGCGGCTGGA
Rattus	TAGTTCTTGGGCAATTCCCCTCCCTCACTCCTCAGGGTGGGGACTAGA
Homo	TGTTACTTAGGCAATTCCCCTTCCCTGACTCCCAGGGCTAGGGCTAGA
Mus	TTAGCTCTTGGGCAATTCTCCTTCCCTCACTCCTCAGGGTGGGGCTAGA
Bos	TAGTTGCTAGGCGACTCTGTTTGCTGACTCCAGGGCAGGAACTGGGG
Canis	TAGTACTTGGGCAATTCCCCTTCCAGGGCAGGGCCTGGAGCAGACCAG

$\Delta G = -18,5$



Séquence consensus #3

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

$\Delta G = -18,7$

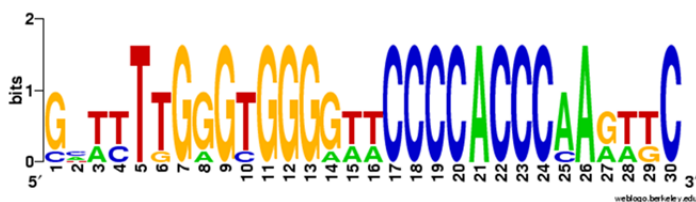


Figure 37. Identification de séquences conservées entre différentes espèces, présentes dans la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC.

Plusieurs séquences conservées ont été identifiées dans le 3'UTR du transcrit α ENaC à l'aide d'une analyse du 3'UTR α ENaC de différentes espèces. Les nucléotides de grand format représentent une conservation maximale à travers les espèces, alors que les petits nucléotides présentent une certaine divergence. Le ΔG correspondant au minimum d'énergie libre pour la formation de structure secondaire est également présenté pour chaque séquence consensus.

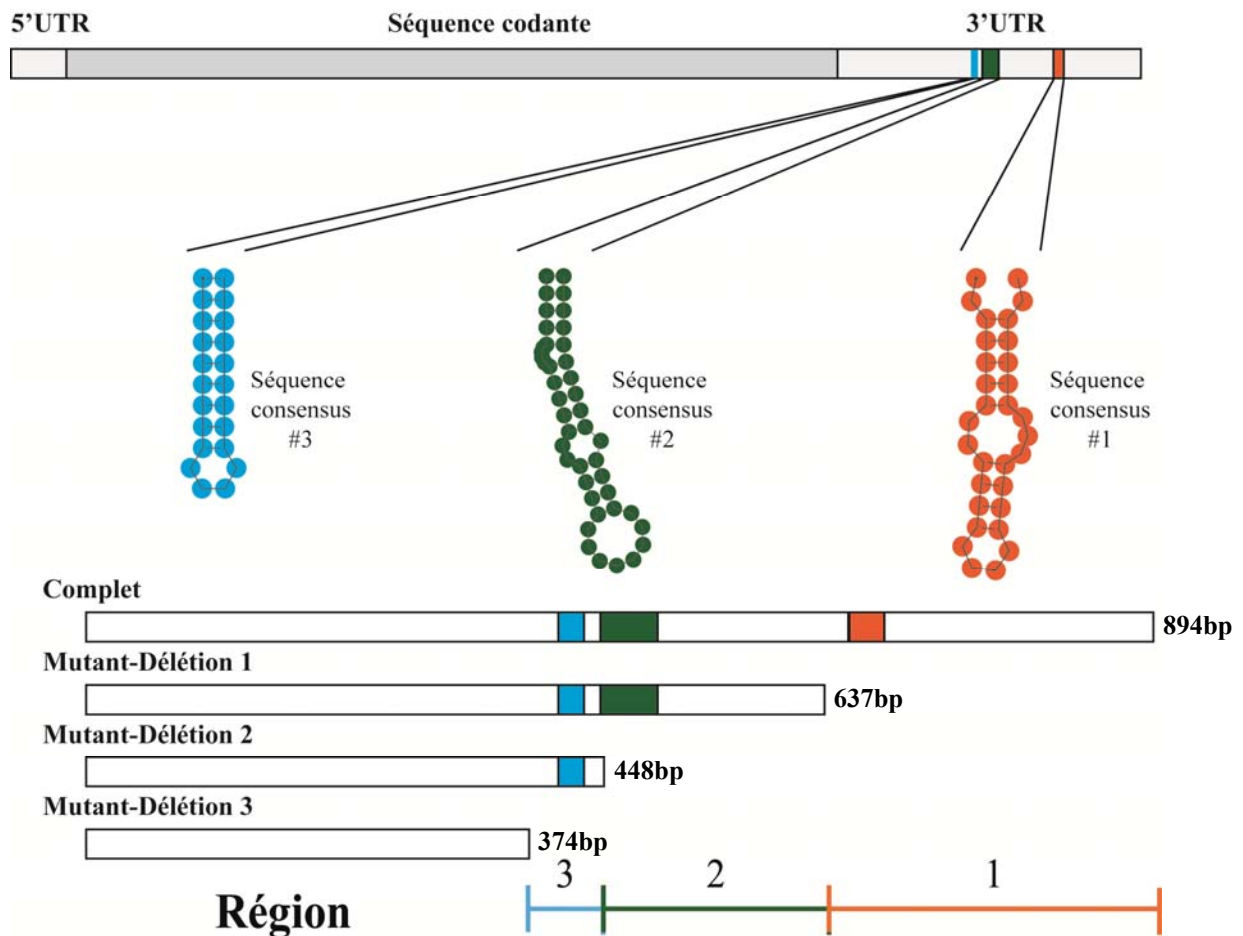


Figure 38. Production de mutants de délétion dans la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC.

Suite à l'identification des séquences consensus à l'intérieur du 3'UTR α ENaC, différents mutants de délétion ont été produits. Chaque séquence conservée correspond à une région ayant subi une délétion dans le 3'UTR α ENaC. Ces mutants ont été clonés dans le vecteur pTRE-tight et codent pour la région codante α ENaC et son 3'UTR \pm tronqué avec l'épitope V5 en amont. Ceux-ci sont identifiés dans le tableau 5 dans le chapitre Matériels et Méthodes.

3.2.6.2. Modulation de la stabilité de l'ARNm des mutants de délétion

Le profil de dégradation des différents mutants de délétion α ENaC-3'UTR a été testé avec le système Tet-Off tel que décrit précédemment. Pour chaque mutant, une courbe de régression non linéaire « One-phase-decay » a été produite. Les demi-vies ont ensuite été calculées à partir de la constante de dégradation des courbes pour les différents mutants respectifs [Figure 42]. Les mutants de délétion des différentes régions ont tous présenté des changements significatifs dans la modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC. En effet, les mutants de délétion de la région 1 et 2 du 3'UTR ont présenté une stabilisation significative de l'ARNm V5- α ENaC avec des demi-vies de 203 ± 42 min et 301 ± 43 min respectivement [Figures 39, 40 et 42] contrairement au transcrit possédant un 3'UTR intact qui a présenté une demi-vie de 99 ± 15 min. Par contre, le mutant de délétion de la région 3 a présenté une diminution significative de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec une demi-vie de 47 ± 12 min [Figure 41 et 42].

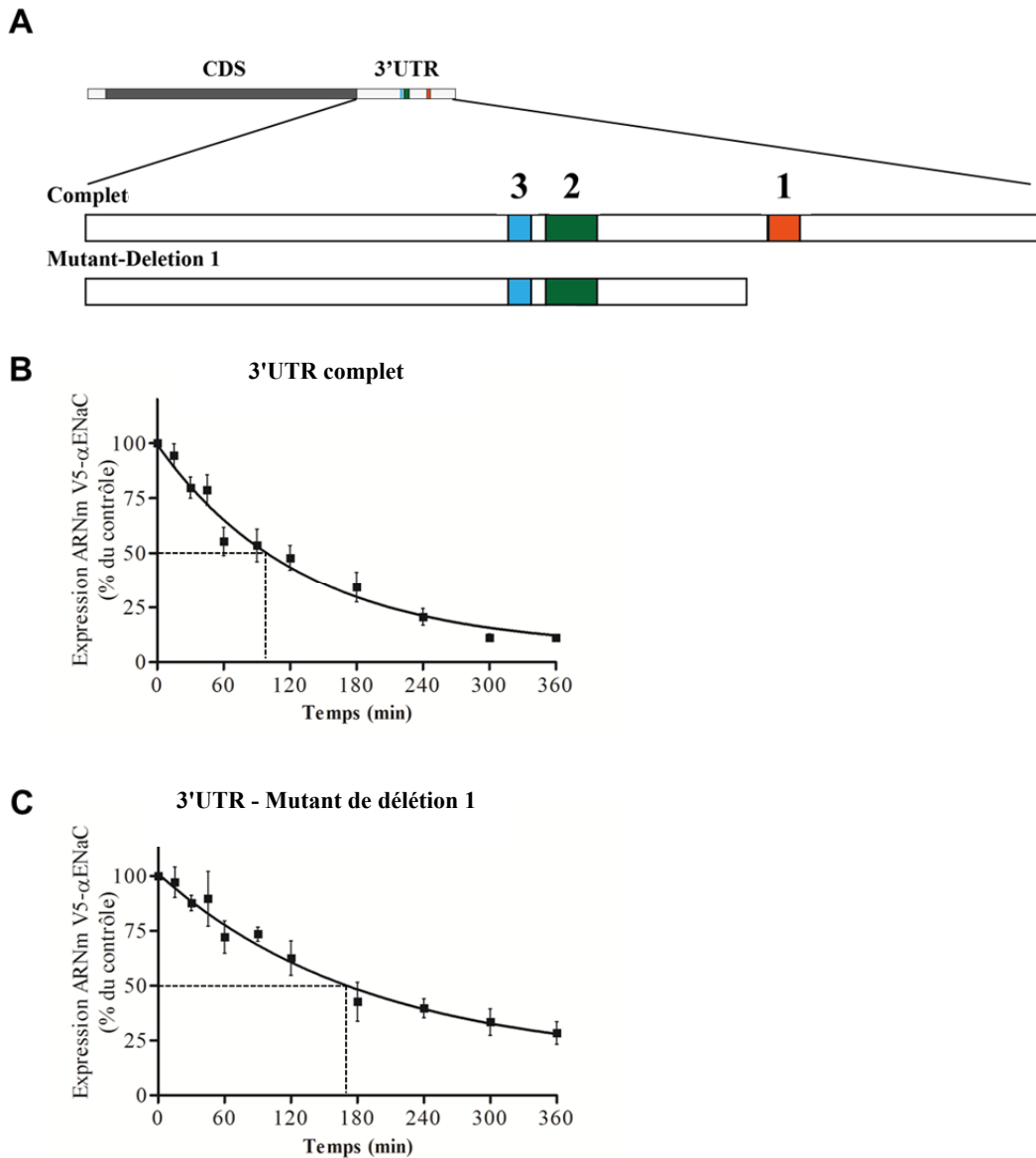


Figure 39. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC – Mutant de délétion 1.

(A) Représentation schématique de la région tronquée sur le 3'UTR pour le mutant de délétion 1. (B) Reproduction de la Figure 34 correspondant à la courbe de dégradation de l'ARNm V5-αENaC possédant un 3'UTR entier. (C) Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pTRE-tight codant pour le cadre de lecture ouvert de l'ARNm αENaC et du 3'UTR tronqué de sa région 1. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Les cellules ont été traitées avec de la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15min à 6h. L'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées ($t = 0$) ± ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. (La demi-vie de l'ARNm V5-αENaC a été déterminée par l'équation de dégradation obtenue à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay » : $R^2=0,7260$; $n \geq 4$)

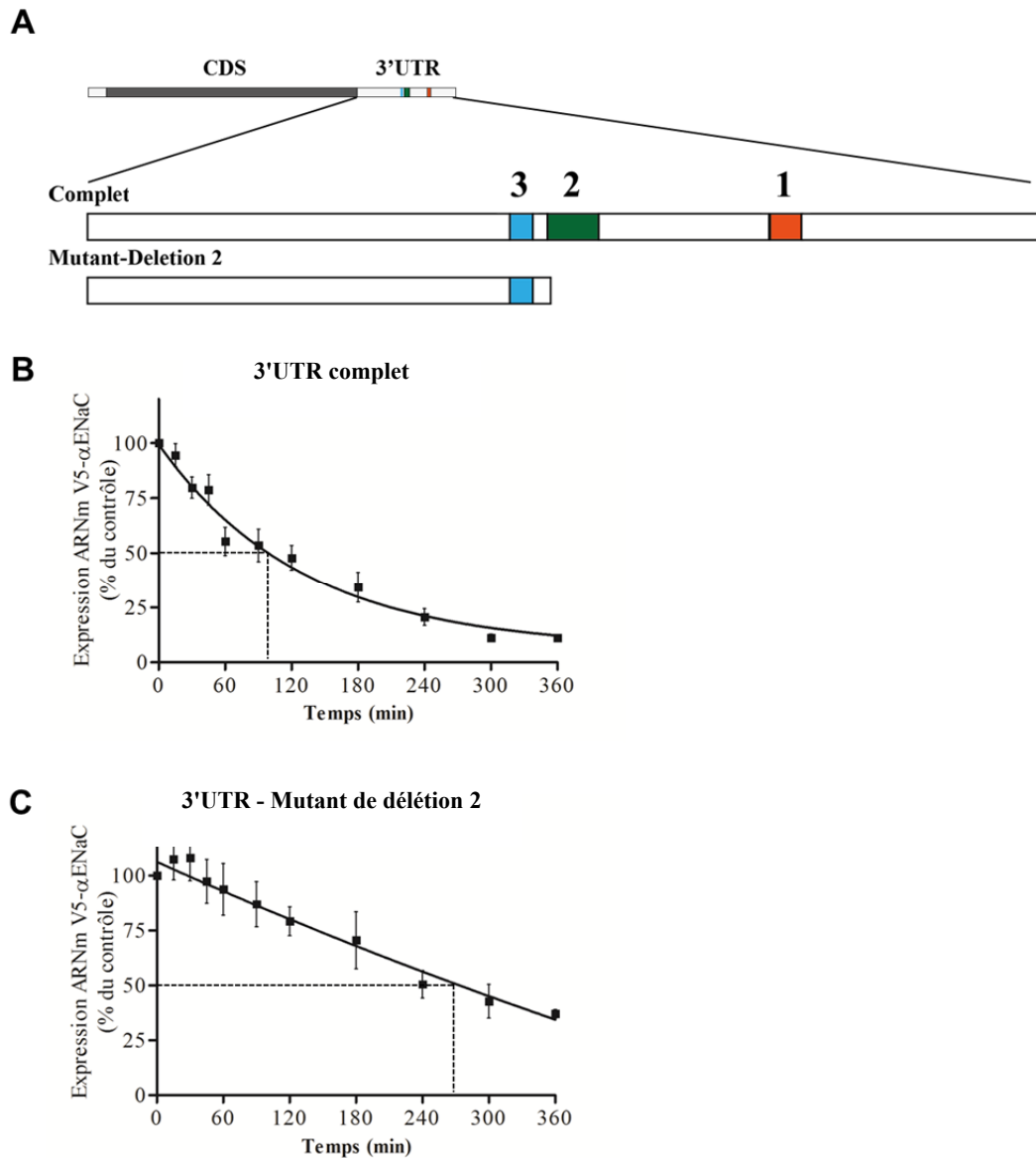


Figure 40. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC – Mutant de délétion 2.

(A) Représentation schématique de la région tronquée sur le 3'UTR pour le mutant de délétion 2. (B) Reproduction de la Figure 34 correspondant à la courbe de dégradation de l'ARNm V5-αENaC possédant un 3'UTR entier. (C) Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pTRE-tight codant pour le cadre de lecture ouvert de l'ARNm αENaC et du 3'UTR tronqué de sa région 2. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Les cellules ont été traitées avec de la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15min à 6h. L'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées ($t = 0$) ± ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. (La demi-vie de l'ARNm V5-αENaC a été déterminée par l'équation de dégradation obtenue à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay » : $R^2=0,5411$; $n \geq 4$)

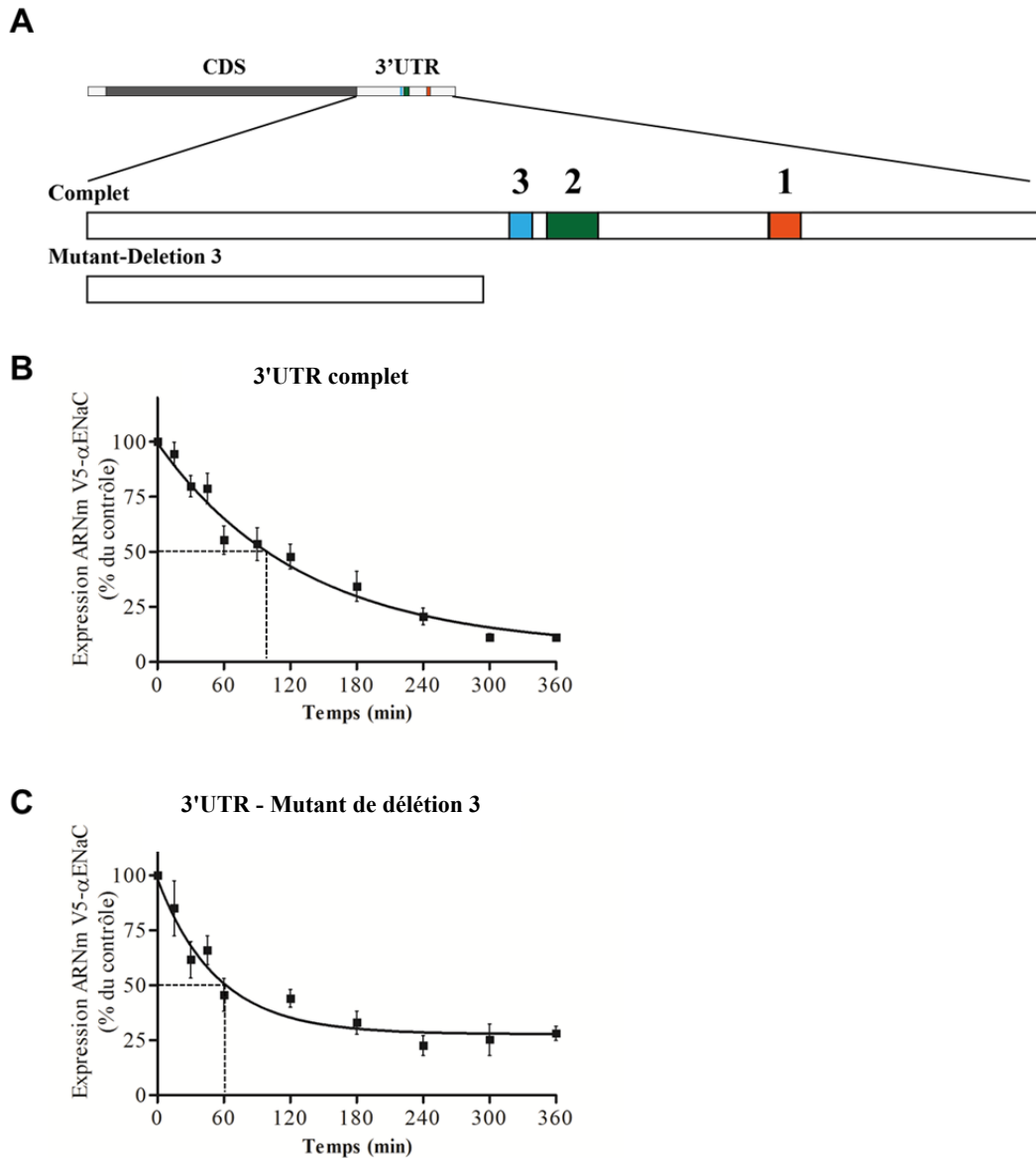


Figure 41. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5-αENaC – Mutant de délétion 3.

(A) Représentation schématique de la région tronquée sur le 3'UTR pour le mutant de délétion 3. (B) Reproduction de la Figure 34 correspondant à la courbe de dégradation de l'ARNm V5-αENaC possédant un 3'UTR entier. (C) Les cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pTRE-tight codant pour le cadre de lecture ouvert de l'ARNm αENaC et du 3'UTR tronqué de sa région 3. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Les cellules ont été traitées avec de la doxycycline 1,0μg/mL durant une période de 15min à 6h. L'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées ($t = 0$) ± ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. (La demi-vie de l'ARNm V5-αENaC a été déterminée par l'équation de dégradation obtenue à partir d'une régression non linéaire « One-phase decay » : $R^2=0,7161$; $n \geq 4$)

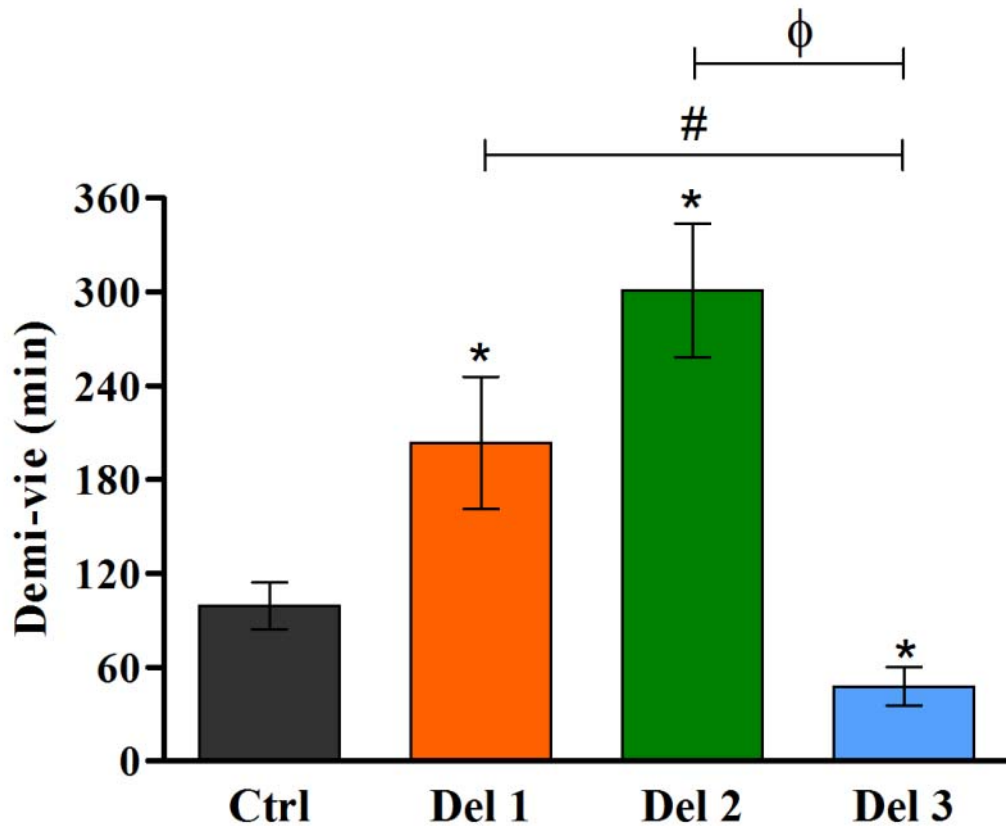


Figure 42. Modulation de la demi-vie des mutants de délétion de la région 3' non traduite de l'ARNm V5- α ENaC.

Les demi-vies des ARNm V5- α ENaC des cellules transfectées avec les mutants de délétion ont été comparées à la demi-vie de l'ARNm de cellules transfectées avec la construction composée du 3'UTR complet. Les demi-vies ont été mesurées à partir de la constante de dégradation (K) des courbes de dégradation de l'ARNm V5- α ENaC obtenues pour chaque mutant et sont exprimées en minutes \pm ESM. (Test ANOVA à un facteur et test *post hoc* de Bonferroni; * : $P < 0.05$ vs contrôle; # : $P < 0.05$ délétion 1 vs délétion 3; ϕ : $P < 0.05$ délétion 2 vs délétion 3; $n \geq 4$)

3.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

3.3.1. Identification de protéines liant la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC

Les protéines liant l'ARN sont des facteurs *trans* pouvant intervenir dans la modulation de l'expression d'un ARNm en altérant sa stabilité via une interaction avec la région 3' non traduite. Pour cette raison, nous avons tenté d'identifier la nature des protéines présentes dans les cellules épithéliales alvéolaires pouvant se lier au 3'UTR α ENaC à l'aide d'une technique de chromatographie d'affinité. Ainsi, la séquence complète du 3'UTR α ENaC a été transcrite *in vitro* en incorporant de l'uridine triphosphate biotinylé. Cet ARN biotinylé a été couplé via la streptavidine sur des billes magnétiques pour générer la matrice d'affinité. Un extrait de protéines totales provenant de cellules épithéliales alvéolaires a servi de source de protéines liant l'ARN. Les protéines isolées ont été séparées sur un gel de polyacrylamide dénaturant et marquées par une coloration au nitrate d'argent. Afin de s'assurer de la spécificité des protéines interagissant avec le 3'UTR α ENaC, un ARN non spécifique correspondant à la séquence inverse de l'ARNm β -actine a été utilisé en parallèle pour déterminer la nature des protéines qui ont un attachement spécifique au 3'UTR α ENaC par rapport aux protéines qui auraient une affinité non-séquence spécifique à tous les ARN. La chromatographie d'affinité avec les séquences 3'UTR a permis d'enrichir de façon spécifique par rapport à l'ARN contrôle quatre bandes avec les poids moléculaires approximatifs suivants : 100, 68, 59 et 40 kDa [Figure 43].

Ces bandes ont été extraites en chambre blanche, digérées à la trypsine et analysées par spectrométrie de masse en tandem LC/MS/MS. Les résultats obtenus ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel Scaffold 4. Le nombre de spectres uniques assignés a été présenté pour différentes protéines identifiées et la protéine sélectionnée a été encadrée en rouge [Figure 44]. Pour chaque bande, la protéine candidate a été sélectionnée selon plusieurs critères :

- Le poids moléculaire de la protéine candidate correspondait au poids moléculaire de la bande sélectionnée.
- L'abondance de la protéine dans chaque bande respective était élevée.
- La protéine était absente dans les autres bandes extraites.
- Un enrichissement était observé entre l'isolation avec le 3'UTR α ENaC et l'ARN non spécifique.

Voici la nature des protéines identifiées en appliquant tous ces critères : la DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 (DHX36), la « Poly(A)-binding protein » (PABP), la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène K (hnRNPK) et la « cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1 » (Tial1) [Figure 44]. La PABP a été retirée de nos protéines d'intérêt puisque son rôle est majoritairement lié à l'interaction avec la queue polyadénylée de l'ARNm (Eliseeva, Lyabin, & Ovchinnikov, 2013). Afin de confirmer l'identité et l'interaction de ces protéines avec le 3'UTR α ENaC, une chromatographie d'affinité a été effectuée et les protéines enrichies ont été séparées sur gel dénaturant suivi par un immunobuvardage de type Western dirigé vers les protéines d'intérêt. Ces immunobuvardages ont montré que les protéines DHX36, hnRNPK et Tial1 montraient un enrichissement significatif lorsque les séquences 3'UTR α ENaC étaient utilisées lors de la chromatographie d'affinité par rapport à la séquence contrôle non spécifique [Figure 45].

Une technique de chromatographie d'affinité inverse a également été effectuée pour le candidat hnRNPK afin de déterminer si les ARNm α ENaC pouvaient être spécifiquement enrichis par cette protéine. Une protéine chimérique GST-hnRNPK a été extraite à partir de bactéries *E.coli DH5 α* et couplée à des billes magnétiques associées à du glutathion afin de servir de matrice d'affinité. Les ARN totaux de cellules épithéliales alvéolaires ont été extraits et incubés avec la matrice d'affinité. La mesure de l'expression des ARNm par RT-*q*PCR a permis d'observer un enrichissement moyen de l'ARNm α ENaC de 36 fois avec la protéine GST-hnRNPK comparé à une isolation avec la protéine GST seule [Figure 46].

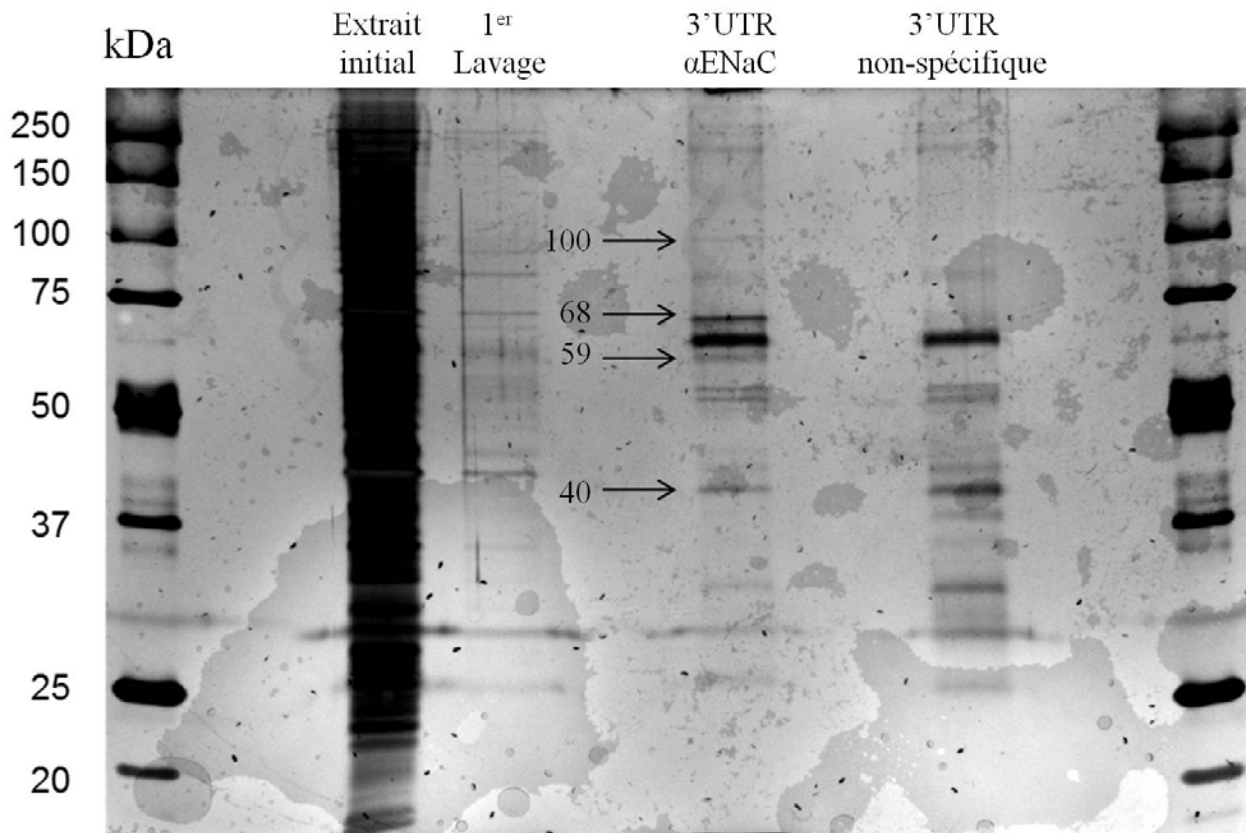


Figure 43. Isolation de protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité à l'aide du 3'UTR α ENaC.

Des protéines liant l'ARN ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant des ARN biotinylés transcrits *in vitro* correspondants au 3'UTR α ENaC ou un ARN non spécifique (brin négatif β -actine) couplés à des billes magnétiques, ainsi qu'un extrait protéique total de cellules épithéliales alvéolaires. Les échantillons de protéines isolées ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 10% et ont été marqués par une coloration au nitrate d'argent. Les bandes spécifiques identifiées ci-haut ont ensuite été extraites en chambre blanche pour une analyse par spectrométrie de masse (LC/MS/MS) (n=3).

Bande #1	Poids moléculaire	Nb spectres uniques 3'UTR	
		α ENaC	Irrelevant
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 (predicted), isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	114 kDa	4,91	0,758
PREDICTED: collagen alpha-1(XII) chain [Rattus norvegicus]	333 kDa	1,19	0,672
RecName: Full=Anionic trypsin-1; AltName: Full=Anionic trypsin I; AltName: Full=Pretrypsinogen I;	26 kDa	0,825	0,435
albumin, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	52 kDa	0,541	0,448
Bande #2			
poly(A) binding protein [Rattus norvegicus]	71 kDa	99,3	8,57
RecName: Full=Far upstream element-binding protein 1; Short=FBP; Short=FUSE-binding protein 1	67 kDa	78,3	37,9
rCG31475, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	72 kDa	11,4	1,42
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12 (predicted), isoform CRA_b [Rattus norvegicus]	79 kDa	4,00	0,982
MAP2 RNA trans-acting protein MARTA1 [Rattus norvegicus]	74 kDa	2,20	1,08
Bande #3			
rCG45587 [Rattus norvegicus]	61 kDa	69,7	20,4
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	51 kDa	68,6	2,95
RecName: Full=Far upstream element-binding protein 1; Short=FBP; Short=FUSE-binding protein 1	67 kDa	12,7	4,28
similar to IGF-II mRNA-binding protein 2 (predicted) [Rattus norvegicus]	65 kDa	5,39	0,552
poly(A) binding protein [Rattus norvegicus]	71 kDa	5,09	0,253
Bande #4			
Tial1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1 (mapped), isoform CRA_d [Rattus norvegicus]	42 kDa	121	29,9
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B [Rattus norvegicus]	31 kDa	87,4	78,8
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 isoform a [Rattus norvegicus]	38 kDa	15,7	22,2
rCG50739, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	38 kDa	11,0	0,392
rCG56007, isoform CRA_c [Rattus norvegicus]	42 kDa	6,84	3,96
rCG56007, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	43 kDa	4,93	3,74
rCG45587 [Rattus norvegicus]	61 kDa	3,28	1,42
polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	59 kDa	3,05	2,09

Figure 44. Identification des protéines liant le 3'UTR de l'ARNm α ENaC par spectrométrie de masse.

Les bandes extraites à partir d'une chromatographie d'affinité ont été transmises à la plateforme de protéomique de l'IRCM afin d'y effectuer une digestion à la trypsine suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (LC/MS/MS). Les protéines identifiées à l'aide du logiciel Scaffold 4 sont représentées pour chaque extrait isolé, ainsi que leur nombre de spectres uniques associés. Le candidat protéique sélectionné pour chaque bande a été encadré en rouge.

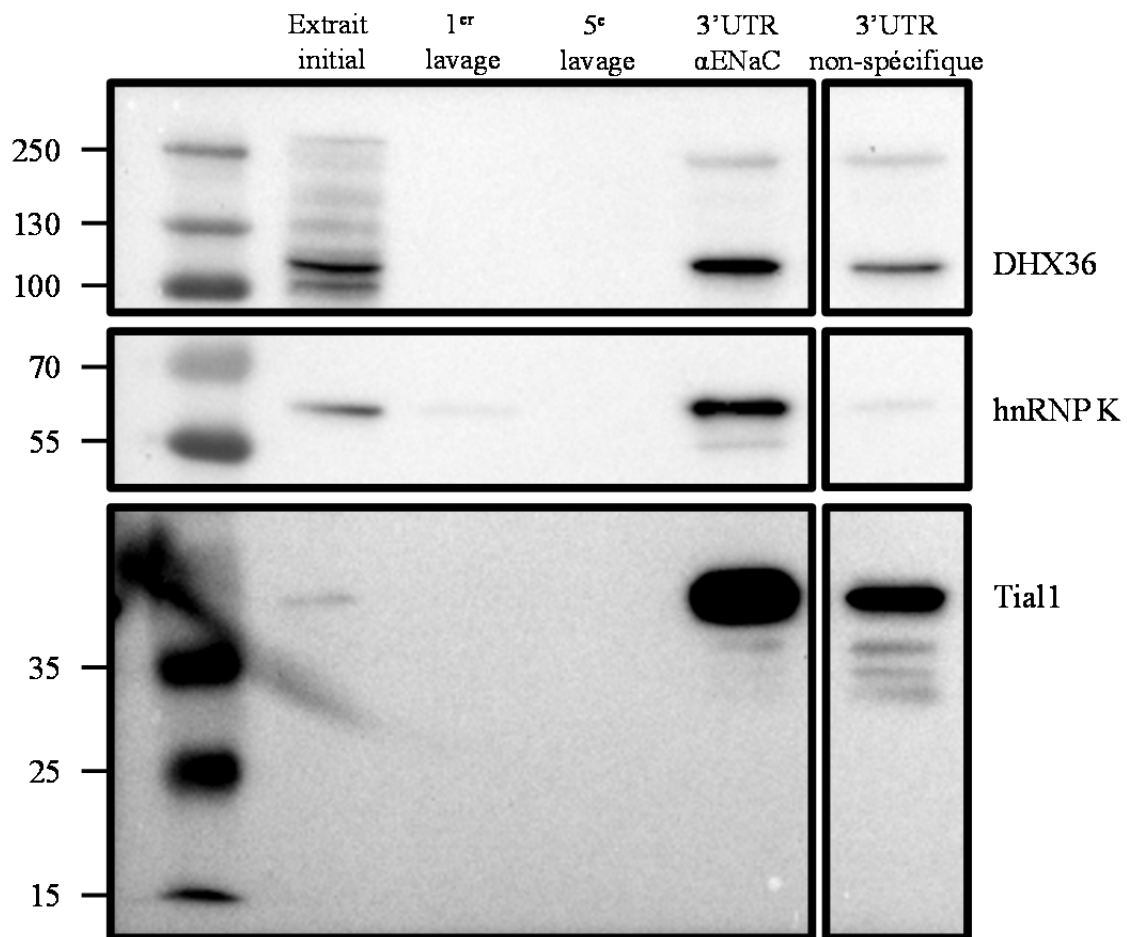


Figure 45. Confirmation de l'identification des protéines liant l'ARN associées au 3'UTR αENaC.

Des protéines liant l'ARN ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant des ARN biotinylés transcrits *in vitro* correspondants au 3'UTR αENaC ou un ARN non spécifique (brin négatif β-actine) couplés à des billes magnétiques, ainsi qu'un extrait protéique total de cellules épithéliales alvéolaires. Les échantillons de protéines isolées ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 10%, suivi par un immunobuvardage de type Western dirigé contre DHX36, hnRNP K ou Tial1. Un immunobuvardage de type Western représentatif est présenté pour chaque protéine (n≥4).

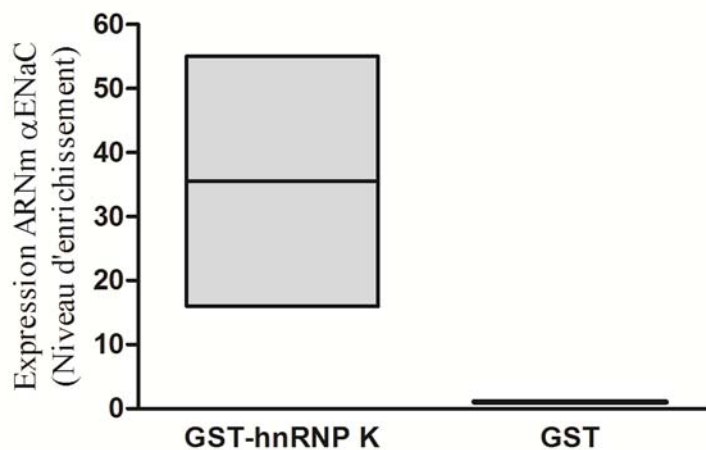


Figure 46. Enrichissement de l'ARNm α ENaC par la protéine hnRNP K par chromatographie d'affinité GST.

Une protéine chimérique GST-hnRNP K produite par des bactéries a été couplée à des billes magnétiques recouvertes de glutathion pour générer une matrice permettant d'enrichir les ARN capables de s'attacher à hnRNP K. Les ARN fixés sur la protéine hnRNP K ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm α ENaC a été évalué par RT-*q*PCR. Les données sont exprimées en niveau d'enrichissement de l'ARN α ENaC avec GST-hnRNP K comparé à l'enrichissement avec la protéine GST seule (n=2).

3.3.2. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

Afin d'identifier l'impact des protéines identifiées précédemment sur la modulation de l'ARNm α ENaC, des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec le plasmide pcDNA3 exprimant les protéines DHX36, hnRNPK ou Tial1. Le niveau d'expression de ces protéines dans les cellules transfectées a été comparé à celui de cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3 vide. La surexpression des protéines DHX36, hnRNPK et Tial1 dans les cellules transfectées a été confirmée par immunobuvardage de type Western [Figure 47].

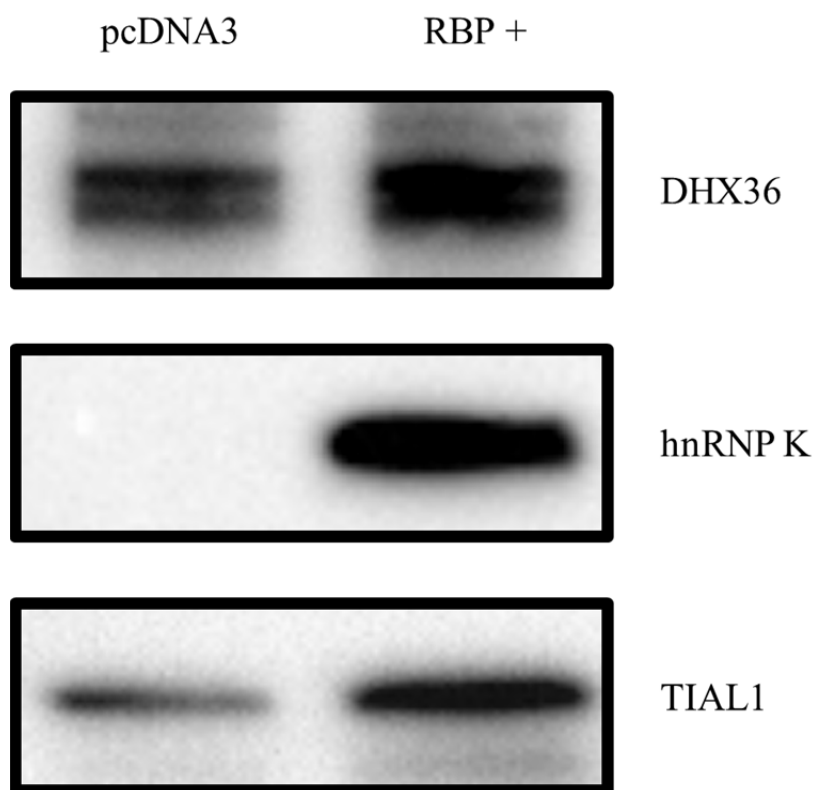


Figure 47. Surexpression des protéines DHX36, hnRNPK et Tial1 dans les cellules épithéliales alvéolaires

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec un plasmide pcDNA3 codant pour les protéines DHX36, hnRNPK ou Tial1, ainsi qu'avec le vecteur vide. Le niveau d'expression de chaque protéine a été évalué 72h post-transfection par immunobuvardage de type Western. Un immunobuvardage de type Western représentatif est présenté pour chaque protéine (n=3).

N.B. La forte surexpression de hnRNPK (RBP+) camoufle son expression endogène (pcDNA3) * voir Annexe Figure 1.

Les effets de la surexpression de ces protéines sur la concentration des ARNm α ENaC endogènes ont été testés par RT-*q*PCR. La surexpression des protéines DHX36, hnRNPK et Tial1 a inhibé significativement l'expression de l'ARNm α ENaC après 72h post-transfection à des niveaux de $59 \pm 9\%$, $53 \pm 11\%$ et $49 \pm 6\%$ comparée aux cellules transfectées avec le vecteur vide [Figure 48].

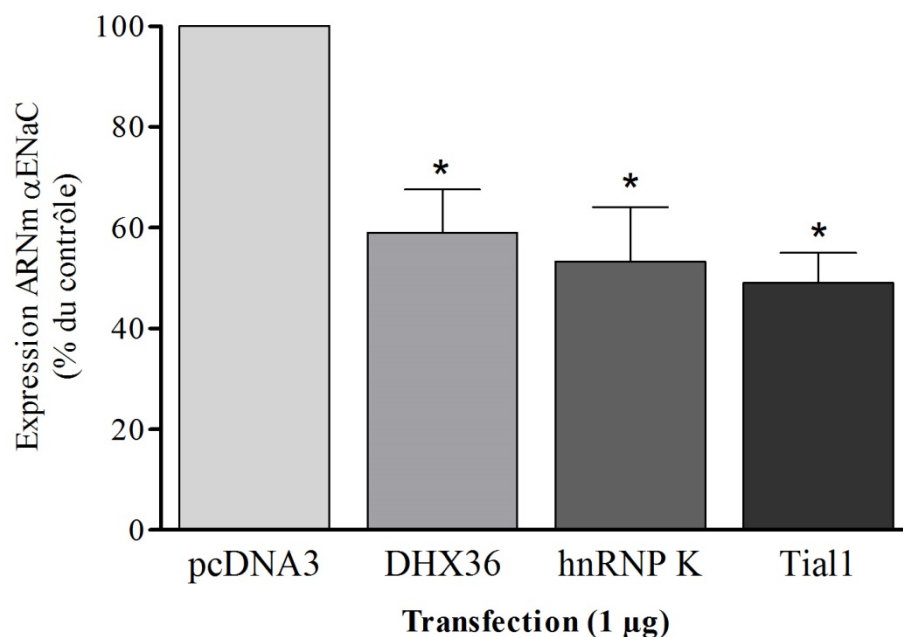


Figure 48. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par des protéines liant l'ARN
Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec le plasmide pcDNA3 vide ou codant pour les protéines DHX36, hnRNPK ou Tial1. L'expression de l'ARNm α ENaC a été quantifiée par RT-*q*PCR 72h post-transfection et a été exprimée en % d'expression de l'ARNm α ENaC comparé aux cellules transfectées avec le vecteur vide (contrôle) \pm ESM après la normalisation avec la β -actine. (One-sample t test, * : $P < 0,05$ vs contrôle; $n=4$)

3.3.3. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par les protéines liant l'ARN

Puisque l'expression de l'ARNm α ENaC peut être affectée aussi bien par une modulation de sa transcription que par une modulation de sa stabilité, l'activité du promoteur α ENaC a été évaluée dans des cellules épithéliales alvéolaires ayant une surexpression des protéines DHX36, hnRNPK ou Tial1. Ces cellules ont donc été cotransfectées avec la construction α ENaC-Luc exprimant la luciférase de *Photinus pyralis* sous le contrôle du promoteur α ENaC murin, le vecteur pRL-SV40 pour la normalisation du signal luciférase et le plasmide pcDNA3 vide ou exprimant l'une des trois protéines d'intérêt, soit DHX36, hnRNPK ou Tial1. La surexpression de DHX36 et de Tial1 n'a entraîné aucune modification de l'activité du promoteur comparé aux cellules transfectées avec le vecteur pcDNA3 vide. À l'opposé, la surexpression de hnRNPK a provoqué une chute significative de l'activité promotrice à $25 \pm 1\%$ de celle observée dans les cellules contrôles [Figure 49].

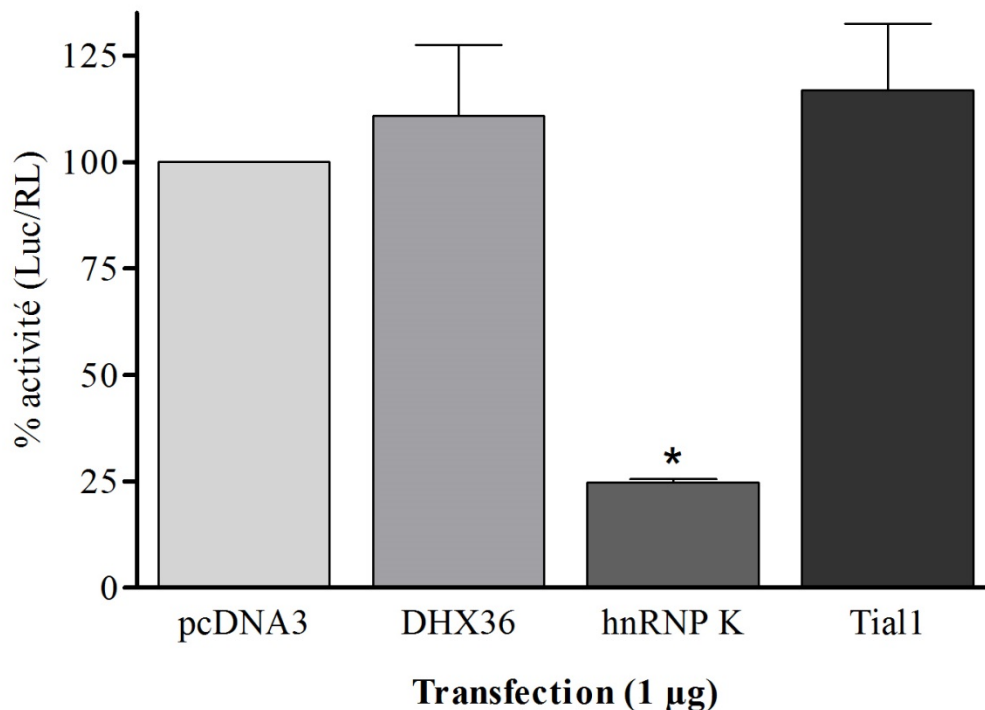


Figure 49. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par des protéines liant l'ARN

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec la construction α ENaC-Luc qui correspond au gène LUC de *Photinus pyralis* sous le contrôle transcriptionnel du promoteur α ENaC, ainsi qu'avec le vecteur pRL-SV40 exprimant la luciférase de *Renilla reniformis* (RL) pour la normalisation du signal. Ces cellules ont également été transfectées avec le plasmide pcDNA3 vide ou codant pour les protéines DHX36, hnRNP K ou Tial1. Suite à la transfection (72h), l'activité LUC a été mesurée à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System. L'activité du promoteur α ENaC est exprimée sous la forme du % \pm ESM de l'activité luciférase comparée aux cellules transfectées avec le vecteur vide suite à la normalisation avec le signal RL. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn; * : P<0.05 vs contrôle; n \geq 3 en duplicata).

3.3.4. Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

L'impact de la surexpression de DHX36, Tial1 et hnRNP K sur la stabilité de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires a été testé avec le système Tet-Off [Tableau 10]. L'expression de l'ARNm α ENaC avec l'épitope V5 dans le vecteur pTRE-tight est sous le contrôle exclusif du facteur de transcription tTA-Adv. Toute modulation de l'expression de V5- α ENaC suite à la cotransfection de DHX36, Tial1 ou hnRNP K serait donc la conséquence d'une modulation de la stabilité du messager et non pas une modulation de la transcription.

Tableau 10. Combinaison des plasmides utilisés pour l'étude de la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC

Combinaison des plasmides			
pcDNA3	DHX36	hnRNP K	Tial1
pTet-Off Advanced	pTet-Off Advanced	pTet-Off Advanced	pTet-Off Advanced
pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp	pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp	pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp	pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp
pcDNA3	pcDNA3-DHX36	pcDNA3-hnRNP K	pcDNA3-Tial1

La surexpression de DHX36 ou Tial1 a diminué la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC à des niveaux respectifs de $71 \pm 3\%$ et $74 \pm 4\%$ après 72h post-transfection comparativement aux cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3 vide [Figure 50]. Finalement, la surexpression de la protéine hnRNP K n'a eu aucun impact sur la modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC.

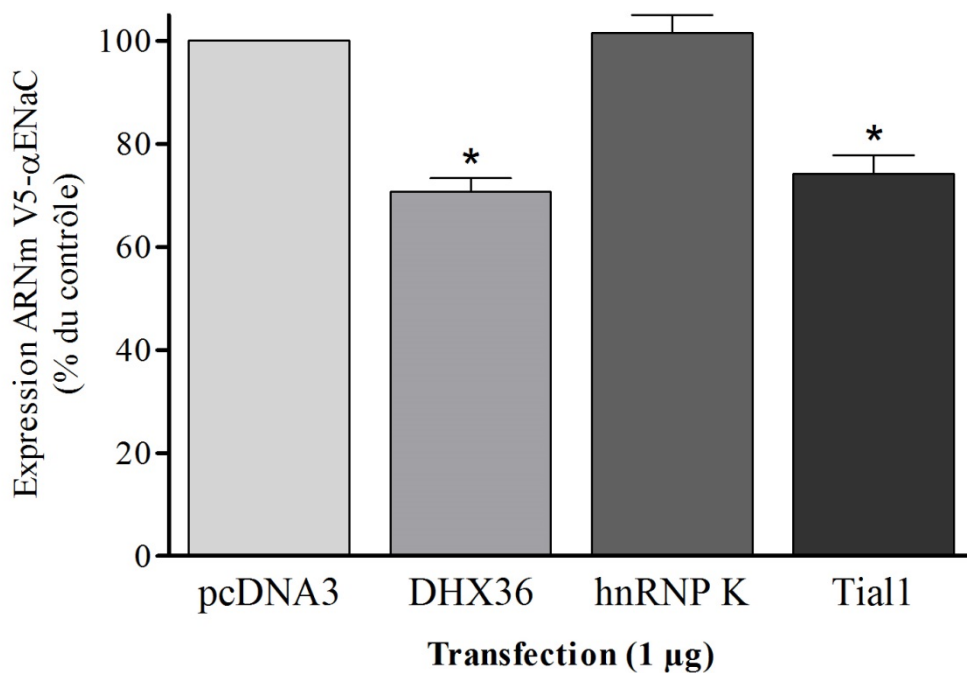


Figure 50. Modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par des protéines liant l'ARN

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été cotransfectées avec les plasmides pTRE-V5- α ENaC-3'UTR-comp, pTet-Off afin d'exprimer l'ARNm V5- α ENaC, ainsi qu'avec le plasmide pcDNA3 vide ou codant pour les protéines DHX36, hnRNP K ou Tial1. L'expression de l'ARNm V5- α ENaC a été quantifiée par RT-qPCR 72h post-transfection et a été exprimée en % d'expression de l'ARNm V5- α ENaC comparé aux cellules transfectées avec le vecteur vide (contrôle) \pm ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad. (Test Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Dunn, * : $P < 0,05$ vs contrôle; $n \geq 2$).

Chapitre 4 : Discussion

La modulation du canal ENaC a été définie à plusieurs niveaux. Les connaissances sont nombreuses en ce qui concerne la modulation de l'activité du canal à la membrane cellulaire, son expression protéique, ainsi que son activation par clivage protéolytique et tous les mécanismes régulant finement la dégradation et le recyclage du canal. Il existe toutefois peu d'information sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC. Le rôle de la régulation transcriptionnelle a été confirmé à plusieurs reprises dans le cadre de différents stress pathophysiologiques. Par contre, l'implication de la stabilité dans la modulation de l'expression du transcrit α ENaC a été peu investiguée. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse permettent de mettre en lumière l'importance de la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm α ENaC via son 3'UTR et de caractériser les mécanismes impliqués dans la modulation de sa stabilité.

4.1. Modulation de l'ARNm α ENaC par différents stress

4.1.1. Rationnelle

Les molécules impliquées dans l'inflammation et les lésions pulmonaires, telles que l'IL-1 β , le TNF- α , le TGF- β et les LPS ont l'effet commun d'inhiber l'expression du transcrit α ENaC. Suite à cette observation, nous nous sommes demandé si cette modulation de l'ARNm α ENaC fait partie d'une réponse programmée des cellules épithéliales alvéolaires à des conditions délétères en général ou si au contraire cette réponse était spécifique à chaque type de stress. Pour cette raison, nous avons voulu tester par quelles voies de signalisation et par quels mécanismes les cellules épithéliales alvéolaires modulaient l'expression des ARNm α ENaC face à deux conditions stressantes de nature différente : la cycloheximide et les LPS. La cycloheximide et les LPS de *Pseudomonas aeruginosa* sont connus pour moduler à la baisse l'expression des ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires (Dagenais et al., 2001b; Morneau, Dagenais, & Berthiaume, 2001). Bien qu'il soit considéré comme un inhibiteur de la traduction, la cycloheximide est également capable d'induire un stress cellulaire (Michels, Kanon, Konings, Bensaude, & Kampinga, 2000). En outre, un traitement à la cycloheximide a également un impact physiologique sur le canal ENaC avec une chute de

plus de 50% du courant transépithélial [Annexe Figure 3], une inhibition similaire à celle retrouvée avec les LPS (Boncoeur et al., 2010). Les LPS, un glycolipide constituant la majeure partie de la membrane externe des bactéries Gram négatif, sont des molécules pro-inflammatoires. Bien que nous sachions que la cycloheximide et les LPS inhibent l'expression de l'ARNm α ENaC dans notre modèle de cellules épithéliales alvéolaires en culture, nous en savons peu sur les voies de signalisation et les mécanismes de régulation impliqués.

4.1.2. Modulation de l'ARNm par la cycloheximide et les LPS

La modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC a été testée en réponse aux traitements avec la cycloheximide et les LPS. Suite aux deux traitements, nous avons pu observer une chute du niveau de transcrits exprimés dans les cellules épithéliales alvéolaires avec des niveaux d'expression très similaires à différents temps de traitements [Figure 17]. Malgré la nature différente du stress induit par chaque molécule, ce résultat suggère que des voies de signalisation communes pourraient être activées par les LPS et la cycloheximide pour moduler ENaC. Les LPS sont des molécules pro-inflammatoires reconnues et ont servi à plusieurs reprises à induire des stress inflammatoires *in vivo* ou *in vitro* (Li et al., 2013; Li et al., 2014). La concentration de LPS utilisée dans le cadre de ces expériences correspond à 15 μ g/mL et est considérée comme supra-pathologique. Cependant, nous avons tout de même utilisé cette concentration pour plusieurs raisons. D'abord, une courbe dose-réponse démontre que l'effet des LPS sur ENaC est maximal à cette dose [Annexe Figure 4]. De plus, c'est la dose qui a été utilisée précédemment lorsque nous avons étudié et caractérisé les effets des LPS sur la modulation du courant épithélial dépendant du canal ENaC (Boncoeur et al., 2010). En outre, une comparaison inter-espèce suggère que le rat serait le modèle d'étude présentant la plus grande résistance aux LPS (Fink, 2007).

4.1.3. Rôle de la traduction dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide

La cycloheximide est principalement connue comme étant un inhibiteur de la traduction (Ennis & Lubin, 1964). Pour cette raison, nous avons effectué une série d'expériences afin d'évaluer si l'inhibition de la traduction en soi pouvait être impliquée dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide. Tout d'abord, l'impact de

la cycloheximide sur l'expression du transcrit a été mesuré pour différentes concentrations. Tel qu'observé dans la figure 18, la cycloheximide a inhibé de façon significative le niveau d'expression de l'ARNm α ENaC, peu importe la concentration d'inhibiteur utilisée (0,1 à 8,8 μ M). Ces résultats sont intéressants puisque d'une façon générale, les concentrations de 0,1 et 0,5 μ M sont considérées comme trop faibles pour inhiber la synthèse protéique chez les cellules épithéliales rénales MDCK (Itani et al., 2003). L'efficacité de la cycloheximide à inhiber la synthèse protéique est variable d'un type cellulaire à l'autre. En effet, une concentration aussi faible que 0,04 μ M a démontré une capacité de réprimer la synthèse protéique de 35% dans un modèle d'explants de rétine de rat (Rehen, Varella, Freitas, Moraes, & Linden, 1996). Afin de mieux comprendre l'implication de l'inhibition de la traduction sur la modulation des ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires, nous avons testé comment l'émétine, un autre inhibiteur de la synthèse protéique qui agit avec un mécanisme similaire à la cycloheximide (Grollman, 1966) affectait les niveaux d'expression de α ENaC. Contrairement à la cycloheximide qui inhibe significativement l'expression du messenger α ENaC dans le temps, l'émétine n'a eu aucun impact sur son expression [Figure 19], malgré l'utilisation d'une dose suffisamment élevée pour inhiber la synthèse protéique (Itani et al., 2003; Pestka, 1971).

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide est indépendante de la répression de la synthèse protéique. Nos observations concordent avec les résultats présentés par le groupe d'Itani *et al* (Itani et al., 2003). Celui-ci rapporte que la modulation de l'expression d' α ENaC par la cycloheximide dans les cellules épithéliales rénales n'est pas reliée à l'inhibition de la synthèse protéique. Malgré cette similarité, la modulation de α ENaC par la cycloheximide dans les cellules MDCK diffère de celle des cellules épithéliales alvéolaires. Contrairement à notre modèle cellulaire, un traitement avec de la cycloheximide seule n'a aucun impact sur l'expression d' α ENaC dans les MDCK. Les cellules doivent être traitées simultanément avec de la cycloheximide et du dexaméthasone pour observer une induction synergique de l'expression de l'ARNm α ENaC. Ce phénomène a également été rapporté avec les cellules épithéliales alvéolaires où ce co-traitement augmente grandement le niveau de transcrit α ENaC (Dagenais et al., 2001b). La cycloheximide semble donc affecter différemment l'expression de α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires par rapport à ce qui a été observé dans les reins.

4.1.4. Impact de la cycloheximide et des LPS sur la survie cellulaire

Les conditions de stress cellulaire ou toxique pour les cellules peuvent induire la mort cellulaire, soit par apoptose, une mort programmée lorsque les dommages cellulaires sont trop importants, soit par nécrose. Les stress utilisés dans le cadre de nos expériences peuvent induire la mort cellulaire (Kumagai et al., 2009; Song et al., 2003). Puisque les LPS et la cycloheximide inhibent près de 50% de l'expression de l'ARNm α ENaC après 4h, il est possible que cette chute soit causée par une augmentation de la mort cellulaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'activation des caspases 3 et 7 pour évaluer comment les conditions expérimentales testées pouvaient affecter l'apoptose ainsi que l'activité de la LDH relarguée dans le milieu de culture pour évaluer la nécrose. La cycloheximide et les LPS n'induisent pas la nécrose à toutes les concentrations et les temps testés [Figure 21]. Les LPS induisent l'apoptose à 24h, mais pas à 4h au moment où le niveau d'ARNm α ENaC chute. Aux concentrations élevées (8,8 μ M) la cycloheximide induit l'apoptose à tous les temps testés. Par contre, à 0,1 et 1,0 μ M, l'activité des caspases 3 et 7 n'est pas affectée. Conséquemment à cet effet sur l'apoptose, nous avons utilisé une concentration de cycloheximide de 1,0 μ M pour les expériences subséquentes. Nos résultats montrent clairement que l'apoptose ne peut expliquer la modulation à la baisse des ARNm α ENaC par la cycloheximide 1,0 μ M, puisqu'à cette concentration, la cycloheximide diminue l'activité des caspases 3 et 7 [Figure 20A].

La capacité de la cycloheximide à moduler l'apoptose a été décrite à quelques reprises dans la littérature. La cycloheximide à faible concentration (0,05 à 0,3 μ M) protège les neurones de l'hippocampe de rat des effets nuisibles du glutamate et d'oxydants (Furukawa, Estus, Fu, Mark, & Mattson, 1997), tandis que des concentrations supérieures n'ont aucun effet. De façon similaire, la cycloheximide a un effet protecteur contre la toxicité et l'induction apoptotique causée par le peptide β -amyloïde sur les neurones de souris (Loo et al., 1993). Puisque l'apoptose est modulée par l'équilibre entre les signaux anti et pro-apoptotiques, la cycloheximide pourrait induire des mécanismes reliés à la survie cellulaire. Dans les neurones de l'hippocampe (Furukawa et al., 1997), la cycloheximide induit l'expression de c-Fos et Bcl-2, deux molécules qui pourraient également être impliquées dans la modulation de l'apoptose dans les cellules épithéliales alvéolaires. Ainsi, la cycloheximide pourrait présenter une

fonction anti-apoptotique à de faibles concentrations, telles que celles utilisées dans le cadre de nos expériences (0,1 et 1,0 μ M).

Dans le cas des LPS, les résultats présentés dans la figure 20B suggèrent que les LPS induisent l'apoptose après une stimulation de 24h. Ces résultats correspondent à la réponse généralement observée dans les cellules épithéliales alvéolaires suite au traitement aux LPS. En effet, ceux-ci induisent l'apoptose de façon « dose-dépendante » (Chuang et al., 2011; Song et al., 2003). Cela pourrait être partiellement expliqué par l'inhibition de la Sirtuin1, une déacétylase dépendante du NAD⁺ qui joue un rôle anti-apoptotique (Liu, Shao, & Sun, 2013). Par contre, un traitement de 4h aux LPS n'affecte pas l'activité des caspases 3 et 7 nous permettant d'exclure l'apoptose comme mécanisme d'inhibition de l'expression de l'ARNm α ENaC à ce temps. Globalement, nos résultats suggèrent que la mort cellulaire n'influencerait pas la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC suite aux traitements à la cycloheximide et aux LPS aux temps et concentrations choisis.

4.1.5. Implication des voies de signalisations dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS

4.1.5.1. Activation des voies de signalisation par la cycloheximide et les LPS

La modulation de l'expression du transcrit α ENaC par la cycloheximide n'est pas causée par l'inhibition de la traduction *per se*. Pour cette raison, nous avons testé si cette réponse, tout comme celle des LPS, pouvait être secondaire à l'activation de cascades de signalisation dans les cellules. Pour répondre à cette question, nous avons étudié la nature des voies de signalisation activées dans les cellules épithéliales alvéolaires par ces deux traitements. Les résultats montrent une augmentation des isoformes phosphorylées actives des MAPK ERK1/2, p38 et JNK suite aux deux traitements [Figures 22-24]. La cycloheximide a entraîné une activation soutenue des MAPK ERK1/2 et p38 sur une période de 24h et une activation transitoire de la MAPK JNK. La réponse cellulaire aux LPS fut différente de la cycloheximide avec une activation transitoire des trois familles de MAPK. L'activation transitoire de la MAPK p38 est similaire à ce qui a été observé en réponse aux LPS dans les cellules épithéliales alvéolaires fœtales de rat (Haddad & Land, 2002). Les MAPK ERK1/2 et p38 sont également activées suite aux traitements aux LPS dans les cellules épithéliales

alvéolaires A549 (Wu et al., 2011). C'est également le cas de la MAPK JNK qui est activée transitoirement dans les cellules bronchiques BEAS-2B (Guillot et al., 2004). L'activation des MAPK par les LPS pourrait être liée à la modulation de la réponse pro-inflammatoire après l'activation du récepteur TLR4 (Thorley et al., 2011). En revanche, la cycloheximide est une molécule causant un stress abiotique dont aucun récepteur n'est connu à ce jour. Cependant, sa capacité à induire une activation soutenue des différentes MAPK a été observée également pour plusieurs types cellulaires. (Croons, Martinet, Herman, Timmermans, & De Meyer, 2007; Hershko, Robb, Wray, Luo, & Hasselgren, 2004; Kyriakis & Avruch, 1990; Lin & Hsu, 2000).

La cycloheximide semble provoquer une activation persistante des voies de signalisation MAPK ERK1/2 et p38. Pour cette raison, nous avons tenté d'identifier le type de stress que la cycloheximide pouvait induire dans les cellules épithéliales alvéolaires. Nous avons évalué l'impact de la cycloheximide sur la production de ROS. La cycloheximide n'a induit aucune sécrétion significative de ROS dans les cellules épithéliales alvéolaires [Annexe Figure 5]. Cependant, comme dans le cas d'un traitement aux LPS, la cycloheximide a stimulé l'expression d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β et TNF- α) [Figure 25]. Ces résultats suggèrent que la cycloheximide pourrait induire une réponse pro-inflammatoire dans ces cellules. La cycloheximide (Ito et al., 2006; Li, Guo, et al., 2010; Roger, Out, Jansen, & Lutter, 1998) et les LPS (Raoust et al., 2009; Schulz et al., 2002) ont démontré à plusieurs occasions leur capacité à induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans plusieurs types de cellules épithéliales et immunitaires. Dans les cellules Caco-2, la cycloheximide augmente l'expression de l'ARNm IL-6 par une transcription accrue et une stabilisation du transcrit. Cette super-induction provient de l'activation soutenue de la MAPK p38 et de NF- κ B (Hershko et al., 2004). Plusieurs des cytokines pro-inflammatoires modulées par la cycloheximide dans nos cellules sont connues pour inhiber l'expression de l'ARNm α ENaC (Dagenais et al., 2004; Galietta et al., 2002; Roux et al., 2005). Bien que nous n'ayons pas testé si la cycloheximide module la quantité de cytokines sécrétées dans le milieu, il serait intéressant de déterminer si ces cytokines pourraient être impliquées dans la modulation de l'expression d' α ENaC par la cycloheximide. Globalement, nos travaux montrent que les LPS et la cycloheximide activent les mêmes voies de signalisation (MAPK ERK1/2, p38 et JNK) dans les cellules épithéliales alvéolaires avec une différence cependant quant à la persistance du signal entre ces voies.

4.1.5.2. Rôle des voies de signalisation dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS

L'influence des différents inhibiteurs des MAPK a été étudiée afin de déterminer si les voies de signalisation activées précédemment étaient impliquées dans la modulation de l'expression du transcrit α ENaC par les LPS et la cycloheximide. Les inhibiteurs des voies de signalisation MAPK sont connus pour avoir des spécificités croisées (Davies, Reddy, Caivano, & Cohen, 2000) ayant comme conséquence l'inhibition d'autres cibles en plus des MAPK. Pour cette raison, nous avons utilisé deux inhibiteurs pour les MAPK ERK1/2 et p38 ayant chacun une structure chimique et un mode d'action différents. PD98059 et PD184352 ont été utilisés pour inhiber la MAPK ERK1/2, alors que SB203580 et Birb796 ont été utilisés pour inhiber la MAPK p38. Dans le cas de la MAPK JNK, un seul inhibiteur, JNK inhibitor II, fut utilisé. Les résultats présentés dans les figures 26 et 27 montrent clairement que les MAPK ERK1/2 et p38 sont impliqués dans la répression de l'ARNm α ENaC par les LPS et la cycloheximide. Ces données suggèrent également qu'il y a une différence dans les mécanismes d'action des différentes voies de signalisation entre les MAPK ERK1/2 et p38, puisque l'inhibition des deux voies de signalisation est nécessaire pour inhiber les effets du LPS par rapport à ce qui est observé avec la cycloheximide. Bien que les voies de signalisation des MAPK ERK et p38 soient toutes les deux impliquées dans la modulation de α ENaC par la cycloheximide et les LPS, il existe une divergence dans la modalité de l'inhibition de l'expression des ARNm α ENaC pour les deux traitements. Comment expliquer ce paradigme? Le profil d'activation mis en place par une voie de signalisation dépend de la nature des kinases phosphorylées, mais également des sites phosphorylés sur ces kinases. L'inhibition individuelle de la MAPK ERK1/2 ou p38 est suffisante pour bloquer son effet sur la modulation du niveau d'expression des ARNm α ENaC par la cycloheximide. Parmi les différentes kinases présentes en aval des voies de signalisation des MAPK ERK et p38, la MAPKAPK MSK1/2 est un candidat particulièrement intéressant pour expliquer la modulation d' α ENaC par la cycloheximide.

Contrairement aux autres MAPKAPK cette kinase peut être phosphorylée directement par ERK et p38 alors que les autres MAPKAPK sont activés exclusivement par une de ces deux voies (Cargnello & Roux, 2011). Les connaissances actuelles sur les mécanismes

d'activation de MSK1/2 nous permettent de suggérer un mécanisme probable permettant d'expliquer la voie de signalisation de la cycloheximide. Les MAPK ERK1/2 et p38 actives peuvent s'associer à MSK1/2 et phosphoryler trois sites d'activation communs (McCoy, Campbell, Deak, Bloomberg, & Arthur, 2005). Ces différents sites de phosphorylation sont interdépendants les uns des autres pour mener à l'activation de MSK1/2 (Duda K, 2000). Il se pourrait donc que nous soyons en présence d'un phénomène de seuil limite, comme ce qui a été décrit pour la MAPK ERK1/2 où la phosphorylation de deux sites est requise pour observer une activation (Ferrell & Bhatt, 1997). Il pourrait y avoir une accumulation de MSK1/2 mono ou biphosphorylée par une des MAPK (ERK1/2 ou p38) qui nécessiterait une troisième phosphorylation par la seconde MAPK pour devenir pleinement active. En inhibant une des deux voies des MAPK, ce seuil limite d'activation de MSK ne pourrait jamais être atteint ce qui explique qu'un inhibiteur est suffisant pour empêcher l'activation de cette voie.

Contrairement à ce que nous avons vu avec la cycloheximide, une inhibition conjointe des MAPK ERK1/2 et p38 est requise pour inhiber les effets des LPS sur l'expression des ARNm α ENaC. Ce résultat suggère que des voies de signalisation activées en parallèle vont ultimement mener à l'activation de kinases distinctes qui devront être inhibées séparément par les inhibiteurs des MAPK ERK1/2 et p38. Contrairement à ce que nous avons proposé avec la cycloheximide, il y aurait une spécificité dans la cible de phosphorylation de ERK1/2 et p38. Comme nous observons une inhibition partielle de l'effet des LPS sur l'ARNm α ENaC suite à l'utilisation individuelle d'inhibiteurs des MAPK ERK1/2 et p38 cela suggère une coopération potentielle croisée entre ERK1/2 et p38 pour moduler le niveau du transcrit α ENaC.

Des travaux de notre laboratoire ont également démontré que la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) était impliquée dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les LPS. La PI3K est une enzyme permettant la transformation de PIP₂ en PIP₃. Le PIP₃ favorise l'activation de la sérine-thréonine kinase Akt impliquée dans plusieurs mécanismes de signalisation (Cantley, 2002). Nous avons montré que l'inhibition de la PI3K par différents inhibiteurs (LY294002 et Wortmannine) bloque la modulation négative des LPS sur l'expression de l'ARNm α ENaC (Morneau, 2001; Morneau et al., 2001). L'enzyme PI3K peut se retrouver en amont des voies de signalisation des MAPK ERK1/2 et p38 (Karnitz, Burns, Sutor, Blenis, & Abraham, 1995; Robertson, Mireau, & Ostergaard, 2005; Yamboliev, Wiesmann, Singer, Hedges, & Gerthoffer, 2000). Une interrelation entre la PI3K et les MAPK

ERK1/2 et p38 suite à un traitement aux LPS a également été observée dans les monocytes humains (Guha & Mackman, 2002). Ces observations nous amènent donc à proposer un mécanisme probable permettant d'expliquer les voies de signalisation des LPS. L'activation conjointe des MAPK ERK1/2 et p38 par la PI3K mènerait subséquemment à l'activation parallèle de kinases qui modulent l'expression de l'ARNm α ENaC. Cela nous suggère donc que les mécanismes de modulation de l'ARNm α ENaC sont probablement différents entre la cycloheximide et les LPS [Figure 51].

Ces résultats sont concordants avec plusieurs études démontrant que les MAPK ERK1/2 et p38 jouent un rôle important dans l'expression génique de α ENaC. Cependant, l'impact de l'activation de la MAPK p38 sur l'expression du messenger pourrait être tissu-spécifique. En effet, cette MAPK est impliquée dans la chute de l'expression de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires suite à son activation par l'IL-1 β (Roux et al., 2005). Cependant, dans les cellules rénales MDCK, la MAPK p38 est responsable de la super-induction de l'ARNm α ENaC en présence de glucocorticoïdes (Itani et al., 2003). Plusieurs études ont démontré que l'activation de la MAPK ERK1/2 pouvait inhiber l'expression d' α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires. La cytokine TGF- β (Frank et al., 2003) et des inhibiteurs des canaux potassiques (Bardou et al., 2012) répriment l'expression du transcrit α ENaC via une activation de cette MAPK dans ce type cellulaire. Comme dans les cellules épithéliales pulmonaires H441 (Baines et al., 2010), nos résultats confirment que la voie de signalisation ERK1/2 est impliquée dans la chute de transcrits causée par les LPS. Dans le cas de la MAPK JNK, malgré son activation transitoire, nous avons été incapables de démontrer l'influence de cette voie sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les LPS et la cycloheximide. Cette constatation a également été rapportée dans les cellules épithéliales alvéolaires A549 suite à un traitement oxydatif avec le H₂O₂ (Wang et al., 2000).

L'ensemble des résultats sur les voies de signalisation impliquées par les LPS et la cycloheximide démontrent que l'expression de l'ARNm α ENaC serait influencée par un réseau de voies de signalisation complexe qui serait différent selon le stress induit. Par conséquent, les mécanismes moléculaires activés par ces voies pourraient être différents.

4.1.6. Mécanisme de modulation de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS

4.1.6.1. Modulation transcriptionnelle

Le niveau d'expression d'un transcrit dans la cellule résulte de l'équilibre entre la modulation de la transcription du gène et celui des mécanismes post-transcriptionnels qui vont moduler la stabilité de l'ARNm. Des travaux dans le laboratoire ont démontré que ces deux processus étaient impliqués dans l'inhibition de l'expression de l'ARNm α ENaC par le TNF- α (Dagenais et al., 2006; Dagenais et al., 2004). Puisque les MAPK ERK1/2 (Bardou et al., 2012; Frank et al., 2003; Lin et al., 1999; Zentner et al., 1998) et p38 (Itani et al., 2003; Roux et al., 2005) sont connues pour moduler à la baisse la transcription du gène α ENaC, nous avons voulu étudier dans un premier temps si les LPS et la cycloheximide pouvaient avoir un impact sur l'activité transcriptionnelle du promoteur α ENaC murin. Seuls les LPS ont inhibé de façon significative l'activité luciférase après 6h de traitement [Figure 28]. De plus, les inhibiteurs des MAPK ERK1/2 et p38 ont diminué en partie l'inhibition de la transcription du gène par les LPS [Figure 29B]. De façon intéressante, le taux de diminution de l'activité du promoteur α ENaC par les LPS est proportionnel à la chute du niveau d'ARNm α ENaC observé dans les cellules traitées. Cette observation suggère que le mécanisme principal impliqué dans la modulation des ARNm α ENaC par les LPS est une répression de la transcription du gène.

Dans un autre système, l'activation de la voie de signalisation Ras/ERK mène à l'inhibition de la transcription d' α ENaC dans les cellules épithéliales salivaires (Lin et al., 1999). La MAPK ERK1/2 joue également un rôle dans l'inhibition de la transcription d' α ENaC par le TGF- β dans les cellules épithéliales alvéolaires (Frank et al., 2003) et rénales (Chang et al., 2008). Le motif GRE présent sur le promoteur α ENaC pourrait également être impliqué dans la modulation de la transcription dépendant de la MAPK ERK1/2 lors d'un traitement aux LPS. En effet, dans plusieurs modèles expérimentaux (TPA (Zentner et al., 1998), H₂O₂ (Wang et al., 2000) et TGF- β (Frank et al., 2003)), l'activation de la MAPK ERK1/2 entraîne une chute de la transcription du gène α ENaC selon un mécanisme dépendant du motif GRE. Un des effets de l'activation de la MAPK ERK1/2 sur le promoteur α ENaC semble donc d'inhiber l'activation transcriptionnelle induite par les glucocorticoïdes. Nos

résultats confirment l'importance de la MAPK ERK1/2 dans la modulation de l'activation du promoteur α ENaC. Nos résultats montrent cependant que la MAPK p38 est également nécessaire pour diminuer l'expression de α ENaC par les LPS.

L'inhibition des MAPK ERK1/2 et p38 ne peut complètement bloquer les effets des LPS sur la transcription. Nos résultats suggèrent donc que plusieurs facteurs de transcription travaillant en synergie pourraient moduler l'activité du promoteur α ENaC. Dans les cellules H441, il a été démontré que NF- κ B pouvait se lier à une séquence consensus dégénérée présente sur le promoteur α ENaC. Un traitement aux LPS augmente l'activité de NF- κ B dans ces cellules (Baines et al., 2010), ce qui suggère que NF- κ B pourrait être un candidat potentiel dans la modulation transcriptionnelle par les LPS. Cependant il semble que les inhibiteurs de NF- κ B ne puissent bloquer l'effet des LPS suggérant un mécanisme de modulation plus complexe qu'il n'y paraît [*Observations non publiées*]. L'activation de NF- κ B pourrait cependant être complémentaire à celle des MAPK ERK1/2 et p38 afin d'obtenir un effet maximal sur le promoteur α ENaC. Une étude du transcriptome des gènes modulés par le TNF α dans les cellules épithéliales alvéolaires a montré l'expression de plusieurs facteurs de transcription de la famille ETS. Ces facteurs peuvent être impliqués dans la répression de la transcription. Un niveau de transcrite modulé à la hausse pour plusieurs de ces facteurs de transcription en condition pro-inflammatoire et corrélé négativement avec l'expression des transcrits α , β , et γ ENaC a été observé [Annexe Figure 6]. De plus, des séquences consensus pour plusieurs facteurs de cette famille (TP53, ETS2, ETV3) sont présentes dans le promoteur α ENaC, ce qui suggère que ces facteurs de transcription pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de la transcription induite par les LPS.

Globalement, NF- κ B pourrait inhiber conjointement l'expression génique de α ENaC avec les facteurs de transcription ETS. Cette hypothèse devra être étudiée par une étude fonctionnelle du promoteur α ENaC à l'aide de mutants de délétion. Des résultats préliminaires suggèrent que la région la plus proche du site d'initiation de la transcription serait essentielle pour l'effet des LPS [Annexe Figure 7]. En effet, même si l'inhibition de l'activité du promoteur par les LPS est réduite avec les mutants de délétion les plus courts (région proximale du début de la transcription), on note encore un effet des LPS ce qui suggère que ces régions seraient impliquées dans la modulation de la transcription du gène. Ces résultats cadrent bien avec ce que nous avons montré précédemment et qui suggère que plusieurs

facteurs de transcription (ou de répression), agissant sur différentes régions du promoteur, et activés par des voies différentes pourraient être impliqués dans la modulation à la baisse de la transcription de α ENaC par les LPS.

La cycloheximide a eu un effet non significatif sur l'activité du promoteur après 6h de traitement et un impact significatif après 24h. Ces résultats suggèrent que la chute rapide de l'expression de l'ARNm α ENaC observée à 6h [Figure 17] ne peut être expliquée par l'inhibition de l'activité du promoteur α ENaC. De plus, l'inhibition des MAPK ERK1/2 et p38, suffisante pour réprimer l'effet de la cycloheximide, n'a pu restaurer l'activité du promoteur à 24h [Figure 29A]. Ce résultat pourrait être expliqué par une inhibition non spécifique de l'activité luciférase après 24h. Alternativement, la répression du promoteur α ENaC pourrait être un mécanisme tardif et secondaire induit par la cycloheximide. De façon intéressante, ces résultats suggèrent que la régulation post-transcriptionnelle de la stabilité des ARNm α ENaC pourrait être impliquée dans la modulation précoce de ces transcrits après 4h de traitement à la cycloheximide.

4.1.6.2. Modulation post-transcriptionnelle

Traditionnellement, la mesure de la stabilité d'un transcrit est obtenue en inhibant directement la machinerie transcriptionnelle de la cellule à l'aide d'un inhibiteur de la transcription comme l'actinomycine D. Un des problèmes de cette approche expérimentale est lié au fait que ces inhibiteurs sont également connus pour altérer le métabolisme cellulaire (Ljungman, 2007). De plus, l'actinomycine D inhibe complètement les effets de la cycloheximide sur l'expression de l'ARNm α ENaC [Figure 30]. Ceci suggère que la transcription joue un rôle important dans la modulation de l'expression du transcrit α ENaC par les LPS et la cycloheximide. Une discussion détaillée de l'impact de l'actinomycine D sur l'expression de l'ARNm α ENaC sera présentée dans la section 4.2. Les résultats précédents révèlent que l'actinomycine D ne peut être utilisée pour mesurer la demi-vie de l'ARNm α ENaC.

La séquence 3' non traduite (3'UTR) d'un transcrit joue un rôle important dans la modulation de sa stabilité (Tourriere, Chebli, & Tazi, 2002). Pour cette raison, nous avons utilisé cette propriété pour déterminer, en absence d'actinomycine D, si le 3'UTR pouvait jouer un rôle dans la modulation de la stabilité des ARNm α ENaC par la cycloheximide. Pour

étudier cette question, des clones luciférase ont été produits dans lesquels différents fragments du 3'UTR α ENaC ont été insérés en 3' de l'ARNm. L'activité luciférase de ces clones a été mesurée en présence de ces deux stress. La cycloheximide, contrairement aux LPS, a inhibé significativement l'activité luciférase de la construction composée du 3'UTR complet. [Figure 31A]. De plus, l'effet de la cycloheximide sur l'activité luciférase a été inhibé suite à la délétion d'une partie du 3'UTR [Figure 31B]. Ces résultats suggèrent que la partie distale du 3'UTR α ENaC est impliquée dans la modulation de l'activité luciférase par la cycloheximide. Puisque les régions en 3'UTR des ARNm sont largement responsables de la modulation de la stabilité de ceux-ci, nos résultats suggèrent que les séquences 3'UTR α ENaC pourraient jouer un tel rôle dans la modulation à la baisse des ARNm α ENaC ainsi que dans la baisse d'activité des chimères luciférase par la cycloheximide.

4.1.7. Conclusion

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant démontrent que les LPS et la cycloheximide inhibent l'expression de l'ARNm α ENaC de façon similaire dans les cellules épithéliales alvéolaires. Cette modulation s'effectue via l'activation des voies de signalisation des MAPK ERK1/2 et p38. Cependant, les mécanismes d'inhibition induits par ces deux molécules sont différents. En effet, la cycloheximide active les MAPK ERK1/2 et p38 d'une façon soutenue, tandis que l'activation de ces mêmes voies n'est que transitoire suite au traitement aux LPS. En outre, les LPS répriment l'expression du transcrit α ENaC par une diminution de la transcription, alors que la cycloheximide agirait via des mécanismes post-transcriptionnels. Un modèle est présenté ci-dessous résumant les mécanismes décrits dans la modulation par la cycloheximide et les LPS. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de modulation de l'expression d' α ENaC sont différents selon la nature du stress cellulaire.

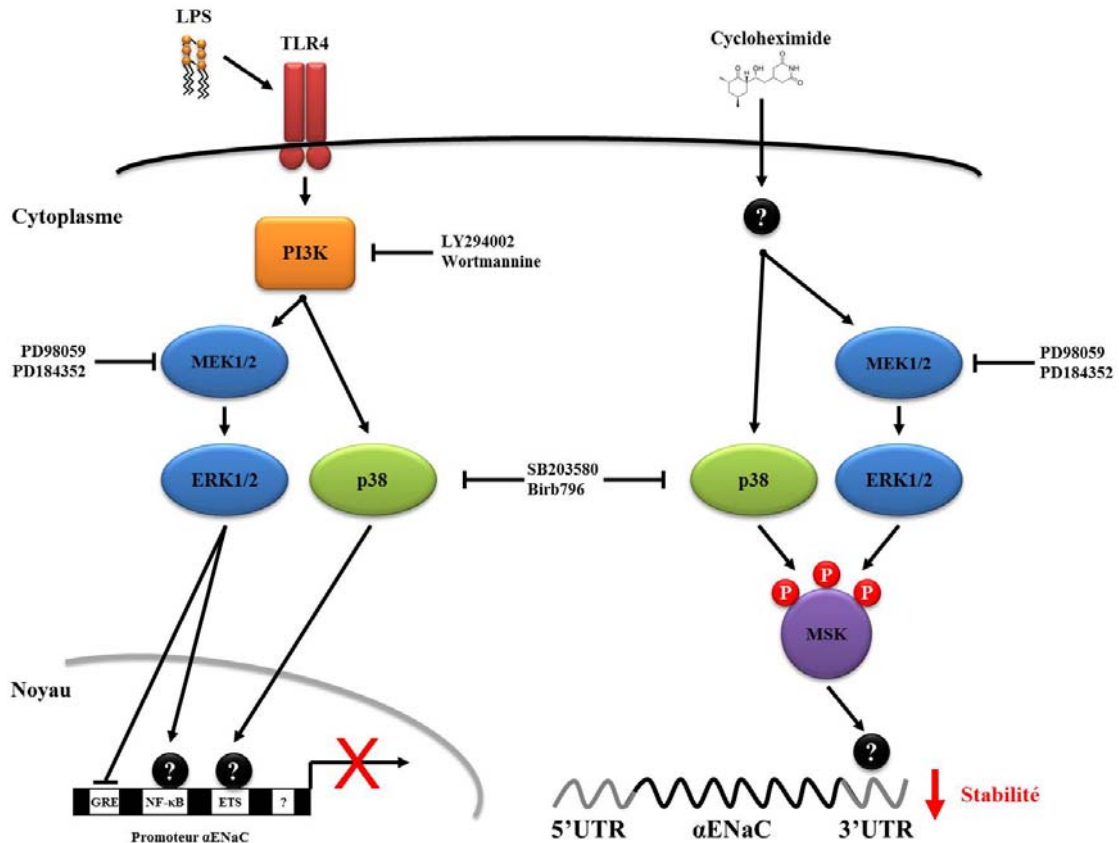


Figure 51. Modèle proposé pour la modulation de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et les LPS.

Les LPS interagissent avec le récepteur TLR4 menant à l'activation de la PI3K. Celle-ci activerait transitoirement les MAPKs ERK1/2 et p38 qui vont inhiber l'activité transcriptionnelle du promoteur α ENaC par la modulation de facteurs de transcription. À l'opposée, la cycloheximide provoque l'activation soutenue des MAPKs ERK1/2 et p38 qui pourrait mener à l'activation de la MAPKAPK MSK1/2 entraînant une chute de la stabilité du transcrit α ENaC.

4.2. Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de sa stabilité

4.2.1. Rationnelle

Les résultats obtenus précédemment suggèrent que le 3'UTR de l'ARNm α ENaC est important dans la modulation de l'expression du transcrite lors d'un traitement à la cycloheximide. Cette observation s'ajoute aux résultats issus des traitements au TNF- α et à la dexaméthasone qui altèrent également la stabilité de l'ARNm α ENaC (Dagenais et al., 2001b; Dagenais et al., 2004). Ces résultats nous ont amené à nous questionner sur l'importance du 3'UTR α ENaC sur son expression de base dans les conditions physiologiques normales.

4.2.2. Impact de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC

Nous avons voulu déterminer si le 3'UTR de l'ARNm α ENaC jouait un rôle important dans la stabilité de l'ARNm en utilisant le système des mutants chimères luciférase. Pour se faire nous avons construit différentes chimères luciférases comportant un 3'UTR α ENaC complet ou tronqué. Puisque l'effet de la cycloheximide a nécessité la région distale du 3'UTR, nous avons décidé d'effectuer la même délétion afin d'observer l'importance de cette région de 520pb. Sa suppression a provoqué une chute significative de l'activité luciférase comparée aux cellules épithéliales alvéolaires transfectées avec le clone présentant un 3'UTR complet [Figure 32A]. Cette modulation de l'activité luciférase peut être expliquée par une variation de l'efficacité de la traduction ou bien par un impact sur la stabilité du transcrite luciférase (Gonzalez-Feliciano et al., 2014). Pour cette raison, nous avons également évalué par RT-*q*PCR si le 3'UTR α ENaC influençait la concentration des messagers luciférase – 3'UTR α ENaC. Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus par la mesure de l'activité luciférase [Figure 32B]. Ces résultats suggèrent que les séquences du 3'UTR α ENaC sont capables de stabiliser la quantité du transcrite luciférase et que c'est cette stabilisation qui explique les résultats obtenus précédemment.

Chaque région non traduite de l'ARNm α ENaC pourrait avoir un rôle distinct dans sa modulation post-transcriptionnelle. En effet, le 5'UTR n'a pas d'impact sur la modulation de la stabilité du transcrite, mais il est impliqué dans la modulation de la traduction (Otulakowski

et al., 2001). Dans le cas du 3'UTR, seul l'ARNm de la sous-unité γ ENaC a présenté une modulation traductionnelle par sa région 3' non traduite suite à une stimulation à l'aldostérone dans des cellules mCCD (Perlewitz et al., 2010). Nos résultats suggèrent que les séquences 3'UTR seraient principalement impliquées dans la modulation de la stabilité du transcrit α ENaC.

Pour compléter nos expériences nous avons comparé l'activité luciférase de nos chimères avec celle de la luciférase ne comportant aucun 3'UTR α ENaC. Ces résultats [Annexe Figure 8] montrent que l'absence totale de 3'UTR α ENaC entraîne une chute importante de l'activité luciférase à un niveau négligeable comparé à l'activité de la chimère avec un 3'UTR complet. Ces résultats, quoique préliminaires, suggèrent que le 3'UTR α ENaC en soi serait globalement stabilisateur dans les cellules épithéliales alvéolaires en condition physiologique. Ce résultat semble étonnant de prime abord puisqu'une corrélation négative a été suggérée entre la longueur du 3'UTR et la stabilité d'un ARNm (Yang et al., 2003). Cette hypothèse est basée sur le fait que plus de nucléotides sont présents, plus la probabilité d'observer des sites de liaison aux miARNs est grande, entraînant une chute de l'expression du transcrit. Par contre, cette corrélation n'a pu être réitérée dans une étude plus récente (Sharova et al., 2009) suggérant que l'équilibre entre la présence de sites stabilisateurs et déstabilisateurs aurait un impact global sur la stabilité d'un transcrit. Ce qui est certain c'est que le 3'UTR α ENaC semble avoir un rôle stabilisateur dans nos conditions expérimentales même lorsque ces séquences sont greffées sur un autre ARNm.

4.2.3. Mesure de la stabilité de l'ARNm α ENaC à l'aide du système Tet-Off

4.2.3.1. Mise au point du modèle Tet-Off dans les cellules épithéliales alvéolaires

Nous avons voulu déterminer par la suite comment le 3'UTR α ENaC pouvait moduler la demi-vie de l'ARNm α ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires. Il existe plusieurs techniques de mesure de la demi-vie d'un ARNm. L'utilisation d'un inhibiteur de la transcription, tel que l'actinomycine D (Act. D), est la technique la plus courante. Par contre, nous avons démontré un impact de cette molécule sur la modulation de l'ARNm α ENaC suite à un traitement à la cycloheximide [Figure 30], nous empêchant de considérer cette technique pour nos travaux. Une technique « Pulse chase » a également été utilisée dans le cadre d'une

étude à grande échelle où l'on mesure la demi-vie de centaines d'ARNm à l'aide de puces à ADN. L'estimation de la demi-vie avec cette technique se fait de façon indirecte tel que discuté dans la section 1.6.2.1. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'opter pour le système d'induction Tet-Off.

Cette technique présente une simplicité d'utilisation permettant la mesure directe de la demi-vie d'un ARNm d'intérêt sans affecter le métabolisme entier de la cellule. Contrairement au système d'induction *c-fos*, le système Tet-Off présente également une absence d'effets pléiotropiques, possiblement due à l'absence des séquences régulatrices procaryotes dans les cellules eucaryotes (Harkin et al., 1999). Pendant longtemps, le très faible taux de transfection des cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire empêchait de considérer cette technique pour nos études. L'avènement du système d'électroporation à l'aide de pipette [Section 2.10] nous a permis d'obtenir une efficacité de transfection suffisante (25-30%) (Grzesik et al., 2013) pour nous permettre d'étudier la stabilité des ARNm α ENaC dans ces cellules avec le système Tet-Off.

Le système Tet-Off nécessite l'utilisation de la doxycycline afin d'inhiber la transcription du gène d'intérêt. Malgré son utilisation courante, la doxycycline peut avoir un impact significatif sur le métabolisme des cellules étudiées. En effet, l'utilisation de cet antibiotique sur des cellules bronchiques 16HBE14o- provoque un arrêt de la prolifération et une augmentation de la mortalité par apoptose (Sourdeval, Lemaire, Brenner, Boisvieux-Ulrich, & Marano, 2006). De plus, la doxycycline a déjà été impliquée dans la modulation de la réponse inflammatoire par les LPS (Moon, Gil, Gill, Chen, & Matute-Bello, 2012). La doxycycline peut être toxique à aussi peu que 0,2 μ g/ml dans certains types cellulaires (Ermak, Cancasci, & Davies, 2003). Pour ces raisons, nous avons testé quel était l'impact de la doxycycline sur l'expression de l'ARNm α ENaC. Un traitement avec de la doxycycline 1,0 μ g/mL sur une période de 24h n'a provoqué aucune modification de l'expression du transcrit α ENaC dans des cellules non transfectées [Figure 33]. Cette concentration est largement utilisée pour inhiber complètement la transcription du système Tet-Off et est recommandée pour un effet cytotoxique minimal (Hovel & Frieling, 1987). C'est la concentration que nous avons utilisée pour nos expériences puisqu'elle ne semble pas toxique pour nos cellules après 24h de traitement.

4.2.3.2. Détermination de la demi-vie de l'ARNm α ENaC avec le système Tet-Off

Suite à la mise au point de notre modèle, nous avons évalué la demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC à l'aide de la constante K obtenue à partir d'une courbe de dégradation. L'ARNm α ENaC exprimé à l'aide du système Tet-Off diffère de l'ARNm endogène. En effet, afin de pouvoir mesurer spécifiquement l'ARNm sous le contrôle du promoteur P_{Tight} , nous avons inséré la séquence de l'épitope V5 en 5' de l'ARNm pour amplifier spécifiquement ce transcrit par rapport au transcrit α ENaC endogène non modulé par la doxycycline. La deuxième spécificité provient de l'absence de la séquence 5'UTR α ENaC. En effet, l'ARNm V5- α ENaC ne comporte que le 3'UTR afin d'étudier spécifiquement l'impact de cette séquence dans la modulation de la stabilité. Il est important de se rappeler que, tel que discuté précédemment, le 5'UTR semble uniquement impliqué dans le contrôle traductionnel du transcrit α ENaC. L'évaluation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec le système Tet-Off nous a ainsi permis d'observer une demi-vie moyenne de 99 ± 15 min pour ce messager [Figure 34]. Cette valeur est nettement inférieure à celle obtenue dans la littérature pour les ARNm α ENaC et qui varie de 8 à 22h avec l'utilisation de l'Act. D [Tableau 4]. L'obtention d'une demi-vie aussi basse nous a porté à nous questionner sur la validité de notre système d'expression. Serait-il possible que notre système provoque une toxicité due à la présence trop importante du transcrit α ENaC dans la cellule? En effet, il a été suggéré qu'une concentration trop élevée d'ARNm pouvait être toxique pour la cellule et affecter son métabolisme. Ceci pourrait entraîner un changement de stabilité du transcrit concerné provoquant sa dégradation rapide afin d'éviter les effets toxiques d'une surexpression non physiologique (Houseley & Tollervey, 2009). Dans le cas de notre modèle Tet-Off, cette toxicité ne semble pas être présente, puisque les cellules transfectées présentent une morphologie similaire aux cellules saines non-transfectées. D'autres études montrent que le système Tet-Off est un système valable pour déterminer la demi-vie d'un ARNm. Tani *et al.* (Tani et al., 2012) ont trouvé que la demi-vie pour l'ARNm MALAT1 déterminé par Tet-Off était comparable à celle trouvée par une technique « Pulse chase », soit environ 7h comparé à l'estimation de la demi-vie en présence d'Act. D (12h). Ceci suggère que la demi-vie de l'ARNm α ENaC obtenue avec notre système Tet-Off ne serait pas toxique et que la demi-vie acquise par l'utilisation d'un inhibiteur de la transcription comme l'Act. D pourrait être surévaluée.

En outre, l'Act. D altère l'inhibition de la cycloheximide sur l'expression du transcrit α ENaC qui semble se développer principalement via une modulation de la stabilité. Pourtant, nous avons observé une chute de l'expression du transcrit de 50% après 4h suite au traitement des cellules épithéliales alvéolaires avec de la cycloheximide [Figure 17] par un mécanisme dépendant de la stabilité. Ces résultats suggèrent donc que l'Act. D pourrait avoir directement un impact sur la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC. Pour tester cette possibilité, nous avons mesuré la demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC avec la technique Tet-Off suite à un prétraitement de 30 min avec l'Act. D. Ce traitement a provoqué une stabilisation importante du transcrit V5- α ENaC [Figure 35]. En effet, la demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC obtenue avec un traitement avec l'Act. D correspondait à une valeur approximative de 4,7h. Celle-ci était nettement supérieure à la valeur sans traitement, suggérant que l'Act. D pourrait modifier la stabilité de l'ARNm α ENaC. Cette caractéristique de l'Act. D a été rapportée à plusieurs reprises. La dégradation rapide de l'ARNm *c-fos* provoquée par le motif ARE présent sur son 3'UTR est spécifiquement inhibée par l'Act. D et le DRB (Chen, Xu, & Shyu, 1995). Scocca *et al.* ont également démontré que l'Act. D stabilisait l'ARNm β 4-galactosyltransferase-1 avec une demi-vie de 13,5h par rapport à une valeur de 84min avec le système Tet-Off (Scocca, Charron, Shaper, & Shaper, 2003). La relocalisation des protéines liant l'ARN, observée chez des protistes parasites, suite au traitement à l'Act. D pourrait être une explication au phénomène de stabilisation observé (Nazer & Sanchez, 2011). En effet, cette relocalisation pourrait avoir un impact direct sur la stabilité de certains ARNm. Une seconde hypothèse serait la stabilisation globale des ARNm en réponse à l'inhibition de la transcription. Suite au traitement à l'Act.D, une accumulation d'ARNm avec une queue polyadénylée a été observée après 24h de traitement dans *Trypanosoma cruzi* (Nazer, Verdun, & Sanchez, 2011).

En résumé, ces résultats suggèrent que la demi-vie de l'ARNm α ENaC est surévaluée dans la littérature suite à un effet stabilisateur de l'Act. D. Le système Tet-Off que nous avons développé serait donc un outil approprié pour évaluer la demi-vie réelle et les mécanismes de modulation du transcrit α ENaC.

4.2.3.3. Modulation de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC par différents stress

Nous avons décidé d'utiliser le modèle Tet-Off pour tester si différents agents stressants pour la cellule pouvaient moduler la stabilité de l'ARNm α ENaC. Tel que suggéré dans la section 4.1 avec les chimères luciférase, le traitement à la cycloheximide a démontré une inhibition de la stabilité contrairement au traitement aux LPS avec des demi-vies respectives de 36 ± 4 min et 85 ± 8 min [Figure 36]. L'absence de modulation de la stabilité par les LPS fut également observée dans les cellules épithéliales rénales (de Seigneux et al., 2008). La modulation de la stabilité de l'ARNm par la cycloheximide indépendamment de son action sur la synthèse protéique a déjà été recensée. Ainsi la cycloheximide stabilise l'ARNm ICAM-1 dans plusieurs types cellulaires suite à l'activation de sérine/thréonine kinases (Ohh & Takei, 1995).

Le traitement au TNF- α a également provoqué une chute de la stabilité de l'ARNm V5- α ENaC avec une demi-vie chutant à seulement 16 ± 2 min [Figure 36C-D]. Ceci concorde avec des résultats antérieurs dans les cellules épithéliales alvéolaires où la technique de l'actinomycine D fut utilisée (Dagenais et al., 2004). La courte demi-vie du transcrit V5- α ENaC en présence de la cytokine suggère une modulation beaucoup plus précoce de sa stabilité contrairement à ce qui a été observé par notre groupe dans le passé. Cette disparité pourrait être expliquée par les protocoles expérimentaux utilisés [Figure 52]. En effet, pour les expériences avec le système Tet-Off nous avons traité les cellules 5h avec le TNF avant de traiter à la doxycycline. Contrairement à 16h de TNF lorsque nous avons utilisé l'Act. D précédemment. Parallèlement, le TNF- α a inhibé significativement l'activité transcriptionnelle du promoteur α ENaC après 24h [Annexe Figure 9], à un niveau insuffisant pour expliquer la chute de son transcrit après seulement 4h (Dagenais et al., 2006). Ces résultats nous amènent à suggérer un mécanisme de modulation en deux phases pour le TNF- α . En phase aiguë, le TNF- α pourrait rapidement déstabiliser l'ARNm α ENaC. En condition chronique, suite à une stabilisation de l'ARNm α ENaC, tel qu'observée dans la figure 36C, le TNF- α pourrait inhiber l'activité du promoteur α ENaC.

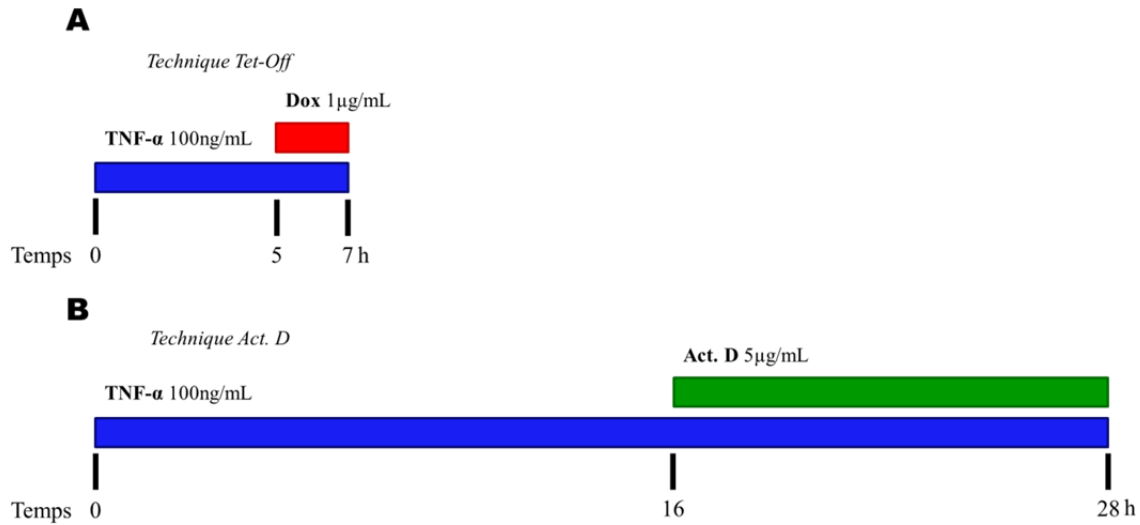


Figure 52. Techniques de mesure de la stabilité de l'ARNm αENaC suite au traitement au TNF- α .

(A) Les cellules sont traitées au TNF- α durant 5h suivi d'un traitement à la doxycycline durant 2h pour la mesure de la demi-vie. (B) Les cellules sont traitées au TNF- α durant 16h suivi d'un traitement à l'actinomycine D durant 12h pour la mesure de la demi-vie.

Les valeurs de demi-vies obtenues avec notre modèle Tet-Off suggèrent que l'ARNm αENaC pourrait être plus sensible à une variation de sa stabilité contrairement à ce qui a été observé à ce jour. En effet, le peu d'articles mentionnant une modulation post-transcriptionnelle de l'ARNm αENaC observée dans la littérature pourrait en réalité être causé par les effets de l'Act. D. Nous suggérons que notre modèle pourrait détecter des variations plus subtiles dans la demi-vie de l'ARNm αENaC qui seraient impossibles à observer avec un inhibiteur de la transcription, particulièrement dans les cas d'augmentation de l'expression de l'ARNm αENaC . Par exemple, l'AMPc induit une modulation du niveau d'expression de l'ARNm αENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires malgré une incapacité à stimuler le promoteur αENaC (Dagenais et al., 2001b). La mesure de la demi-vie par l'Act. D a suggéré l'absence de modulation de la stabilité par l'AMPc. Il serait intéressant de vérifier avec le système Tet-Off si l'AMPc a un effet stabilisateur sur l'ARNm αENaC .

4.2.4. Caractérisation de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC

Notre modèle Tet-Off suggère que le 3'UTR α ENaC serait impliqué dans la modulation de la stabilité du transcrit. Le 3'UTR peut présenter des structures très conservées dans l'évolution pouvant révéler des séquences consensus. Celles-ci sont généralement des séquences régulatrices qui peuvent contrôler la stabilité d'un ARNm ou sa traduction. L'analyse du 3'UTR du transcrit α ENaC de différentes espèces a démontré la présence de trois séquences consensus qui ont été conservées [Figure 37]. Ces séquences présentent toutes des structures en épingle à cheveux avec des éléments connus pour moduler l'ARNm. En effet, les séquences consensus #1 et #3 présentent des motifs riches en guanosine et uridine (« GU-riche »). Ces éléments sont connus pour induire la dégradation des ARNm qui en contiennent (Vlasova-St Louis & Bohjanen, 2011) (Vlasova et al., 2008). La séquence consensus #2 possède une région riche en cytosine et uridine (« CU-riche »). À l'opposé des séquences « GU-riche », la séquence « CU-riche » serait importante pour la stabilisation d'ARNm. Par exemple, le 3'UTR de l'ARNm eNOS arbore des séquences « CU-riche » similaires à celles présentes dans le 3'UTR α ENaC. Ces séquences sont importantes dans la modulation de la stabilité de l'ARNm eNOS par la protéine hnRNP E1 (Ho et al., 2013; Lai, Mohamed, Monge, & Stewart, 2003). Ainsi, la présence de ces séquences consensus dans le 3'UTR α ENaC suggère un rôle de celles-ci dans la modulation de la stabilité du transcrit α ENaC. Notre recherche des séquences consensus conservées entre différentes espèces nous a permis de poser la question générale suivante; est-ce que le 3'UTR α ENaC possède des séquences qui ont été conservées par sélection naturelle entre les espèces? Dans notre cas, la réponse est oui, par contre nous pouvons supposer qu'il existe aussi des séquences dans le 3'UTR α ENaC qui modulent la stabilité de l'ARNm d'une façon spécifique à une espèce. De telles séquences ne pourraient pas être identifiées par notre approche.

Pour étudier le rôle de différentes portions du 3'UTR dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC, nous avons développé une série de mutants de délétion des régions 3'UTR permettant d'enlever de façon séquentielle toutes les séquences consensus identifiées [Figure 38]. La demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC a été déterminée avec le système Tet-Off pour chacun des mutants [Figure 42]. L'augmentation significative de la demi-vie à 203 ± 42 min suite à la délétion de la région 1 suggère un rôle de déstabilisation de l'ARNm α ENaC

pour celle-ci [Figure 39]. À l'instar du mutant de délétion 1, le retrait de la seconde région a également entraîné une augmentation de la demi-vie à 301 ± 43 min [Figure 40]. Par contre, cette augmentation ne fut pas suffisamment élevée pour l'attribuer à la suppression de la seconde région elle-même. Cela suggérerait que la modulation de la stabilité du mutant de délétion 2 pourrait provenir de l'effet initial causé par le retrait de la région 1. Finalement, le mutant de délétion 3 a présenté une chute radicale de la demi-vie de l'ARNm V5- α ENaC passant de 301min (~ 5 h) à seulement 47 ± 12 min [Figure 41]. Ce résultat suggérerait que la région 3 possède une fonction stabilisatrice dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC.

Les résultats des différents mutants de délétion des régions du 3'UTR α ENaC suggèrent la présence de régions stabilisatrices et déstabilisatrices dans le 3'UTR α ENaC. Ces régions pourraient être en compétition dans la modulation de l'ARNm α ENaC compte tenu de l'effet stabilisateur global du 3'UTR tel qu'observé avec les chimères luciférase. La modulation de l'expression génique par le 3'UTR d'un ARNm est un mécanisme régulateur important où des mutations dans cette région peuvent causer différentes pathologies, telles que la dystrophie myotonique, le neuroblastome et la α -thalassémie (Conne, Stutz, & Vassalli, 2000). Nos expériences montrent que le 3'UTR α ENaC joue un rôle important dans l'expression post-transcriptionnelle de l'ARNm α ENaC. La présence conjointe de régions stabilisatrices et déstabilisatrices dans le 3'UTR α ENaC est comparable au 3'UTR de l'ARNm CDK5R1 où elles peuvent conférer une modulation très fine de l'expression de l'ARNm (Moncini et al., 2007). Dans le cadre de condition pro-inflammatoire comme le TNF- α , nous pouvons observer une réponse rapide de la cellule qui inhibe fortement la stabilité de l'ARNm α ENaC, suivi d'une période de stabilisation à plus long terme. La présence des différentes régions sur le 3'UTR α ENaC peut être responsables de cette réponse biphasique en interagissant avec différents facteurs *trans* qui sont recrutés en fonction de l'état de la cellule.

Les séquences consensus identifiées pourraient être directement impliquées dans cette modulation fine de la stabilité du transcrit α ENaC. Par contre, les mutants de délétion n'excluent pas la possibilité que d'autres séquences du 3'UTR puissent jouer un rôle dans la modulation de l'ARNm α ENaC. Certaines de ces séquences pourraient avoir été enlevées en même temps que les séquences conservées déjà identifiées. De plus, d'autres régions modulatrices pourraient également être découvertes dans la partie proximale que nous n'avons

pas encore étudiée. Une mutagenèse dirigée par PCR pour les séquences consensus identifiées aurait pu permettre d'étudier spécifiquement le rôle de celles-ci dans la modulation de la stabilité du transcrite α ENaC. Cette approche avait été envisagée et plusieurs tentatives de clonage se sont avérées vaines. En effet, pour des raisons inconnues, il nous fut impossible d'obtenir des clones exprimant des mutants spécifiques aux séquences consensus. Une autre approche qui aurait été intéressante dans l'étude des différentes régions du 3'UTR α ENaC est l'utilisation d'autres chimères luciférase. Nous aurions pu développer plusieurs chimères luciférase composées de courtes séquences du 3'UTR α ENaC afin d'identifier le rôle distinct pour chacune d'entre elles.

Les résultats présentés avec le système Tet-Off peuvent se comparer avec le modèle de chimères luciférase-3'UTR α ENaC discuté précédemment. Nous avons montré que l'absence d'une large région du 3'UTR α ENaC dans l'ARNm de la chimère luciférase-3'UTR α ENaC provoque une chute de 60% du niveau du transcrite comparé à la chimère luciférase avec un 3'UTR α ENaC complet [Figure 32B]. En comparaison, l'ARNm V5- α ENaC avec la délétion 3 correspondant à la même région tronquée que la chimère luciférase-3'UTR α ENaC a présenté une baisse de 53% de sa demi-vie comparé au transcrite V5- α ENaC avec un 3'UTR complet. Ces chutes similaires suggèrent que les séquences du 3'UTR en soi en dehors du contexte de l'ARNm α ENaC semblent responsables de la modulation de la stabilité de l'ARNm observée dans le cadre de ces deux modèles expérimentaux. Les structures secondaires d'un ARNm permet le recrutement de facteurs *trans* qui peuvent moduler la stabilité du transcrite. Cette caractéristique est généralement dépendante de la séquence d'un ARNm incluant sa séquence codante. Nous nous attendons donc à ce que les structures secondaires retrouvées dans la chimère luciférase-3'UTR α ENaC soient différentes de celles du messager V5- α ENaC. Par conséquent, nos résultats montrent que le 3'UTR α ENaC contient toute l'information pour moduler la stabilité de l'ARNm sans la nécessité des séquences codantes α ENaC et de la modulation complexe des structures secondaires de l'ARN.

Par contre, nous devons également envisager la possibilité que les effets sur la demi-vie observés pour les différents mutants de délétion puissent être causés par une modification des structures secondaires conséquemment aux différentes délétions effectuées.

Les résultats avec les chimères luciférase-3'UTR α ENaC suggèrent que la région codante de l'ARNm α ENaC n'aurait pas d'impact sur la modulation de la stabilité par le

3'UTR. Conséquemment, les structures secondaires pouvant être des facteurs importants dans la modulation de la stabilité devraient se retrouver dans le 3'UTR. Ces structures secondaires peuvent avoir un impact significatif dans l'interaction de l'ARN avec des protéines liant l'ARN en absence d'autres paramètres (Li, Quon, Lipshitz, & Morris, 2010). Il y a plusieurs régions identifiées dans les 3'UTR qui ont un effet sur la stabilité de l'ARNm. La délétion de certaines régions pourrait avoir un impact sur les microstructures de certains facteurs *cis* retrouvés dans le 3'UTR α ENaC, tel que les structures tige-boucle qui peuvent avoir un rôle important dans le recrutement de protéines liant l'ARN.

Une synthèse des résultats de cette thèse et de résultats antérieurs dans notre laboratoire permet d'apprécier la complexité de la modulation post-transcriptionnelle de l'ARNm α ENaC par son 3'UTR [Figure 53]. Dans le cadre de condition pro-inflammatoire ou de stress cellulaire, la demi-vie de l'ARNm α ENaC serait rapidement diminuée par des facteurs *trans* déstabilisateurs. Cette hypothèse est supportée par l'effet stabilisateur de l'Act. D sur l'ARNm α ENaC et sa capacité à bloquer l'effet déstabilisateur de la cycloheximide [Figure 30] et de la cytokine TNF- α (Dagenais et al., 2004) sur le transcrit. L'Act. D entraînerait l'arrêt de la transcription de facteurs *trans* déstabilisateurs, tel que les miARNs et les protéines liant l'ARN de faible demi-vie. Il serait donc intéressant de tenter d'identifier des miARNs qui pourraient être impliqués dans la modulation de l'ARNm α ENaC.

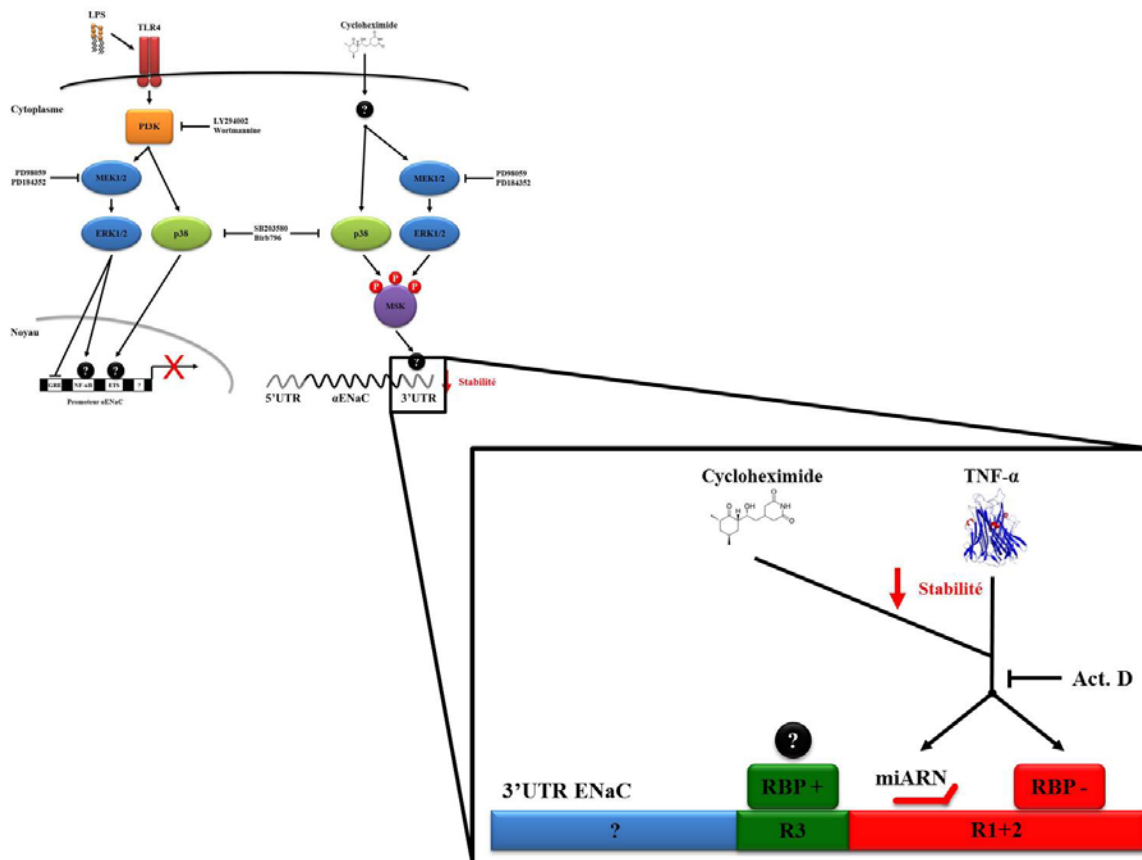


Figure 53. Modèle proposé pour la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par la cycloheximide et le TNF- α .

Le 3'UTR α ENaC présente des régions stabilisatrices (vert) et déstabilisatrices (rouge). La cycloheximide et le TNF- α inhibent la stabilité de l'ARNm α ENaC possiblement via ces régions. Ces molécules pourraient bloquer l'effet de RBP stabilisatrices et recruter des facteurs *trans* déstabilisateurs pour l'ARNm α ENaC entraînant sa dégradation. L'Act. D bloque l'effet de la cycloheximide et du TNF- α suggérant l'implication de miARNs et de protéines liant l'ARN de faible demi-vie.

Une caractéristique intéressante a été observée lors de la mesure de la demi-vie des différents ARNm V5- α ENaC avec le système Tet-Off, particulièrement dans les expériences présentant une courte demi-vie [Figure 34, 36A; C et 41]. Dans tous les cas, suite à la dégradation rapide de l'ARNm, nous avons observé un phénomène de plateau où le niveau d'ARNm V5- α ENaC se stabilise. Ce phénomène est particulièrement visible avec la courbe de dégradation de l'ARNm α ENaC suite au traitement au TNF- α (Figure 36C). Différentes hypothèses pourraient expliquer la présence de ce plateau. Celui-ci pourrait provenir d'un niveau d'expression basal non inhibé par la doxycycline dans le système Tet-Off. Ce phénomène a déjà été observé dans la première génération du système d'induction Tet-Off/On (Yoshida & Hamada, 1997). Cependant, cette hypothèse semble peu probable, compte tenu du niveau d'expression d'ARNm V5- α ENaC observé après 8h de traitement à la doxycycline [Annexe Figure 10]. En effet, on observe un niveau d'expression basal de seulement 10% suite à l'inhibition de la transcription par la doxycycline contrairement aux différents plateaux observés où les niveaux d'expression du transcrit V5- α ENaC varient plutôt entre 30 et 50% comparés aux conditions contrôles. De plus, la présence d'un plateau d'ARN non dégradé est également observée dans le niveau d'ARNm α ENaC endogène suite à un traitement à la cycloheximide, suggérant que la présence de ce plateau est un phénomène biologique indépendant du système Tet-Off [Figure 17]. La présence de ce plateau pourrait s'expliquer par la présence de deux populations distinctes d'ARNm α ENaC. La première population serait sensible à une modulation rapide de la stabilité comme celle induite par le TNF- α , alors que la deuxième population pourrait être protégée de cette dégradation pour permettre de conserver un pool d'ARNm rapidement mobilisable dans la cellule. Compte tenu des connaissances actuelles, nous pensons que l'ARNm α ENaC pourrait se partager entre deux types de compartiments cytoplasmiques, soit les granules de stress (SG) et les « Processing Bodies » (PB) [Figure 54] en fonction de l'état cellulaire.

Les SG sont des structures cytoplasmiques qui se forment suite à différents stress environnementaux (Anderson & Kedersha, 2006). Elles se forment suite à l'arrêt de la traduction et à une agrégation de différents facteurs. Ils peuvent être considérés comme une forme d'entrepôt pour les ARNm en attente de la reprise de la traduction. Ceux-ci sont composés du complexe ribosomal de pré-initiation 48S, de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction (eIF3, eIF4A, eIF4E, eIF4G), de la protéine PABP. Les SG contiennent également

différentes protéines liant l'ARN qui régulent la traduction, mais également la dégradation d'ARNm (Kedersha & Anderson, 2002b; Kimball, Horetsky, Ron, Jefferson, & Harding, 2003). Les PB, quant à eux, sont des « foyers » cytoplasmiques principalement impliqués dans la dégradation de l'ARNm. On y retrouve la machinerie impliquée dans la dégradation 5' – 3' (Xrn1), la dégradation non-sens et le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) (Kulkarni, Ozgur, & Stoecklin, 2010a). Les composants des SG et PB sont en équilibre dynamique avec les polysomes, permettant un déplacement rapide entre l'état traductionnel actif, l'entreposage et la dégradation des ARNm (Balagopal & Parker, 2009; Wilkinson & Shyu, 2001). En effet, les SG et PB peuvent être stimulés indépendamment les uns des autres, mais également s'associer physiquement afin d'échanger leur contenu (Wilczynska, Aigueperse, Kress, Dautry, & Weil, 2005). Par exemple, les ARNm présents dans les PB ne sont pas tous dégradés, puisque ceux-ci peuvent quitter les PB et reprendre le processus traductionnel (Bregues, Teixeira, & Parker, 2005).

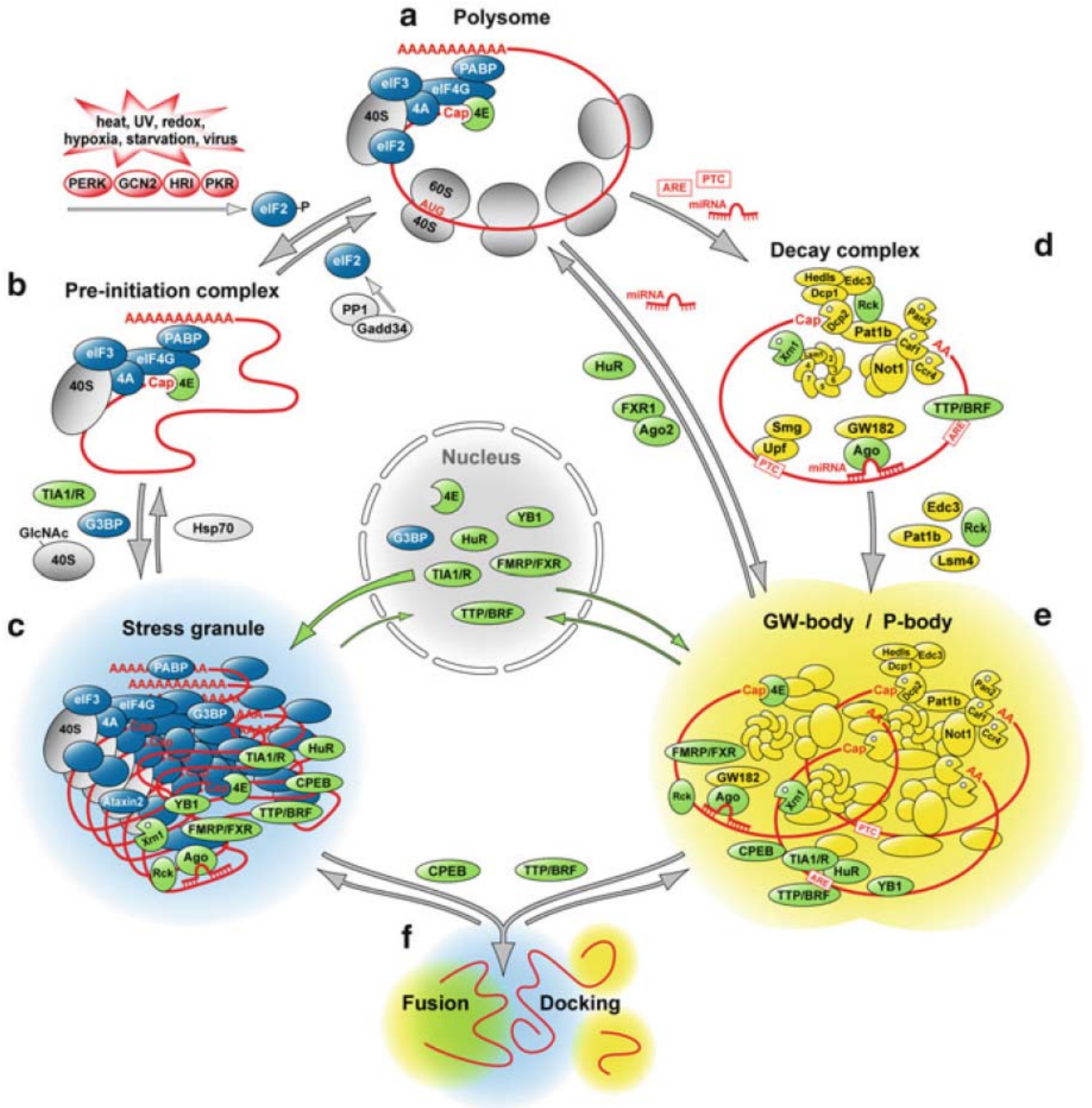


Figure 54. Représentation de complexes ribonucléoprotéiques permettant la formation de granules de stress et de « Processing bodies ».

(a) Les ARNm sont activement traduits dans les polysomes. (b) En condition de stress, la traduction est inhibée suite à la phosphorylation de eIF2 par différentes kinases. En conséquence, les polysomes se désassemblent et les complexes de pré-initiation s'accumulent. (c) Des protéines liant l'ARN, telles que TIA1, TIAL1 et G3BP, favorisent la formation des complexes de pré-initiation en granules de stress cytoplasmiques. (d) Les ARNm sont spécifiquement dégradés s'ils possèdent des codons de terminaison précoces, s'ils sont associés avec des miARNs ou s'ils possèdent des séquences de dégradation, telles que la séquence « AU-riche ». (e) Les ARNm ciblés pour la dégradation s'associe avec les protéines de l'exosome et forment les P-bodies. (f) Les P-bodies peuvent interagir avec les granules de stress et échanger leur contenu selon les conditions rencontrées par la cellule. Les protéines retrouvées dans les granules de stress sont présentées en bleu, les protéines spécifiques aux P-bodies en jaune et les protéines qui peuvent être localisées dans les deux compartiments sont représentées en vert (Stoecklin & Kedersha, 2013).

Ainsi, le métabolisme des différents ARNm peut être modulé via un remodelage actif de ces granules cytoplasmiques en fonction des conditions biologiques. La nature de la courbe de dégradation de l'ARNm α ENaC suggère qu'une population d'ARNm α ENaC pourrait être rapidement dégradée (exemple en présence de TNF- α) dans les PB, alors qu'un second pool d'ARNm α ENaC pourrait être protégé dans les SG dans l'attente d'une reprise de la traduction. Par exemple, dans les cellules YAMC, le TNF- α induit la production de SG provoquant l'arrêt de la traduction de l'ARNm Hsp70 via le recrutement de la protéine TIA1 qui se fixe sur le 3'UTR Hsp70 (Hu, Claud, Musch, & Chang, 2010). Un moyen efficace d'évaluer cette hypothèse suite au traitement au TNF- α serait d'effectuer une technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) pour l'ARNm α ENaC conjointement à une technique d'immunofluorescence pour des protéines identifiées dans les SG, telles que TIA1 et RCK (Kedersha & Anderson, 2007).

4.2.5. Conclusion

Les résultats de ce sous-chapitre nous ont permis de mieux apprécier le rôle de la région 3' non traduite dans la modulation de l'ARNm α ENaC. L'utilisation de chimères luciférase couplées au 3'UTR α ENaC a suggéré un rôle stabilisateur de ce dernier dans la modulation de l'ARNm. Le 3'UTR en absence de la région codante α ENaC était également capable à lui seul de moduler la stabilité d'un ARNm. Pour mieux étudier cette question, nous avons développé un modèle Tet-Off nous permettant de mesurer la demi-vie de l'ARNm

α ENaC indépendamment de l'utilisation d'un inhibiteur de la transcription comme l'Act. D. Grâce à cette technique, nous avons établi que la demi-vie de l'ARNm α ENaC était environ de 100min dans les cellules épithéliales alvéolaires, un temps beaucoup plus court que ce que nous avons trouvé précédemment en traitant les cellules à l'Act. D (Dagenais et al., 2004). Nos résultats montrent que l'Act. D a un effet stabilisateur important sur l'ARNm α ENaC et qu'il ne peut être utilisé pour évaluer la stabilité du transcrit. Le système Tet-Off nous a permis d'approfondir comment la stabilité de l'ARNm α ENaC était affectée par différents stress. À l'instar de la cycloheximide, la fonction inhibitrice de la cytokine TNF- α sur la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC a été confirmée de même que l'absence de modulation de la stabilité par les LPS. Finalement, nous avons entrepris de cartographier avec des mutants de délétion quelles portions du 3'UTR jouaient un rôle dans la modulation de la stabilité du transcrit. Nous avons trouvé que la région proximale du 3'UTR confère de la stabilité au transcrit, alors que la région distale semble jouer un rôle déstabilisateur sur l'ARNm α ENaC.

4.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

4.3.1. Rationnelle

La caractérisation de la région 3' non traduite de l'ARNm α ENaC nous a permis d'identifier des régions consensus (CU et GU riches) conservées entre différentes espèces pouvant être impliquées potentiellement dans la modulation de la stabilité du transcrit. Ces séquences *cis* pourraient en théorie être la cible de miARNs permettant la dégradation de l'ARNm ou pourraient être des motifs de liaison pour des facteurs *trans* tels que les protéines liant l'ARN. Nos recherches en bio-informatique nous ont permis de trouver une seule séquence conservée spécifique pour un miARN (rno-miR-325-3p) situé dans la partie très distale du 3'UTR α ENaC. Nos travaux avec nos différents mutants de délétion du 3'UTR α ENaC montrent que la modulation de la stabilité est complexe et implique un équilibre entre des séquences stabilisatrices et des séquences déstabilisatrices. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés aux protéines pouvant lier le 3'UTR de l'ARNm α ENaC puisque ces

protéines sont connues pour jouer un rôle important dans les modifications post-transcriptionnelles affectant la stabilité d'un ARNm (Jacobson & Peltz, 1996).

4.3.2. Identification des protéines liant le 3'UTR de l'ARNm α ENaC

Afin d'identifier les protéines pouvant interagir avec le 3'UTR du transcrit α ENaC, nous avons utilisé une technique de chromatographie d'affinité pour enrichir et identifier les protéines s'attachant à l'ARN pouvant se lier à cette séquence dans les cellules épithéliales alvéolaires. L'enrichissement des protéines obtenues à partir du 3'UTR α ENaC biotinylé a révélé la présence de quatre bandes spécifiques avec des poids moléculaires de 100, 68, 59 et 40kDa [Figure 43]. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier les bandes comme étant les protéines DHX36, PABP1, hnRNP K et Tial1 [Figure 44]. La spécificité de ces protéines pour le 3'UTR α ENaC a ensuite été confirmée par immunobuvardage de type Western [Figure 45]. Malgré leur possible rôle dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC, nous demeurons conscients que la technique de chromatographie d'affinité peut également permettre la capture de protéines de faible affinité pour le 3'UTR α ENaC qui n'interagissent peut-être pas directement avec celui-ci. En effet, leur enrichissement pourrait être causé par des contacts protéine-protéine avec d'autres candidats, ou par des protéines se liant à l'ARN de façon non-séquence spécifique. Pour tester ces hypothèses et déterminer la spécificité de l'attachement par rapport aux ARNm α ENaC, nous avons effectué une chromatographie inverse avec une protéine chimérique GST-hnRNP K. Avec cette technique, nous avons pu observer un enrichissement de l'ARNm α ENaC [Figure 46]. Ce résultat valide la chromatographie d'affinité avec le 3'UTR pour hnRNP K et suggère que l'enrichissement de cette protéine ne dépendrait pas d'une liaison protéine-protéine, mais plutôt d'un attachement spécifique de celle-ci avec le 3'UTR α ENaC. À nouveau l'interaction observée par la technique inverse a été faite dans un environnement *in vitro* qui pourrait ne pas représenter la situation réelle observée dans une cellule. Idéalement, il aurait été pertinent d'effectuer une immunoprécipitation d'ARN afin de conserver les conditions physiologiques. Cependant, des difficultés techniques au niveau de l'immunoprécipitation des candidats nous ont empêchés de développer cette approche dans les cellules épithéliales alvéolaires. En effet, les anticorps utilisés n'ont pas résulté en l'immunoprécipitation des protéines d'intérêt.

4.3.3. Modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

La chromatographie d'affinité n'est pas une technique très spécifique compte tenu de la nature *in vitro* de l'expérience. Par contre, elle peut s'avérer utile pour identifier des candidats potentiels dans la modulation de la stabilité d'ARNm (Magdeldin, 2012), particulièrement si cette technique est couplée avec la spectrométrie de masse. De façon intéressante, les candidats protéiques identifiés précédemment possèdent tous des sites d'interaction avec l'ARN, soit un « RHAU-specific motif » (RSM) pour DHX36 (Lattmann, Giri, Vaughn, Akman, & Nagamine, 2010), quatre « RNA recognition motifs » (RRM) pour PABP1 (Melo, Dhalia, Martins de Sa, Standart, & de Melo Neto, 2003), trois domaines d'homologie K (KH) pour hnRNP K (Kim, Hahm, Kim, Choi, & Jang, 2000) et deux RRM pour Tial1 (Kim et al., 2013). Par conséquent, nous avons étudié l'implication de ces protéines dans la modulation de l'ARNm α ENaC.

De prime abord, nous avons exclu de notre étude PABP 1, car cette protéine est connue pour principalement moduler la stabilité des ARNm via son interaction avec la queue polyadénylée (Eliseeva et al., 2013). Dans le futur, il pourrait tout de même être intéressant d'étudier le rôle de PABP1 dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC, car cette protéine est également connue pour moduler la stabilité d'un ARNm par des interactions poly(A)-indépendantes. En effet, la protéine PABP1 provenant de lysats cytoplasmiques de cellules NIH 3T3 peut lier des séquences ARE avec une grande affinité (Sladic, Lagnado, Bagley, & Goodall, 2004). Par ailleurs, PABP module spécifiquement la stabilité de différents ARNm qui possèdent des séquences ARE via leur 3'UTR (Bollig et al., 2003; Casper et al., 2013; Vazquez-Pianzola, Urlaub, & Suter, 2011).

Afin d'étudier le rôle des protéines identifiées, nous avons surexprimé celles-ci par transfection transitoire dans les cellules épithéliales alvéolaires [Figure 47]. Pour chacune des protéines testées, la surexpression a provoqué une réduction du niveau d'ARNm α ENaC total [Figure 48]. Ces résultats suggèrent un rôle important de ces protéines dans la modulation de l'expression du transcrit. Afin d'identifier par quels mécanismes ces RBP pourraient moduler l'expression de l'ARNm α ENaC, l'activité du promoteur α ENaC et la modulation de la stabilité furent évaluées dans des cellules épithéliales alvéolaires surexprimant chacune de ces

protéines d'intérêt. De façon surprenante, la surexpression de hnRNP K a inhibé l'expression du transcrit α ENaC non pas en affectant la stabilité du transcrit, mais en diminuant l'activité du promoteur. Par contre, les protéines DHX36 et Tial1 ont inhibé l'expression de l'ARNm α ENaC par une réduction de sa stabilité [Figures 49 et 50].

4.3.3.1. hnRNP K

Les résultats obtenus pour la protéine hnRNP K sont surprenants à première vue, sachant qu'il s'agit de la protéine ayant présenté le plus d'enrichissement lors de la chromatographie d'affinité [Figure 44]. hnRNP K est impliquée dans la modulation de la stabilité d'ARNm via le 3'UTR présentant des séquences CURE. Par exemple, hnRNP K régule les ARNm de Cox-2 (Shanmugam, Reddy, & Natarajan, 2008) et de la Rénine (Persson, Skalweit, Mrowka, & Thiele, 2003). Pour cette raison, nous nous attendions à une modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC considérant la présence de séquences « CU-riches » dans son 3'UTR. Cependant, hnRNP K est une protéine multifonctionnelle dans la cellule (Bomsztyk, Denisenko, & Ostrowski, 2004). L'absence de modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par hnRNP K malgré son association avec son 3'UTR pourrait suggérer une modulation traductionnelle à l'instar d'autres transcrits associés avec cette protéine. En effet, hnRNP K est reconnue comme étant impliquée dans la modulation de la traduction de l'ARNm 15-lipoxygénase (Habelhah et al., 2001; Ostareck et al., 2001; Ostareck et al., 1997) et de l'ARNm L2 du virus du papillome humain (Collier, Goobar-Larsson, Sokolowski, & Schwartz, 1998). Sa surexpression dans les cellules THP-1 provoque une inhibition de la synthèse protéique des ARNm possédant des séquences CURE (Wang, Zhang, et al., 2006). Une seconde possibilité serait l'implication de hnRNP K dans le transport de l'ARNm α ENaC du noyau vers le cytoplasme. hnRNP K possède un domaine KNS (hnRNP K nuclear shuttling domain) lui conférant une capacité de transport bidirectionnel entre le noyau et le cytoplasme (Michael, Eder, & Dreyfuss, 1997). hnRNP K est principalement retrouvé dans le noyau de cellules HeLa. Sa phosphorylation par la MAPK ERK1/2 provoque sa migration du noyau vers le cytoplasme suite à une possible altération du domaine KNS (Habelhah et al., 2001). Cette migration dépendante de son état de phosphorylation peut être observée suite à un traitement au sérum (Habelhah et al., 2001), avec la protéine S100b (Shanmugam et al., 2008) et au monoxyde d'azote (NO) (Wang, Zhang, et al., 2006). En outre, hnRNP K possède

différents sites de phosphorylation (sérine, thréonine et tyrosine) (Barboro, Ferrari, & Balbi, 2014). Ces sites peuvent être phosphorylés par différentes kinases selon la nature du stress cellulaire (Ostrowski et al., 2000; Van Seuning, Ostrowski, & Bomsztyk, 1995), tel que la PKC δ , les MAPK ERK1/2 et JNK, c-Src (Iwasaki et al., 2008) et la caséine kinase (Mikula et al., 2006). Les propriétés de hnRNP K peuvent varier selon la nature de la phosphorylation. La modification par la MAPK ERK1/2 provoque une accumulation cytoplasmique (Habelhah et al., 2001). La kinase PKC δ affecte l'association de hnRNP K avec l'ARN (Sataranatarajan, Lee, Mariappan, & Feliers, 2008). La phosphorylation par la MAPK JNK module l'association de la RBP avec la machinerie traductionnelle (Hutchins & Szaro, 2013). Compte tenu de l'activation de différentes MAPK par les différents stress utilisés précédemment, il serait intéressant de vérifier si hnRNP K pourrait être phosphorylé dans les cellules épithéliales alvéolaires et d'identifier si cette protéine pourrait également jouer un rôle dans la modulation post-transcriptionnelle de l'ARNm α ENaC.

L'impact de la surexpression de hnRNP K sur l'inhibition de l'activité transcriptionnelle soulève des interrogations, puisque hnRNP K a été identifiée via un enrichissement avec le 3'UTR α ENaC sans égard au promoteur. Tel que mentionné auparavant, hnRNP K transite entre le noyau et le cytoplasme. La protéine hnRNP K peut moduler la transcription de façon indirecte, par exemple, en interagissant avec C/EBP α , cette protéine inhibe la transcription du gène AGP (Miau, Chang, Shen, Tsai, & Lee, 1998). De façon similaire, hnRNP K agit comme co-activateur avec le récepteur aux androgènes (RA) dans le noyau et accentue la transcription induite par le RA (Barboro, Borzi, Repaci, Ferrari, & Balbi, 2013). hnRNP K peut également s'associer à l'ADN et moduler directement l'activité transcriptionnelle d'un gène. Cette protéine inhibe la transcription du gène CD43 en liant directement une région monocaténaire de son promoteur (Da Silva, Bharti, & Shelley, 2002) et module négativement la transcription de Cox-2 dans les monocytes THP-1 (Shanmugam et al., 2008). La régulation transcriptionnelle par hnRNP K semble provenir d'une association avec des séquences riches en pyrimidines (« CT-riche »). En effet, on observe la présence de motifs « CT-riche » dans plusieurs promoteurs de gènes modulés par hnRNP K. Parmi ceux-ci, on retrouve c-Myc (Michelotti, Michelotti, Aronsohn, & Levens, 1996; Ostrowski, Kawata, Schullery, Denisenko, & Bomsztyk, 2003), l'ostéocalcine (Stains, Lecanda, Towler, & Civitelli, 2005), et SRC1A en inhibant le recrutement de la machinerie

transcriptionnelle (TBP et l'ARN polymérase II) (Ritchie et al., 2003). L'analyse du promoteur α ENaC montre la présence de motifs « CT-riche » similaires aux sites de liaison hnRNP K à l'ADN [Annexe Figure 11]. Il serait intéressant de faire une étude fonctionnelle du promoteur α ENaC afin d'évaluer l'importance de ces régions dans la modulation du promoteur α ENaC par hnRNP K.

Dans un contexte de surexpression, tel que nos conditions expérimentales, l'inhibition du promoteur α ENaC pourrait également être provoquée par un effet indirect. En effet, la surexpression de hnRNP K peut induire des changements importants dans le métabolisme cellulaire. Dans les cellules HeLa, sa surexpression provoque une initiation accrue de la traduction causée par une augmentation de la transcription du facteur eIF4E (Lynch et al., 2005). De plus, hnRNP K agit en co-activateur pour le facteur de transcription p53 qui permet la régulation de la réparation de l'ADN, la prolifération et la survie cellulaire (Moumen, Masterson, O'Connor, & Jackson, 2005). On ne peut donc pas rejeter la possibilité que l'inhibition de l'activité du promoteur α ENaC par hnRNP K soit indirecte via une altération de l'expression de divers facteurs de transcription.

4.3.3.2. DHX36

DHX36, également connu sous le nom de « RNA Helicase associated with AU-rich element » (RHAU), est une protéine encore méconnue dont la fonction biologique n'a été étudiée que récemment. DHX36 est essentielle au métabolisme cellulaire. En effet, l'utilisation d'un modèle « knock-out » murin a entraîné la mort embryonnaire et des problèmes dans le développement hématopoïétique (Lai et al., 2012). DHX36 est également important dans la réponse au stress où celle-ci régule l'immunité innée lors d'une infection virale facilitant la production d'interféron (Fullam & Schroder, 2013; Yoo et al., 2014). Les résultats obtenus suite à la surexpression de DHX36 dans les cellules épithéliales alvéolaires suggèrent une modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par celle-ci. Les ARN hélicases sont d'importants régulateurs de l'expression génique qui peuvent remodeler la structure secondaire des ARN et affecter les interactions ARN-protéines. De cette façon, elles peuvent réguler des modulations post-transcriptionnelles au niveau des ARNm, telles que la stabilité (Gregersen et al., 2014). L'action de DHX36 sur l'ARN s'effectue via une reconnaissance de G-quadruplex (G4). Les G4 sont des structures secondaires à quatre brins que peuvent adopter

des séquences nucléotidiques riches en guanine. DHX36 reconnaît les G4 via un domaine spécifique retrouvé dans sa région N-terminale, le « RHAU specific motif » (RSM) (Lattmann et al., 2010; Meier et al., 2013). Par exemple, DHX36 joue un rôle essentiel dans la dégradation de l'ARNm de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (Chalupnikova et al., 2008). DHX36 interagit directement avec le 3'UTR uPA et entraîne la dégradation du messenger subséquent à une déadénylation accrue du transcrit. La surexpression de DHX36 provoque une chute accrue de l'expression de l'ARNm uPA similairement à celle du transcrit α ENaC [Figure 48]. Son mécanisme d'action proviendrait du recrutement de l'exosome et de la « Poly(A)-specific ribonuclease » (PARN) (Tran, Schilling, Wirbelauer, Hess, & Nagamine, 2004). Par contre, la modulation d'un ARNm induite par DHX36 peut également être de nature indirecte. L'inhibition de l'expression de DHX36 via des ARN interférents entraîne une hausse de la stabilité de l'ARNm PITX1, ainsi qu'une augmentation importante de son expression protéique. La modulation de la traduction par DHX36 proviendrait d'une interaction avec une séquence ne présentant pas de structure G4 impliquant un mécanisme « miARN-dépendant » (Booy et al., 2014). Ainsi, DHX36 peut lier le 3'UTR PITX1 indépendamment des séquences G4 suggérant que l'interaction protéine-protéine pourrait également être un mécanisme important dans la modulation par cette hélicase. Il serait intéressant d'évaluer les régions du 3'UTR impliquées dans la modulation de l'ARNm α ENaC par DHX36. En effet, plusieurs G-quadruplex ont été retrouvés dans le 3'UTR α ENaC, dont trois seraient dans sa région proximale [Annexe Figure 12].

Contrairement à hnRNP K, la surexpression de DHX36 n'a pas affecté l'activité du promoteur α ENaC. Par contre, il est tout de même possible que DHX36 puisse lier les quadruplex d'ADN et réguler la transcription puisque la protéine est également retrouvée dans le noyau (Iwamoto, Stadler, Chalupnikova, Oakeley, & Nagamine, 2008). En fait, DHX36 fut initialement identifiée comme étant la protéine responsable de la majorité de l'activité résolvasse sur les structures G4 dans les cellules HeLa (Creacy et al., 2008; Giri et al., 2011). Les structures G4 dans les régions promotrices seraient considérées comme des éléments *cis* inhibiteurs de la transcription où l'activité résolvasse permettrait la levée de l'inhibition transcriptionnelle (Siddiqui-Jain, Grand, Bearss, & Hurley, 2002). DHX36 est impliquée dans un processus de régulation génique similaire. Celle-ci peut lier l'élément de réponse à MS-275, un inhibiteur des histones déacétylases (HDAC), au niveau du promoteur de la « tissue-

nonspecific alkaline phosphatase » TNAP. Cette interaction est essentielle pour l'induction de la transcription de TNAP par la molécule MS-275 (Kim et al., 2011). DHX36 peut également interagir avec d'autres régulateurs de la transcription, tels que p68, p72 et les HDACs (Iwamoto et al., 2008). Cependant, ce rôle dans la régulation transcriptionnelle ne semble pas impliqué dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC. Par contre, compte tenu de la nature non physiologique d'une surexpression de DHX36, on ne peut totalement ignorer la possibilité d'une modulation indirecte de la stabilité de l'ARNm α ENaC via la modulation d'autres gènes.

4.3.3.3. TIAL1

TIAL1, également nommé « T-cell-restricted intracellular antigen-related protein » (TIAR) est une protéine liant l'ARN. Elle a été initialement trouvée dans les lymphocytes T cytotoxiques et est exprimée dans plusieurs types cellulaires (Kawakami et al., 1992). La surexpression de TIAL1 dans les cellules épithéliales alvéolaires a provoqué une chute de la stabilité du transcrit α ENaC suggérant l'implication de cette protéine dans la modulation de l'ARNm α ENaC. TIAL1 démontre une affinité pour les ARNm présentant des séquences ARE et CURE dans leur 3'UTR (Ivanov, Kedersha, & Anderson, 2011; Kim et al., 2007; LaJevic, Koduvayur, Caffrey, Cohen, & Chambers, 2010). Des séquences semblables ont été retrouvées dans les séquences consensus #2 dans la région identifiée dans le 3'UTR α ENaC. TIAL1 est une protéine multifonctionnelle dans la modulation des ARNm. Cependant, le rôle principal de cette protéine dans la cellule n'est pas de moduler de façon directe la stabilité d'un ARNm. En effet, jusqu'à maintenant, Fechir *et al* sont les seuls à avoir démontré une modulation de la stabilité d'ARNm par TIAL1. Sa surexpression provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm iNOS possiblement via une interaction entre TIAL1 et le 3'UTR iNOS présentant un motif ARE (Fechir, Linker, Pautz, Hubrich, & Kleinert, 2005). TIAL1 est également impliquée dans l'épissage alternatif lorsqu'elle se retrouve dans le noyau (Kedersha, Ivanov, & Anderson, 2013). Par exemple, TIAL1 contrôle l'exclusion de l'exon 8 du pre-ARNm SIRT1 dans les cellules 293T en collaboration avec HuR (Zhao et al., 2014).

Le rôle principal de cette protéine serait la modulation de la traduction, un rôle intimement lié à la formation des granules de stress. (Ivanov et al., 2011). En effet, suite à un stress cellulaire, le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α est phosphorylé, initiant la

formation de granules de stress par TIAL1 et son partenaire TIA (Kedersha, Gupta, Li, Miller, & Anderson, 1999; Piecyk et al., 2000). Les protéines TIA et TIAL1 peuvent s'auto-agrégérer dans les cellules, favorisant la formation de foyers cytoplasmiques correspondant aux granules de stress (Gilks et al., 2004; Lopez de Silanes et al., 2005). C'est à l'intérieur de ces granules de stress que TIAL1 module la traduction de plusieurs ARNm. Un stress génotoxique entraîne une inhibition de la traduction de l'ARNm GADD45 α par TIAL1 en diminuant la disponibilité du transcrit dans les polysomes actifs (Lal et al., 2006). En condition hypoxique, TIAL1 induit également la formation de granules de stress et inhibe la synthèse protéique de l'ARNm HIF-1 α via le motif ARE dans son 3'UTR (Gottschald et al., 2010). Similairement, TIAL1 peut interagir avec l'ARNm Cox-2 au niveau de la séquence ARE et réduire sa traduction (Cok, Acton, & Morrison, 2003; Tong, Van Dross, Abu-Yousif, Morrison, & Pelling, 2007). À la lumière de ces observations, le rôle de TIAL1 dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC pourrait donc être de nature indirecte. En effet, TIAL1 pourrait recruter le transcrit α ENaC dans les granules de stress et/ou les P-bodies pouvant interagir ensemble (Stoecklin & Kedersha, 2013) et où l'ARNm α ENaC serait ensuite dégradé par des partenaires protéiques non identifiés. Différentes protéines liant l'ARN impliquées dans la dégradation de l'ARNm sont également retrouvées dans les granules de stress (Kedersha & Anderson, 2002a; Kedersha et al., 2005), dont la protéine DHX36 discutée précédemment (Chalupnikova et al., 2008). Les recherches de Delestienne *et al* supportent cette hypothèse. Ceux-ci ont démontré que TIAL1 pouvait recruter la protéine ASF/SF2 dans les granules de stress entraînant la déstabilisation d'ARNm présentant des séquences ARE (Delestienne et al., 2010).

Finalement, l'impact de TIAL1 sur la stabilité de l'ARNm α ENaC pourrait être une conséquence indirecte de la perturbation cellulaire causée par la surexpression de cette protéine. En effet, sa surexpression favorise la formation de granules de stress (Gilks et al., 2004). Similairement, la surexpression de CPEB1 et TTP, deux protéines liant l'ARN, provoque l'association de granules de stress avec les P-bodies favorisant ainsi la dégradation d'ARNm (Kedersha et al., 2005; Wilczynska et al., 2005). Ces conditions non physiologiques peuvent altérer les fonctions cellulaires en entraînant une redistribution des composants des P-bodies dans les granules de stress (Kulkarni, Ozgur, & Stoecklin, 2010b).

4.3.3.4. Collaboration des protéines liant l'ARN

La surexpression de DHX36 et TIAL1, deux protéines qui se lient au 3'UTR α ENaC a entraîné une chute d'environ 40 à 50% de l'expression du transcrite α ENaC. Est-ce que ces deux protéines pourraient jouer un rôle dans la modulation de α ENaC en condition pathophysiologique? Des résultats préliminaires suggèrent que l'expression protéique de DHX36 et TIAL1 est augmentée en condition inflammatoire suite à un traitement des cellules épithéliales alvéolaires au TNF- α (Annexe Figure 13), ce qui suggère que ces protéines pourraient être impliquées dans la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC.

Toutefois, l'inhibition de l'expression des ARNm α ENaC dans les cellules qui surexpriment DHX36 ou TIAL1 est plus petite que celle observée par un traitement à la cycloheximide. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que dans notre modèle, nous n'avons étudié que la surexpression d'une seule protéine à la fois. En effet, une interaction synergique avec plusieurs protéines est probablement nécessaire pour moduler de façon optimale la stabilité du messager α ENaC {Ho, 2014 #1117}. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de tester l'effet de la surexpression de ces protéines en utilisant les différents mutants de délétion du 3'UTR afin de cibler les régions impliquées dans la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par ces protéines. En outre, nous avons identifié les protéines DHX36 et TIAL1, mais il existe probablement d'autres protéines qui modulent la stabilité du transcrite α ENaC.

Finalement, tel que mentionné dans la section 4.3.1., la stabilité d'un ARNm peut également être modulée par d'autres facteurs trans, tels que les miARNs. La modulation de la stabilité du transcrite α ENaC pourrait donc impliquer une coopération entre l'action des miARNs et celle des protéines liant l'ARN que nous avons identifiées. Une telle coopération miRNA/RBP a été observée dans la modulation du transcrite TNF- α où miR-16 favorise le recrutement de la protéine TTP impliquée dans la dégradation du messager (Jing et al., 2005). Pour compléter notre étude, il serait intéressant d'identifier la nature des miARNs qui peuvent se lier à l'ARNm α ENaC afin d'évaluer l'impact possible de ceux-ci sur l'expression d'ENaC.

4.3.4. Conclusion

Les résultats obtenus dans cette section nous ont permis d'identifier différentes protéines liant le 3'UTR de l'ARNm α ENaC. Ces protéines modulent l'expression de l'ARNm selon différents mécanismes [Figure 55]. Malgré son association avec le 3'UTR, la surexpression de la protéine hnRNP K dans les cellules inhibe l'expression du transcrit α ENaC via une modulation de l'activité de son promoteur. À l'opposé, DHX36 et TIAL1 inhiberaient l'expression de l'ARNm α ENaC via une chute de sa stabilité. Les mécanismes impliqués dans ces modulations par les protéines identifiées demeurent inconnus. Cependant, des régions quadruplex et des séquences « CU-riches » connues pour lier respectivement DHX36 et TIAL1 se retrouvent dans les séquences du 3'UTR α ENaC.

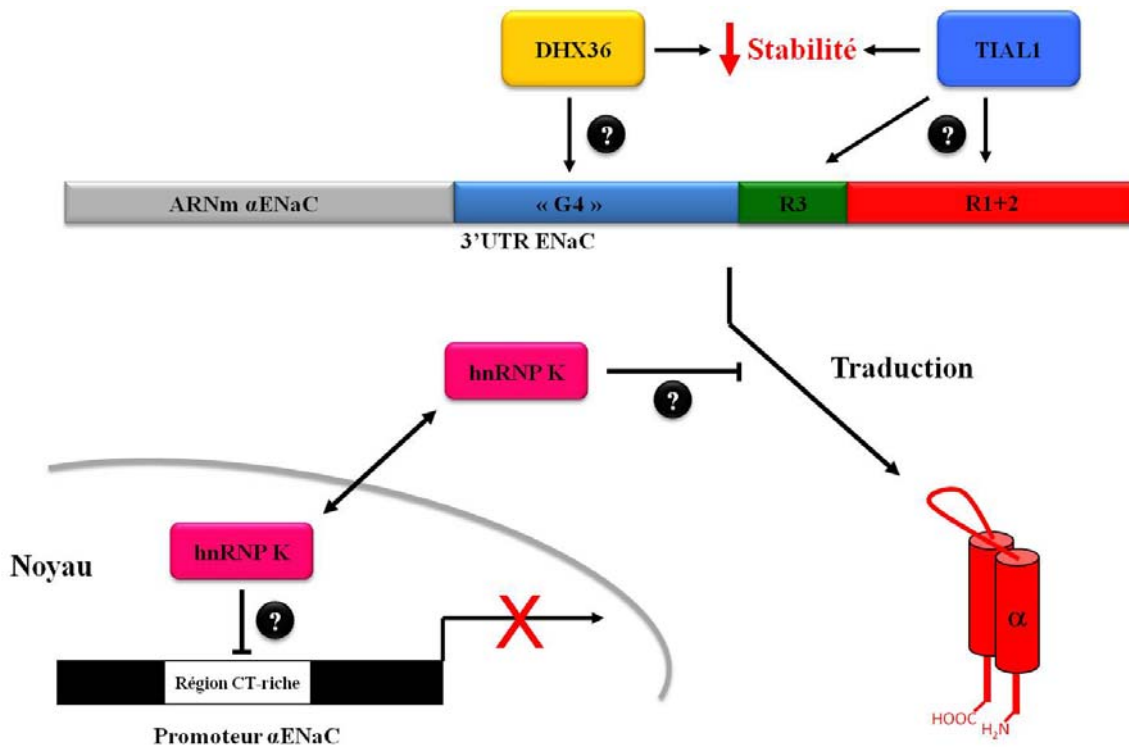


Figure 55. Modèle proposé pour la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

La protéine hnRNP K inhibe la transcription du gène α ENaC, possiblement via des régions riches en pyrimidines présentes dans le promoteur α ENaC. hnRNP K interagit également avec le 3'UTR α ENaC et pourrait moduler la traduction du transcrit sans affecter sa stabilité. DHX36 inhibe la stabilité de l'ARNm α ENaC possiblement via des régions G-quadruplex retrouvées dans son 3'UTR. À l'instar de DHX36, TIAL1 inhibe également la stabilité du transcrit α ENaC possiblement via son interaction avec des séquences « U-riches » et « CU-riches » présentes dans son 3'UTR.

Chapitre 5 : Conclusion et Perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse nous permettent de mieux apprécier la complexité de la modulation de l'ARNm α ENaC en condition inflammatoire. Néanmoins, il serait judicieux d'approfondir la modulation de la stabilité de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN. L'activation des voies de signalisation par la cycloheximide suggère l'implication de MAPK en aval. L'identification de ces voies de signalisation permettrait de mieux cibler les acteurs impliqués dans la stabilité de l'ARNm α ENaC et tester si ces voies de signalisation peuvent phosphoryler ou changer la localisation cellulaire des protéines liant l'ARN que nous avons identifiées.

Le développement du modèle Tet-Off pour mesurer la demi-vie de l'ARNm α ENaC remet en question les résultats observés jusqu'à ce jour lorsque la stabilité des transcrits est mesurée en présence d'actinomycine D et montre que la demi-vie du messager est beaucoup plus courte que ce que nous avons mesuré auparavant. De plus, ce système montre que des conditions pro-inflammatoires peuvent moduler à la baisse la stabilité du transcrit rappelant la chute rapide des transcrits ENaC observés lors d'une transplantation pulmonaire qui entraîne une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Sugita et al., 2003b). Ce modèle sera très utile pour étudier plus en détail les modulations post-transcriptionnelles du transcrit α ENaC sous différentes conditions. La caractérisation du 3'UTR α ENaC a également permis d'identifier différentes régions impliquées dans la stabilité de l'ARNm α ENaC et montré que le 3'UTR était impliqué aussi bien dans la stabilisation du messager que dans la déstabilisation de celui-ci. Une mutagenèse dirigée pourra être envisagée afin d'observer le rôle précis des différentes régions consensus identifiées pour permettre de mieux cartographier le rôle des différentes régions du 3'UTR dans la modulation de la stabilité du transcrit et identifier de nouveaux domaines susceptibles de moduler celle-ci. Il sera également intéressant de déterminer quelles régions du 3'UTR jouent un rôle dans la modulation à la baisse de l'ARNm α ENaC en condition pro-inflammatoire dans les poumons.

L'observation d'un plateau dans la dégradation des ARNm α ENaC suggère l'existence de différentes populations d'ARNm α ENaC. Un pool de messager serait susceptible d'être dégradé alors qu'un autre pool semble être protégé. La nature des protéines liant l'ARN détectées avec le 3'UTR α ENaC, ainsi que la littérature nous suggèrent que les ARNm α ENaC

pourraient être localisés dans les granules de stress et les P-bodies. C'est donc un nouveau champ d'investigation qui s'ouvre à nous avec ces observations et il serait intéressant de détecter la présence du messenger α ENaC dans ces granules, ainsi que confirmer par immunodétection la présence de DHX36 et Tial1 dans ces compartiments. En outre, pour continuer notre étude il sera important de montrer par immunoprécipitations que ces deux protéines sont bien associées au messenger α ENaC. Par ailleurs, la nature des différentes protéines identifiées suggère également un rôle dans la modulation traductionnelle de α ENaC. Il serait donc intéressant d'investiguer leur rôle à ce niveau.

Enfin, à un niveau pathophysiologique, il serait intéressant de confirmer par co-immunoprécipitation à partir de tissu pulmonaire si des protéines liant l'ARN peuvent interagir avec l'ARNm α ENaC et modifier de façon post-traductionnelle son niveau d'expression. Cette investigation pourrait se faire dans le cadre de conditions pathologiques inflammatoires pour les poumons, lors d'une transplantation pulmonaire par exemple ou dans le contexte d'un SDRA.

Bibliographie

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414. doi: 10.1038/nrc2657
- Alam, R., & Gorska, M. M. (2011). Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. *Clin Exp Allergy*, 41(2), 149-159. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03658.x
- Ammit, A. J. (2005). The role of mRNA stability in airway remodelling. *Pulm Pharmacol Ther*, 18(6), 405-415. doi: 10.1016/j.pupt.2005.03.001
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J Cell Biol*, 172(6), 803-808. doi: 10.1083/jcb.200512082
- Bachhuber, T., Almaca, J., Aldehni, F., Mehta, A., Amaral, M. D., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2008). Regulation of the epithelial Na⁺ channel by the protein kinase CK2. *J Biol Chem*, 283(19), 13225-13232. doi: 10.1074/jbc.M704532200
- Bai, D., Gao, Q., Li, C., Ge, L., Gao, Y., & Wang, H. (2012). A conserved TGFbeta1/HuR feedback circuit regulates the fibrogenic response in fibroblasts. *Cell Signal*, 24(7), 1426-1432. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.03.003
- Baines, D. L., Albert, A. P., Hazell, M. J., Gambling, L., Woollhead, A. M., & Dockrell, M. E. (2010). Lipopolysaccharide modifies amiloride-sensitive Na⁺ transport processes across human airway cells: role of mitogen-activated protein kinases ERK 1/2 and 5. *Pflugers Arch.*, 459(3), 451-463.
- Balagopal, V., & Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 21(3), 403-408. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.005
- Banasikowska, K., Post, M., Cutz, E., O'Brodovich, H., & Otulakowski, G. (2004a). Expression of epithelial sodium channel alpha-subunit mRNAs with alternative 5'-untranslated regions in the developing human lung. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 287(3), L608-L615.
- Banasikowska, K., Post, M., Cutz, E., O'Brodovich, H., & Otulakowski, G. (2004b). Expression of epithelial sodium channel alpha-subunit mRNAs with alternative 5'-untranslated regions in the developing human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(3), L608-615. doi: 10.1152/ajplung.00031.2004
- Barboro, P., Borzi, L., Repaci, E., Ferrari, N., & Balbi, C. (2013). Androgen receptor activity is affected by both nuclear matrix localization and the phosphorylation status of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in anti-androgen-treated LNCaP cells. *PLoS One*, 8(11), e79212. doi: 10.1371/journal.pone.0079212
- Barboro, P., Ferrari, N., & Balbi, C. (2014). Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. *Cancer Lett*, 352(2), 152-159. doi: 10.1016/j.canlet.2014.06.019
- Bardou, O., Prive, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., & Brochiero, E. (2012). K(+) channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta*. doi: S0005-2736(12)00076-4 [pii];10.1016/j.bbamem.2012.02.025 [doi]

- Bardou, O., Trinh, N. T., & Brochiero, E. (2009a). [K⁺ channels and lung epithelial physiology]. *Med Sci (Paris)*, 25(4), 391-397. doi: 10.1051/medsci/2009254391
- Bardou, O., Trinh, N. T., & Brochiero, E. (2009b). Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296(2), L145-155. doi: 10.1152/ajplung.90525.2008
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci*, 69(21), 3613-3634. doi: 10.1007/s00018-012-0990-9
- Baxendale-Cox, L. M. (1999). Terbutaline increases open channel density of epithelial sodium channel (ENaC) in distal lung. *Respir Physiol*, 116(1), 1-8.
- Bell, J. L., Wachter, K., Muhleck, B., Pazaitis, N., Kohn, M., Lederer, M., & Huttelmaier, S. (2013). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci*, 70(15), 2657-2675. doi: 10.1007/s00018-012-1186-z
- Bensaude, O. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription*, 2(3), 103-108. doi: 10.4161/trns.2.3.16172
- 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.
- Berthiaume, Y., Voisin, G., & Dagenais, A. (2006). The alveolar type I cells: the new knight of the alveolus? *J Physiol*, 572(Pt 3), 609-610.
- Bhalla, V., Daidie, D., Li, H., Pao, A. C., LaGrange, L. P., Wang, J., . . . Pearce, D. (2005). Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3. *Mol Endocrinol*, 19(12), 3073-3084. doi: 10.1210/me.2005-0193
- Bhatia, M., & Moochhala, S. (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, 202(2), 145-156. doi: 10.1002/path.1491
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6), 1111-1124. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.031
- Bishop, A. E. (2004). Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif*, 37(1), 89-96.
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*, 46(8), 591-598. doi: 10.1002/mc.20348
- Bollig, F., Winzen, R., Gaestel, M., Kostka, S., Resch, K., & Holtmann, H. (2003). Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(3), 665-670.
- Bomszyk, K., Denisenko, O., & Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays*, 26(6), 629-638. doi: 10.1002/bies.20048
- Boncoeur, E., Tardif, V., Tessier, M. C., Morneau, F., Lavoie, J., Gendreau-Berthiaume, E., . . . Berthiaume, Y. (2009). Modulation of epithelial sodium channel activity by lipopolysaccharide in alveolar type II cells: Involvement of purinergic signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Boncoeur, E., Tardif, V., Tessier, M. C., Morneau, F., Lavoie, J., Gendreau-Berthiaume, E., . . . Berthiaume, Y. (2010). Modulation of epithelial sodium channel activity by

- lipopolysaccharide in alveolar type II cells: involvement of purinergic signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298(3), L417-426. doi: 10.1152/ajplung.00170.2009
- Booy, E. P., Howard, R., Marushchak, O., Ariyo, E. O., Meier, M., Novakowski, S. K., . . . McKenna, S. A. (2014). The RNA helicase RHAU (DHX36) suppresses expression of the transcription factor PITX1. *Nucleic Acids Res*, 42(5), 3346-3361. doi: 10.1093/nar/gkt1340
- Bregues, M., Teixeira, D., & Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, 310(5747), 486-489. doi: 10.1126/science.1115791
- Brochiero, E., Dagenais, A., Prive, A., Berthiaume, Y., & Grygorczyk, R. (2004). Evidence of a functional CFTR Cl(-) channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(2), L382-392. doi: 10.1152/ajplung.00320.2002
- Brueckner, F., & Cramer, P. (2008). Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nat Struct Mol Biol*, 15(8), 811-818. doi: 10.1038/nsmb.1458
- Butterworth, M. B., Edinger, R. S., Ovaa, H., Burg, D., Johnson, J. P., & Frizzell, R. A. (2007). The deubiquitinating enzyme UCH-L3 regulates the apical membrane recycling of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem*, 282(52), 37885-37893. doi: 10.1074/jbc.M707989200
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367(6462), 463-467.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-1657. doi: 10.1126/science.296.5573.1655
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., & Cerami, A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(6), 1670-1674.
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 75(1), 50-83. doi: 75/1/50 [pii];10.1128/MMBR.00031-10 [doi]
- Casper, I., Nowag, S., Koch, K., Hubrich, T., Bollmann, F., Henke, J., . . . Pautz, A. (2013). Post-transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP). *Nitric Oxide*, 33, 6-17. doi: 10.1016/j.niox.2013.05.002
- Chalupnikova, K., Lattmann, S., Selak, N., Iwamoto, F., Fujiki, Y., & Nagamine, Y. (2008). Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain. *J Biol Chem*, 283(50), 35186-35198. doi: 10.1074/jbc.M804857200
- Chang, C. T., Hung, C. C., Chen, Y. C., Yen, T. H., Wu, M. S., Yang, C. W., . . . Tian, Y. C. (2008). Transforming growth factor-beta1 decreases epithelial sodium channel functionality in renal collecting duct cells via a Smad4-dependent pathway. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 23(4), 1126-1134.
- Chang, C. T., Wu, M. S., Tian, Y. C., Chen, K. H., Yu, C. C., Liao, C. H., . . . Yang, C. W. (2007). Enhancement of epithelial sodium channel expression in renal cortical collecting ducts cells by advanced glycation end products. *Nephrol Dial Transplant*, 22(3), 722-731. doi: 10.1093/ndt/gfl668

- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, *410*(6824), 37-40. doi: 10.1038/35065000
- Chen, C. Y., Chen, S. T., Juan, H. F., & Huang, H. C. (2012). Lengthening of 3'UTR increases with morphological complexity in animal evolution. *Bioinformatics*, *28*(24), 3178-3181. doi: 10.1093/bioinformatics/bts623
- Chen, C. Y., Ezzeddine, N., & Shyu, A. B. (2008). Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol*, *448*, 335-357. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02617-7
- Chen, C. Y., Xu, N., & Shyu, A. B. (1995). mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol Cell Biol*, *15*(10), 5777-5788.
- Chen, J., & Kastan, M. B. (2010). 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev*, *24*(19), 2146-2156. doi: 10.1101/gad.1968910
- Cheung, P. C., Campbell, D. G., Nebreda, A. R., & Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J*, *22*(21), 5793-5805. doi: 10.1093/emboj/cdg552
- Chow, Y. H., Wang, Y., Plumb, J., O'Brodovich, H., & Hu, J. (1999). Hormonal regulation and genomic organization of the human amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha subunit gene. *Pediatr Res*, *46*(2), 208-214.
- Chraïbi, A., Vallet, V., Firsov, D., Hess, S. K., & Horisberger, J. D. (1998). Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, *111*(1), 127-138.
- Chu, S., Cockrell, C. A., & Ferro, T. J. (2003). Expression of alpha-ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *303*(4), 1159-1168.
- Chuang, C. Y., Chen, T. L., Cherng, Y. G., Tai, Y. T., Chen, T. G., & Chen, R. M. (2011). Lipopolysaccharide induces apoptotic insults to human alveolar epithelial A549 cells through reactive oxygen species-mediated activation of an intrinsic mitochondrion-dependent pathway. *Arch Toxicol*, *85*(3), 209-218. doi: 10.1007/s00204-010-0585-x
- Cleary, M. D., Meiering, C. D., Jan, E., Guymon, R., & Boothroyd, J. C. (2005). Biosynthetic labeling of RNA with uracil phosphoribosyltransferase allows cell-specific microarray analysis of mRNA synthesis and decay. *Nat Biotechnol*, *23*(2), 232-237. doi: 10.1038/nbt1061
- Clontech Laboratories, I. (2012). *Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression Systems User Manual*.
- Cok, S. J., Acton, S. J., & Morrison, A. R. (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem*, *278*(38), 36157-36162. doi: 10.1074/jbc.M302547200
- Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M., & Schwartz, S. (1998). Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J Biol Chem*, *273*(35), 22648-22656.

- Conne, B., Stutz, A., & Vassalli, J. D. (2000). The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat.Med.*, 6(6), 637-641.
- Creacy, S. D., Routh, E. D., Iwamoto, F., Nagamine, Y., Akman, S. A., & Vaughn, J. P. (2008). G4 resolvase 1 binds both DNA and RNA tetramolecular quadruplex with high affinity and is the major source of tetramolecular quadruplex G4-DNA and G4-RNA resolving activity in HeLa cell lysates. *J Biol Chem*, 283(50), 34626-34634. doi: 10.1074/jbc.M806277200
- Croons, V., Martinet, W., Herman, A. G., Timmermans, J. P., & De Meyer, G. R. (2007). Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 320(3), 986-993. doi: jpet.106.113944 [pii];10.1124/jpet.106.113944 [doi]
- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1358-1375. doi: 10.1016/j.bbamer.2007.03.010
- Czikora, I., Alli, A., Bao, H. F., Kaftan, D., Sridhar, S., Apell, H. J., . . . Lucas, R. (2014). A Novel Tumor Necrosis Factor-mediated Mechanism of Direct Epithelial Sodium Channel Activation. *Am J Respir Crit Care Med*, 190(5), 522-532. doi: 10.1164/rccm.201405-0833OC
- Da Silva, N., Bharti, A., & Shelley, C. S. (2002). hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter. *Blood*, 100(10), 3536-3544. doi: 10.1182/blood.V100.10.3536
- Dagenais, A., Boncoeur, E., & Berthiaume, Y. (2009). [Na⁺ Transport in the lungs: differential impact of ENaC in the airways and alveoli]. *Med.Sci (Paris)*, 25(10), 815-820.
- Dagenais, A., Denis, C., Vives, M. F., Girouard, S., Masse, C., Nguyen, T., . . . Berthiaume, Y. (2001a). Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 281(1), L217-L230.
- Dagenais, A., Denis, C., Vives, M. F., Girouard, S., Masse, C., Nguyen, T., . . . Berthiaume, Y. (2001b). Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281(1), L217-230.
- Dagenais, A., Frechette, R., Clermont, M. E., Masse, C., Prive, A., Brochiero, E., & Berthiaume, Y. (2006). Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 291(6), L1220-L1231.
- Dagenais, A., Frechette, R., Yamagata, Y., Yamagata, T., Carmel, J. F., Clermont, M. E., . . . Berthiaume, Y. (2004). Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 286(2), L301-L311.
- Dagenais, A., Gosselin, D., Guilbault, C., Radzioch, D., & Berthiaume, Y. (2005a). Modulation of epithelial sodium channel (ENaC) expression in mouse lung infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Res*, 6, 2. doi: 10.1186/1465-9921-6-2
- Dagenais, A., Gosselin, D., Guilbault, C., Radzioch, D., & Berthiaume, Y. (2005b). Modulation of epithelial sodium channel (ENaC) expression in mouse lung infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir.Res*, 6, 2.

- Dagenais, A., Kothary, R., & Berthiaume, Y. (1997). The alpha subunit of the epithelial sodium channel in the mouse: developmental regulation of its expression. *Pediatr Res*, 42(3), 327-334. doi: 10.1203/00006450-199709000-00013
- Dagenais, A., Tessier, M. C., Tatur, S., Brochiero, E., Grygorczyk, R., & Berthiaume, Y. (2013). Hypotonic shock modulates Na⁽⁺⁾ current via a Cl⁽⁻⁾ and Ca⁽²⁺⁾/calmodulin dependent mechanism in alveolar epithelial cells. *PLoS One*, 8(9), e74565. doi: 10.1371/journal.pone.0074565
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J*, 351(Pt 1), 95-105.
- de Seigneux, S., Leroy, V., Ghzili, H., Rousselot, M., Nielsen, S., Rossier, B. C., . . . Feraille, E. (2008). NF-kappaB inhibits sodium transport via down-regulation of SGK1 in renal collecting duct principal cells. *J Biol.Chem.*, 283(37), 25671-25681. doi: M803812200 [pii];10.1074/jbc.M803812200 [doi]
- Delestienne, N., Wauquier, C., Soin, R., Dierick, J. F., Gueydan, C., & Kruys, V. (2010). The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression. *FEBS J*, 277(11), 2496-2514. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07664.x
- Dhainaut, J. F., Charpentier, J., & Chiche, J. D. (2003). Transforming growth factor-beta: a mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 31(4 Suppl), S258-264. doi: 10.1097/01.CCM.0000057901.92381.75
- Dijkink, L., Hartog, A., van Os, C. H., & Bindels, R. J. (2002). The epithelial sodium channel (ENaC) is intracellularly located as a tetramer. *Pflugers Arch*, 444(4), 549-555. doi: 10.1007/s00424-002-0855-4
- Dobbs, L. G., Gonzalez, R., & Williams, M. C. (1986). An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis*, 134(1), 141-145.
- Dobbs, L. G., Johnson, M. D., Vanderbilt, J., Allen, L., & Gonzalez, R. (2010). The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms. *Cell Physiol Biochem*, 25(1), 55-62. doi: 10.1159/000272063
- Downs, C. A., Kumar, A., Kreiner, L. H., Johnson, N. M., & Helms, M. N. (2013). H2O2 regulates lung epithelial sodium channel (ENaC) via ubiquitin-like protein Nedd8. *J Biol Chem*, 288(12), 8136-8145. doi: 10.1074/jbc.M112.389536
- Duda K, F. M. (2000). *Stimuli That Activate MSK in Cells and the Molecular Mechanism of Activation*. Austin (TX): Landes Bioscience.
- Eaton, D. C., Helms, M. N., Koval, M., Bao, H. F., & Jain, L. (2009). The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease. *Annu.Rev.Physiol*, 71, 403-423. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163250 [doi]
- Eaton, D. C., Malik, B., Bao, H. F., Yu, L., & Jain, L. (2010). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc*, 7(1), 54-64. doi: 10.1513/pats.200909-096JS
- Eliseeva, I. A., Lyabin, D. N., & Ovchinnikov, L. P. (2013). Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*, 78(13), 1377-1391. doi: 10.1134/S0006297913130014
- English, J. M., Pearson, G., Baer, R., & Cobb, M. H. (1998). Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem*, 273(7), 3854-3860.

- Ennis, H. L., & Lubin, M. (1964). Cycloheximide: Aspects of Inhibition of Protein Synthesis in Mammalian Cells. *Science*, *146*(3650), 1474-1476.
- Enslin, H., Branch, D. M., & Davis, R. J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J*, *19*(6), 1301-1311. doi: 10.1093/emboj/19.6.1301
- Erickson, S. E., Martin, G. S., Davis, J. L., Matthay, M. A., Eisner, M. D., & Network, N. N. A. (2009). Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Crit Care Med*, *37*(5), 1574-1579. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819fefdf
- Ermak, G., Cancasci, V. J., & Davies, K. J. (2003). Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for tet-on gene expression systems. *Anal Biochem*, *318*(1), 152-154.
- Errede, B., Cade, R. M., Yashar, B. M., Kamada, Y., Levin, D. E., Irie, K., & Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev*, *42*(4), 477-485. doi: 10.1002/mrd.1080420416
- Ezzeddine, N., Paillard, L., Capri, M., Maniey, D., Bassez, T., Ait-Ahmed, O., & Osborne, H. B. (2002). EDEN-dependent translational repression of maternal mRNAs is conserved between *Xenopus* and *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(1), 257-262. doi: 10.1073/pnas.012555499
- Fahy, R. J., Lichtenberger, F., McKeegan, C. B., Nuovo, G. J., Marsh, C. B., & Wewers, M. D. (2003). The acute respiratory distress syndrome: a role for transforming growth factor-beta 1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *28*(4), 499-503. doi: 10.1165/rcmb.2002-0092OC
- Fang, X., Fukuda, N., Barbry, P., Sartori, C., Verkman, A. S., & Matthay, M. A. (2002). Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen Physiol*, *119*(2), 199-207.
- Fang, X., Song, Y., Hirsch, J., Galiotta, L. J., Pedemonte, N., Zemans, R. L., . . . Matthay, M. A. (2006). Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *290*(2), L242-249. doi: 10.1152/ajplung.00178.2005
- Fard, N., Saffari, A., Emami, G., Hofer, S., Kauczor, H. U., & Mehrabi, A. (2014). Acute respiratory distress syndrome induction by pulmonary ischemia-reperfusion injury in large animal models. *J Surg Res*, *189*(2), 274-284. doi: 10.1016/j.jss.2014.02.034
- Fechir, M., Linker, K., Pautz, A., Hubrich, T., & Kleinert, H. (2005). The RNA binding protein TIAR is involved in the regulation of human iNOS expression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, *51*(3), 299-305.
- Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*, *2*(1), 33-46.
- Feng, Z. P., Clark, R. B., & Berthiaume, Y. (1993). Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *9*(3), 248-254. doi: 10.1165/ajrcmb/9.3.248
- Ferrell, J. E., Jr., & Bhatt, R. R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, *272*(30), 19008-19016.
- Fink, M. P. (2007). Animal Models of Sepsis and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome. Dans W. W. a. W. D. W. Souba (dir.), *Surgical Research* (p. 875-891): Elsevier.
- Finley, N., Norlin, A., Baines, D. L., & Folkesson, H. G. (1998). Alveolar epithelial fluid clearance is mediated by endogenous catecholamines at birth in guinea pigs. *J Clin Invest*, *101*(5), 972-981. doi: 10.1172/JCI1478

- Fisch, T. M., Prywes, R., Simon, M. C., & Roeder, R. G. (1989). Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev*, 3(2), 198-211.
- Force, A. D. T., Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., . . . Slutsky, A. S. (2012). Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 307(23), 2526-2533. doi: 10.1001/jama.2012.5669
- Frank, J., Roux, J., Kawakatsu, H., Su, G., Dagenais, A., Berthiaume, Y., . . . Pittet, J. F. (2003). Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem.*, 278(45), 43939-43950.
- Friedel, C. C., & Dolken, L. (2009). Metabolic tagging and purification of nascent RNA: implications for transcriptomics. *Mol Biosyst*, 5(11), 1271-1278. doi: 10.1039/b911233b
- Fujino, N., Kubo, H., Suzuki, T., Ota, C., Hegab, A. E., He, M., . . . Yamaya, M. (2011). Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest*, 91(3), 363-378. doi: 10.1038/labinvest.2010.187
- Fukuda, N., Jayr, C., Lazrak, A., Wang, Y., Lucas, R., Matalon, S., & Matthay, M. A. (2001). Mechanisms of TNF-alpha stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280(6), L1258-1265.
- Fullam, A., & Schroder, M. (2013). DExD/H-box RNA helicases as mediators of anti-viral innate immunity and essential host factors for viral replication. *Biochim Biophys Acta*, 1829(8), 854-865. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.03.012
- Furukawa, K., Estus, S., Fu, W., Mark, R. J., & Mattson, M. P. (1997). Neuroprotective action of cycloheximide involves induction of bcl-2 and antioxidant pathways. *J Cell Biol*, 136(5), 1137-1149.
- Galiotta, L. J., Pagesy, P., Folli, C., Caci, E., Romio, L., Costes, B., . . . Zegarra-Moran, O. (2002). IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *J Immunol.*, 168(2), 839-845.
- Gallo, K. A., & Johnson, G. L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9), 663-672. doi: 10.1038/nrm906
- Geiser, T. (2003). Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Med Wkly*, 133(43-44), 586-590. doi: 2003/43/smw-10267
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., & Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5383-5398. doi: 10.1091/mbc.E04-08-0715
- Gille, T., Randrianarison-Pellan, N., Goolaerts, A., Dard, N., Uzunhan, Y., Ferrary, E., . . . Planes, C. (2014). Hypoxia-induced inhibition of epithelial Na(+) channels in the lung. Role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50(3), 526-537. doi: 10.1165/rcmb.2012-0518OC
- Giraldez, T., Rojas, P., Jou, J., Flores, C., & Alvarez de la Rosa, D. (2012). The epithelial sodium channel delta-subunit: new notes for an old song. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(3), F328-338. doi: 10.1152/ajprenal.00116.2012
- Giri, B., Smaldino, P. J., Thys, R. G., Creacy, S. D., Routh, E. D., Hantgan, R. R., . . . Vaughn, J. P. (2011). G4 resolvase 1 tightly binds and unwinds unimolecular G4-DNA. *Nucleic Acids Res*, 39(16), 7161-7178. doi: 10.1093/nar/gkr234
- Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., & Cohen, P. (1997). Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated

- by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J*, 16(12), 3563-3571. doi: 10.1093/emboj/16.12.3563
- Gonzales, E. B., Kawate, T., & Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature*, 460(7255), 599-604. doi: 10.1038/nature08218
- Gonzales, M., & Bowden, G. T. (2002). Ultraviolet B (UVB) induction of the c-fos promoter is mediated by phospho-cAMP response element binding protein (CREB) binding to CRE and c-fos activator protein 1 site (FAP1) cis elements. *Gene*, 293(1-2), 169-179.
- Gonzalez-Feliciano, J. A., Hernandez-Perez, M., Estrella, L. A., Colon-Lopez, D. D., Lopez, A., Martinez, M., . . . Gonzalez, C. I. (2014). The role of HuR in the post-transcriptional regulation of interleukin-3 in T cells. *PLoS One*, 9(3), e92457. doi: 10.1371/journal.pone.0092457
- Goolaerts, A., Roux, J., Ganter, M. T., Shlyonsky, V., Chraïbi, A., Stephane, R., . . . Pittet, J. F. (2010). Serotonin decreases alveolar epithelial fluid transport via a direct inhibition of the epithelial sodium channel. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43(1), 99-108. doi: 10.1165/rcmb.2008-0472OC
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268(5218), 1766-1769.
- Gottschald, O. R., Malec, V., Krasteva, G., Hasan, D., Kamlah, F., Herold, S., . . . Hanze, J. (2010). TIAR and TIA-1 mRNA-binding proteins co-aggregate under conditions of rapid oxygen decline and extreme hypoxia and suppress the HIF-1 α pathway. *J Mol Cell Biol*, 2(6), 345-356. doi: 10.1093/jmcb/mjq032
- Gregersen, L. H., Schueler, M., Munschauer, M., Mastrobuoni, G., Chen, W., Kempa, S., . . . Landthaler, M. (2014). MOV10 Is a 5' to 3' RNA helicase contributing to UPF1 mRNA target degradation by translocation along 3' UTRs. *Mol Cell*, 54(4), 573-585. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.017
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.022
- Grollman, A. P. (1966). Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 56(6), 1867-1874.
- Grunder, S., Firsov, D., Chang, S. S., Jaeger, N. F., Gautschi, I., Schild, L., . . . Rossier, B. C. (1997). A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel. *EMBO J*, 16(5), 899-907. doi: 10.1093/emboj/16.5.899
- Grzesik, B. A., Vohwinkel, C. U., Morty, R. E., Mayer, K., Herold, S., Seeger, W., & Vadasz, I. (2013). Efficient gene delivery to primary alveolar epithelial cells by nucleofection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305(11), L786-794. doi: 10.1152/ajplung.00191.2013
- Grzybowska, E. A., Wilczynska, A., & Siedlecki, J. A. (2001). Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(2), 291-295. doi: 10.1006/bbrc.2001.5738

- Guha, M., & Mackman, N. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem*, 277(35), 32124-32132. doi: 10.1074/jbc.M203298200
- Guidot, D. M., Folkesson, H. G., Jain, L., Sznajder, J. I., Pittet, J. F., & Matthay, M. A. (2006). Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291(3), L301-306. doi: 10.1152/ajplung.00153.2006
- Guillot, L., Medjane, S., Le-Barillec, K., Balloy, V., Danel, C., Chignard, M., & Si-Tahar, M. (2004). Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*, 279(4), 2712-2718. doi: 10.1074/jbc.M305790200
- Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., . . . Clement, A. (2013). Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(11), 2568-2573. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.009
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., . . . Ronai, Z. (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol*, 3(3), 325-330. doi: 10.1038/35060131
- Haddad, J. J., & Land, S. C. (2002). Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis. *Br.J Pharmacol.*, 135(2), 520-536. doi: 10.1038/sj.bjp.0704467 [doi]
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., & Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265(5173), 808-811.
- Harkin, D. P., Bean, J. M., Miklos, D., Song, Y. H., Truong, V. B., Englert, C., . . . Haber, D. A. (1999). Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, 97(5), 575-586.
- He, J., Qi, D., Wang, D. X., Deng, W., Ye, Y., Feng, L. H., . . . Zhang, C. R. (2014). Insulin upregulates the expression of epithelial sodium channel in vitro and in a mouse model of acute lung injury: Role of mTORC2/SGK1 pathway. *Exp Cell Res*. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.09.024
- Helms, M. N., Liu, L., Liang, Y. Y., Al-Khalili, O., Vandewalle, A., Saxena, S., . . . Ma, H. P. (2005). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate mediates aldosterone stimulation of epithelial sodium channel (ENaC) and interacts with gamma-ENaC. *J Biol Chem*, 280(49), 40885-40891. doi: 10.1074/jbc.M509646200
- Hentze, M. W., & Kuhn, L. C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8175-8182.
- Hershko, D. D., Robb, B. W., Wray, C. J., Luo, G. J., & Hasselgren, P. O. (2004). Superinduction of IL-6 by cycloheximide is associated with mRNA stabilization and sustained activation of p38 map kinase and NF-kappaB in cultured caco-2 cells. *J Cell Biochem.*, 91(5), 951-961.
- Ho, J. J., Robb, G. B., Tai, S. C., Turgeon, P. J., Mawji, I. A., Man, H. S., & Marsden, P. A. (2013). Active stabilization of human endothelial nitric oxide synthase mRNA by hnRNP E1 protects against antisense RNA and microRNAs. *Mol Cell Biol*, 33(10), 2029-2046. doi: 10.1128/MCB.01257-12

- Hollenhorst, M. I., Richter, K., & Fronius, M. (2011). Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 174306. doi: 10.1155/2011/174306
- Houseley, J., & Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136(4), 763-776. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.019
- Hovel, H., & Frieling, K. H. (1987). The use of doxycycline, mezlocillin and clotrimazole in cell culture media as contamination prophylaxis. *Dev Biol Stand*, 66, 23-28.
- Hu, S., Claud, E. C., Musch, M. W., & Chang, E. B. (2010). Stress granule formation mediates the inhibition of colonic Hsp70 translation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298(4), G481-492. doi: 10.1152/ajpgi.00234.2009
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., . . . Rossier, B. C. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.*, 12(3), 325-328.
- Hussain, R., Oliynyk, I., Roomans, G. M., & Bjorkqvist, M. (2013). Modulation of ENaC, CFTR, and iNOS expression in bronchial epithelial cells after stimulation with *Staphylococcus epidermidis* (94B080) and *Staphylococcus aureus* (90B083). *APMIS*, 121(9), 814-826. doi: 10.1111/apm.12138
- Hutchins, E. J., & Szaro, B. G. (2013). c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K regulates vertebrate axon outgrowth via a posttranscriptional mechanism. *J Neurosci*, 33(37), 14666-14680. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4821-12.2013
- Hyers, T. M., Tricomi, S. M., Dettenmeier, P. A., & Fowler, A. A. (1991). Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 144(2), 268-271. doi: 10.1164/ajrccm/144.2.268
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., . . . Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275(5296), 90-94.
- Iregui, M. G., & Kollef, M. H. (2001). Ventilator-associated pneumonia complicating the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*, 22(3), 317-326. doi: 10.1055/s-2001-15788
- Itani, O. A., Cornish, K. L., Liu, K. Z., & Thomas, C. P. (2003). Cycloheximide increases glucocorticoid-stimulated alpha-ENaC mRNA in collecting duct cells by p38 MAPK-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(4), F778-F787.
- Ito, K., Kiyosawa, N., Kumagai, K., Manabe, S., Matsunuma, N., & Yamoto, T. (2006). Molecular mechanism investigation of cycloheximide-induced hepatocyte apoptosis in rat livers by morphological and microarray analysis. *Toxicology*, 219(1-3), 175-186.
- Ivanov, P., Kedersha, N., & Anderson, P. (2011). Stress puts TIA on TOP. *Genes Dev*, 25(20), 2119-2124. doi: 10.1101/gad.17838411
- Iwamoto, F., Stadler, M., Chalupnikova, K., Oakeley, E., & Nagamine, Y. (2008). Transcription-dependent nucleolar cap localization and possible nuclear function of DExH RNA helicase RHAU. *Exp Cell Res*, 314(6), 1378-1391. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.01.006
- Iwasaki, T., Koretomo, Y., Fukuda, T., Paronetto, M. P., Sette, C., Fukami, Y., & Sato, K. (2008). Expression, phosphorylation, and mRNA-binding of heterogeneous nuclear

- ribonucleoprotein K in *Xenopus* oocytes, eggs, and early embryos. *Dev Growth Differ*, 50(1), 23-40. doi: 10.1111/j.1440-169X.2007.00974.x
- Jacobson, A., & Peltz, S. W. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu.Rev.Biochem.*, 65, 693-739. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.003401 [doi]
- Jain, L., Chen, X. J., Malik, B., Al-Khalili, O., & Eaton, D. C. (1999). Antisense oligonucleotides against the alpha-subunit of ENaC decrease lung epithelial cation-channel activity. *Am J Physiol*, 276(6 Pt 1), L1046-1051.
- Jain, L., Chen, X. J., Ramosevac, S., Brown, L. A., & Eaton, D. C. (2001). Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280(4), L646-658.
- Ji, H. L., Zhao, R. Z., Chen, Z. X., Shetty, S., Idell, S., & Matalon, S. (2012). delta ENaC: a novel divergent amiloride-inhibitable sodium channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(12), L1013-1026. doi: 10.1152/ajplung.00206.2012
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., & Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, 271(30), 17920-17926.
- Jin, C., Zoidis, E., Ghirlanda, C., & Schmid, C. (2010). Dexamethasone and cyclic AMP regulate sodium phosphate cotransporter (NaPi-IIb and Pit-1) mRNA and phosphate uptake in rat alveolar type II epithelial cells. *Lung*, 188(1), 51-61. doi: 10.1007/s00408-009-9183-1
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., . . . Han, J. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, 120(5), 623-634. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.038
- Johnson, E. R., & Matthay, M. A. (2010). Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 23(4), 243-252. doi: 10.1089/jamp.2009.0775
- Johnson, M., Allen, L., & Dobbs, L. (2009). Characteristics of Cl⁻ uptake in rat alveolar type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297(5), L816-827. doi: 10.1152/ajplung.90466.2008
- Johnson, M. D. (2007). Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst*, 3(3), 178-186. doi: 10.1039/b614348b
- Johnson, M. D., Bao, H. F., Helms, M. N., Chen, X. J., Tigue, Z., Jain, L., . . . Eaton, D. C. (2006). Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103(13), 4964-4969.
- Johnson, T. R., Rudin, S. D., Blossey, B. K., Ilan, J., & Ilan, J. (1991). Newly synthesized RNA: simultaneous measurement in intact cells of transcription rates and RNA stability of insulin-like growth factor I, actin, and albumin in growth hormone-stimulated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12), 5287-5291.
- Jones, G. S., Miles, P. R., Lantz, R. C., Hinton, D. E., & Castranova, V. (1982). Ionic content and regulation of cellular volume in rat alveolar type II cells. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 53(1), 258-266.
- Junttila, M. R., Li, S. P., & Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, 22(4), 954-965. doi: 10.1096/fj.06-7859rev

- Kanangat, S., Bronze, M. S., Meduri, G. U., Postlethwaite, A., Stentz, F., Tolley, E., & Schaberg, D. (2001). Enhanced extracellular growth of *Staphylococcus aureus* in the presence of selected linear peptide fragments of human interleukin (IL)-1beta and IL-1 receptor antagonist. *J Infect Dis*, *183*(1), 65-69. doi: 10.1086/317645
- Karnitz, L. M., Burns, L. A., Sutor, S. L., Blenis, J., & Abraham, R. T. (1995). Interleukin-2 triggers a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent MEK activation pathway. *Mol Cell Biol*, *15*(6), 3049-3057.
- Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S. F., & Anderson, P. (1992). Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(18), 8681-8685.
- Kazlauskas, A., & Cooper, J. A. (1988). Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol*, *106*(4), 1395-1402.
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2002a). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem.Soc.Trans.*, *30*(Pt 6), 963-969.
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2002b). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*, *30*(Pt 6), 963-969. doi: 10.1042/
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2007). Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.*, *431*, 61-81. doi: S0076-6879(07)31005-7 [pii];10.1016/S0076-6879(07)31005-7 [doi]
- Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2013). Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci*, *38*(10), 494-506. doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.004
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., . . . Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J.Cell Biol.*, *169*(6), 871-884. doi: jcb.200502088 [pii];10.1083/jcb.200502088 [doi]
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*, *147*(7), 1431-1442.
- Kenzelmann, M., Maertens, S., Hergenhausen, M., Kueffer, S., Hotz-Wagenblatt, A., Li, L., . . . Schutz, G. (2007). Microarray analysis of newly synthesized RNA in cells and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(15), 6164-6169. doi: 10.1073/pnas.0610439104
- Khabar, K. S. (2010). Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell Mol Life Sci*, *67*(17), 2937-2955. doi: 10.1007/s00018-010-0383-x
- Kietzmann, D., Kahl, R., Muller, M., Burchardi, H., & Kettler, D. (1993). Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med*, *19*(2), 78-81.
- Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., . . . Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, *121*(6), 823-835. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.032
- Kim, H. N., Lee, J. H., Bae, S. C., Ryoo, H. M., Kim, H. H., Ha, H., & Lee, Z. H. (2011). Histone deacetylase inhibitor MS-275 stimulates bone formation in part by enhancing

- Dhx36-mediated TNAP transcription. *J Bone Miner Res*, 26(9), 2161-2173. doi: 10.1002/jbmr.426
- Kim, H. S., Headey, S. J., Yoga, Y. M., Scanlon, M. J., Gorospe, M., Wilce, M. C., & Wilce, J. A. (2013). Distinct binding properties of TIAR RRM and linker region. *RNA Biol*, 10(4), 579-589. doi: 10.4161/rna.24341
- Kim, H. S., Kuwano, Y., Zhan, M., Pullmann, R., Jr., Mazan-Mamczarz, K., Li, H., . . . Wilce, J. A. (2007). Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol*, 27(19), 6806-6817. doi: 10.1128/MCB.01036-07
- Kim, J. H., Hahm, B., Kim, Y. K., Choi, M., & Jang, S. K. (2000). Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J Mol Biol*, 298(3), 395-405. doi: 10.1006/jmbi.2000.3687
- Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S., & Harding, H. P. (2003). Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(2), C273-284. doi: 10.1152/ajpcell.00314.2002
- Kleyman, T. R., Carattino, M. D., & Hughey, R. P. (2009). ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J Biol Chem*, 284(31), 20447-20451. doi: 10.1074/jbc.R800083200
- Knowles, M. R., & Boucher, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 109(5), 571-577. doi: 10.1172/JCI15217
- Kohler, S., Pradervand, S., Verdumo, C., Merillat, A. M., Bens, M., Vandewalle, A., . . . Hummler, E. (2001). Analysis of the mouse Scnn1a promoter in cortical collecting duct cells and in transgenic mice. *Biochim.Biophys.Acta*, 1519(1-2), 106-110. doi: S0167-4781(01)00228-7 [pii]
- Kominek, L. A. (1975). Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: alleviation of end-product inhibition by dialysis-extraction fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*, 7(6), 861-863.
- Konstas, A. A., & Korbmacher, C. (2003). The gamma-subunit of ENaC is more important for channel surface expression than the beta-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(2), C447-456. doi: 10.1152/ajpcell.00385.2002
- Kota, P., Buchner, G., Chakraborty, H., Dang, Y. L., He, H., Garcia, G. J., . . . Dokholyan, N. V. (2014). The N-terminal Domain Allosterically Regulates Cleavage and Activation of the Epithelial Sodium Channel. *J Biol Chem*, 289(33), 23029-23042. doi: 10.1074/jbc.M114.570952
- Kucich, U., Rosenbloom, J. C., Shen, G., Abrams, W. R., Hamilton, A. D., Sebt, S. M., & Rosenbloom, J. (2000). TGF-beta1 stimulation of fibronectin transcription in cultured human lung fibroblasts requires active geranylgeranyl transferase I, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C-delta, and p38, but not erk1/erk2. *Arch Biochem Biophys*, 374(2), 313-324. doi: 10.1006/abbi.1999.1625
- Kulkarni, M., Ozgur, S., & Stoecklin, G. (2010a). On track with P-bodies. *Biochem.Soc.Trans.*, 38(Pt 1), 242-251. doi: BST0380242 [pii];10.1042/BST0380242 [doi]
- Kulkarni, M., Ozgur, S., & Stoecklin, G. (2010b). On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans*, 38(Pt 1), 242-251. doi: 10.1042/BST0380242

- Kumagai, K., Ito, K., Ando, Y., Hakamata, S., Teranishi, M., Nakayama, H., & Manabe, S. (2009). Neutralization of IL-10 exacerbates cycloheximide-induced hepatocellular apoptosis and necrosis. *Toxicol Pathol*, *37*(4), 536-546. doi: 10.1177/0192623309336153
- Kunzelmann, K., Scheidt, K., Scharf, B., Ousingsawat, J., Schreiber, R., Wainwright, B., & McMorran, B. (2006). Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits Na⁺ transport in airway epithelia. *FASEB J*, *20*(3), 545-546. doi: 10.1096/fj.05-4454fje
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., & Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, *358*(6385), 417-421. doi: 10.1038/358417a0
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem*, *265*(28), 17355-17363.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., . . . Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, *369*(6476), 156-160. doi: 10.1038/369156a0
- Lai, J. C., Ponti, S., Pan, D., Kohler, H., Skoda, R. C., Matthias, P., & Nagamine, Y. (2012). The DEAH-box helicase RHAU is an essential gene and critical for mouse hematopoiesis. *Blood*, *119*(18), 4291-4300. doi: 10.1182/blood-2011-08-362954
- Lai, P. F., Mohamed, F., Monge, J. C., & Stewart, D. J. (2003). Downregulation of eNOS mRNA expression by TNFalpha: identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc Res*, *59*(1), 160-168.
- LaJevic, M. D., Koduvayur, S. P., Caffrey, V., Cohen, R. L., & Chambers, D. A. (2010). Thy-1 mRNA destabilization by norepinephrine a 3' UTR cAMP responsive decay element and involves RNA binding proteins. *Brain Behav Immun*, *24*(7), 1078-1088. doi: 10.1016/j.bbi.2010.04.006
- Lal, A., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Kawai, T., Galban, S., Yang, X., . . . Gorospe, M. (2006). Posttranscriptional derepression of GADD45alpha by genotoxic stress. *Mol Cell*, *22*(1), 117-128. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.016
- Lamb, N. J., Gutteridge, J. M., Baker, C., Evans, T. W., & Quinlan, G. J. (1999). Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med*, *27*(9), 1738-1744.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., & Schneider, R. J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, *284*(5413), 499-502.
- Lattmann, S., Giri, B., Vaughn, J. P., Akman, S. A., & Nagamine, Y. (2010). Role of the amino terminal RHAU-specific motif in the recognition and resolution of guanine quadruplex-RNA by the DEAH-box RNA helicase RHAU. *Nucleic Acids Res*, *38*(18), 6219-6233. doi: 10.1093/nar/gkq372
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., & Cohen, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol*, *8*(25), 1387-1390.
- Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P., & Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(9), 4355-4359.
- Lee, I. H., Campbell, C. R., Song, S. H., Day, M. L., Kumar, S., Cook, D. I., & Dinudom, A. (2009). The activity of the epithelial sodium channels is regulated by caveolin-1 via a

- Nedd4-2-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 284(19), 12663-12669. doi: 10.1074/jbc.M809737200
- Lee, J. E., Lee, J. Y., Wilusz, J., Tian, B., & Wilusz, C. J. (2010). Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One*, 5(6), e11201. doi: 10.1371/journal.pone.0011201 [doi]
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. doi: 10.1038/nature01957
- Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., & 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(5), L1027-1037. doi: 10.1152/ajplung.00249.2003
- Leroy, C., Prive, A., Bourret, J. C., Berthiaume, Y., Ferraro, P., & 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(6), L1207-1219. doi: 10.1152/ajplung.00376.2005
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., & Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 74, 49-139.
- Li, D. W., & Spector, A. (1997). Hydrogen peroxide-induced expression of the proto-oncogenes, c-jun, c-fos and c-myc in rabbit lens epithelial cells. *Mol Cell Biochem*, 173(1-2), 59-69.
- Li, K., Guo, D., Zhu, H., Hering-Smith, K. S., Hamm, L. L., Ouyang, J., & Dong, Y. (2010). Interleukin-6 stimulates epithelial sodium channels in mouse cortical collecting duct cells. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol*, 299(2), R590-R595. doi: ajpregu.00207.2009 [pii];10.1152/ajpregu.00207.2009 [doi]
- Li, W., Yan, F., Zhou, H., Lin, X., Wu, Y., Chen, C., . . . Shen, H. (2013). P. aeruginosa lipopolysaccharide-induced MUC5AC and CLCA3 expression is partly through Duox1 in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8(5), e63945. doi: 10.1371/journal.pone.0063945
- Li, X., Quon, G., Lipshitz, H. D., & Morris, Q. (2010). Predicting in vivo binding sites of RNA-binding proteins using mRNA secondary structure. *RNA*, 16(6), 1096-1107. doi: 10.1261/rna.2017210
- Li, X. J., Xu, R. H., Guggino, W. B., & Snyder, S. H. (1995). Alternatively spliced forms of the alpha subunit of the epithelial sodium channel: distinct sites for amiloride binding and channel pore. *Mol Pharmacol*, 47(6), 1133-1140.
- Li, Z., Wang, J., Wang, Y., Jiang, H., Xu, X., Zhang, C., . . . Lu, W. (2014). Bone morphogenetic protein 4 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in the airway. *Eur J Immunol*. doi: 10.1002/eji.201344287
- Lin, H. H., Zentner, M. D., Ho, H. L., Kim, K. J., & Ann, D. K. (1999). The gene expression of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is regulated by antagonistic effects between glucocorticoid hormone and ras pathways in salivary epithelial cells. *J Biol. Chem.*, 274(31), 21544-21554.
- Lin, W. W., & Hsu, Y. W. (2000). Cycloheximide-induced cPLA(2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation. *Cell Signal.*, 12(7), 457-461. doi: S0898-6568(00)00090-5 [pii]

- Lingrel, J. B., Orlowski, J., Shull, M. M., & Price, E. M. (1990). Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 38, 37-89.
- Liu, L., Duke, B. J., Malik, B., Yue, Q., & Eaton, D. C. (2009). Biphasic regulation of ENaC by TGF- α and EGF in renal epithelial cells. *Am.J Physiol Renal Physiol*, 296(6), F1417-F1427. doi: 90337.2008 [pii];10.1152/ajprenal.90337.2008 [doi]
- Liu, X., Shao, K., & Sun, T. (2013). SIRT1 regulates the human alveolar epithelial A549 cell apoptosis induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Cell Physiol Biochem*, 31(1), 92-101. doi: 10.1159/000343352
- Ljungman, M. (2007). The transcription stress response. *Cell Cycle*, 6(18), 2252-2257.
- Loo, D. T., Copani, A., Pike, C. J., Whittemore, E. R., Walencewicz, A. J., & Cotman, C. W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17), 7951-7955.
- Lopez de Silanes, I., Galban, S., Martindale, J. L., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Indig, F. E., . . . Gorospe, M. (2005). Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9520-9531. doi: 10.1128/MCB.25.21.9520-9531.2005
- Lopez de Silanes, I., Quesada, M. P., & Esteller, M. (2007). Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol*, 29(1), 1-17.
- Lubman, R. L., Chao, D. C., & Crandall, E. D. (1995). Basolateral localization of Na(+)-HCO₃⁻ cotransporter activity in alveolar epithelial cells. *Respir Physiol*, 100(1), 15-24.
- Lubman, R. L., Danto, S. I., Chao, D. C., Fricks, C. E., & Crandall, E. D. (1995). Cl(-)-HCO₃⁻ exchanger isoform AE2 is restricted to the basolateral surface of alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 12(2), 211-219. doi: 10.1165/ajrcmb.12.2.7865219
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), 95-98. doi: 10.1126/science.1090599
- Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M. J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M. J., & Schmidt, E. V. (2005). hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Mol Cell Biol*, 25(15), 6436-6453. doi: 10.1128/MCB.25.15.6436-6453.2005
- Ma, H. P., Saxena, S., & Warnock, D. G. (2002). Anionic phospholipids regulate native and expressed epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem*, 277(10), 7641-7644. doi: 10.1074/jbc.C100737200
- MacCallum, N. S., & Evans, T. W. (2005). Epidemiology of acute lung injury. *Curr Opin Crit Care*, 11(1), 43-49.
- Magdeldin, S. (2012). *AFFINITY CHROMATOGRAPHY* Croatia: InTech.
- Mahadevan, L. C., & Edwards, D. R. (1991). Signalling and superinduction. *Nature*, 349(6312), 747-748. doi: 10.1038/349747c0
- Mair, N., Frick, M., Bertocchi, C., Haller, T., Amberger, A., Weiss, H., . . . Diel, P. (2004). Inhibition by cytoplasmic nucleotides of a new cation channel in freshly isolated human and rat type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(6), L1284-1292. doi: 10.1152/ajplung.00177.2004
- Malik, B., Yue, Q., Yue, G., Chen, X. J., Price, S. R., Mitch, W. E., & Eaton, D. C. (2005). Role of Nedd4-2 and polyubiquitination in epithelial sodium channel degradation in

- untransfected renal A6 cells expressing endogenous ENaC subunits. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(1), F107-116. doi: 10.1152/ajprenal.00179.2002
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J*, 23(16), 3356-3364. doi: 10.1038/sj.emboj.7600340
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179-185.
- Mason, R. J. (2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, 11 Suppl, S12-15. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x
- Matthay, M. A. (2002). Alveolar fluid clearance in patients with ARDS: does it make a difference? *Chest*, 122(6 Suppl), 340S-343S.
- Matthay, M. A., Landolt, C. C., & Staub, N. C. (1982). Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 53(1), 96-104.
- Matthay, M. A., & Zemans, R. L. (2011). The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, 6, 147-163. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130158
- May, A., Puoti, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1997). Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells. *J Am Soc Nephrol*, 8(12), 1813-1822.
- McCoy, C. E., Campbell, D. G., Deak, M., Bloomberg, G. B., & Arthur, J. S. (2005). MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J*, 387(Pt 2), 507-517. doi: 10.1042/BJ20041501
- Meduri, G. U., Kanangat, S., Stefan, J., Tolley, E., & Schaberg, D. (1999). Cytokines IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha enhance in vitro growth of bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(3), 961-967. doi: 10.1164/ajrcm.160.3.9807080
- Meier, M., Patel, T. R., Booy, E. P., Marushchak, O., Okun, N., Deo, S., . . . McKenna, S. A. (2013). Binding of G-quadruplexes to the N-terminal recognition domain of the RNA helicase associated with AU-rich element (RHAU). *J Biol Chem*, 288(49), 35014-35027. doi: 10.1074/jbc.M113.512970
- Melo, E. O., Dhalia, R., Martins de Sa, C., Standart, N., & de Melo Neto, O. P. (2003). Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem*, 278(47), 46357-46368. doi: 10.1074/jbc.M307624200
- Miau, L. H., Chang, C. J., Shen, B. J., Tsai, W. H., & Lee, S. C. (1998). Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a repressor of C/EBPbeta-mediated gene activation. *J Biol Chem*, 273(17), 10784-10791.
- Michael, W. M., Eder, P. S., & Dreyfuss, G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J*, 16(12), 3587-3598. doi: 10.1093/emboj/16.12.3587
- Michelotti, E. F., Michelotti, G. A., Aronsohn, A. I., & Levens, D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol*, 16(5), 2350-2360.
- Michels, A. A., Kanon, B., Konings, A. W., Bensaude, O., & Kampinga, H. H. (2000). Cycloheximide- and puromycin-induced heat resistance: different effects on cytoplasmic and nuclear luciferases. *Cell Stress.Chaperones.*, 5(3), 181-187.

- Mick, V. E., Itani, O. A., Loftus, R. W., Husted, R. F., Schmidt, T. J., & Thomas, C. P. (2001). The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol. Endocrinol.*, *15*(4), 575-588.
- Migneault, F., Boncoeur, E., Morneau, F., Pascariu, M., Dagenais, A., & Berthiaume, Y. (2013). Cycloheximide and lipopolysaccharide downregulate alphaENaC mRNA via different mechanisms in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *305*(10), L747-755. doi: 10.1152/ajplung.00023.2013
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., & Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*, *3*(3), REVIEWS0004.
- Mikula, M., Karczmarski, J., Dzwonek, A., Rubel, T., Hennig, E., Dadlez, M., . . . Ostrowski, J. (2006). Casein kinases phosphorylate multiple residues spanning the entire hnRNP K length. *Biochim Biophys Acta*, *1764*(2), 299-306. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.12.004
- Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Dumcke, S., Zacher, B., . . . Cramer, P. (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Mol Syst Biol*, *7*, 458. doi: 10.1038/msb.2010.112
- Moncini, S., Bevilacqua, A., Venturin, M., Fallini, C., Ratti, A., Nicolin, A., & Riva, P. (2007). The 3' untranslated region of human Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulatory subunit 1 contains regulatory elements affecting transcript stability. *BMC Mol Biol*, *8*, 111. doi: 10.1186/1471-2199-8-111
- Moon, A., Gil, S., Gill, S. E., Chen, P., & Matute-Bello, G. (2012). Doxycycline impairs neutrophil migration to the airspaces of the lung in mice exposed to intratracheal lipopolysaccharide. *J Inflamm. (Lond)*, *9*(1), 31. doi: 1476-9255-9-31 [pii];10.1186/1476-9255-9-31 [doi]
- Morneau, F. (2001). *Modulation du canal sodique ENaC des cellules épithéliales alvéolaires par les LPS de Pseudomonas aeruginosa*. (Université de Montréal, Montréal).
- Morneau, F., Dagenais, A., & Berthiaume, Y. (2001). LPS down regulation of á-ENaC mRNA is mediated by phospho-Inositol 3-Kinase in alveolar epithelial cells. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, *163*.
- Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. A., & Vasudevan, S. (2011). Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(20), 8281-8286. doi: 10.1073/pnas.1105401108
- Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M. J., & Jackson, S. P. (2005). hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*, *123*(6), 1065-1078. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.032
- Munchel, S. E., Shultzaberger, R. K., Takizawa, N., & Weis, K. (2011). Dynamic profiling of mRNA turnover reveals gene-specific and system-wide regulation of mRNA decay. *Mol Biol Cell*, *22*(15), 2787-2795. doi: 10.1091/mbc.E11-01-0028
- Mustafa, S. B., Castro, R., Falck, A. J., Petershock, J. A., Henson, B. M., Mendoza, Y. M., . . . Seidner, S. R. (2008). Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways mediate cAMP induction of alpha-epithelial Na⁺ channels (alpha-ENaC). *J Cell Physiol*, *215*(1), 101-110.

- Nazer, E., & Sanchez, D. O. (2011). Nucleolar accumulation of RNA binding proteins induced by Actinomycin D is functional in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* but not in *T. brucei*. *PLoS One*, *6*(8), e24184. doi: 10.1371/journal.pone.0024184
- Nazer, E., Verdun, R. E., & Sanchez, D. O. (2011). Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, *6*(5), e19920. doi: 10.1371/journal.pone.0019920
- Neu, H. C. (1983). The role of *Pseudomonas aeruginosa* in infections. *J Antimicrob Chemother*, *11 Suppl B*, 1-13.
- Nie, M., Balda, M. S., & Matter, K. (2012). Stress- and Rho-activated ZO-1-associated nucleic acid binding protein binding to p21 mRNA mediates stabilization, translation, and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(27), 10897-10902. doi: 10.1073/pnas.1118822109
- Niessing, D., Blanke, S., & Jackle, H. (2002). Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev*, *16*(19), 2576-2582. doi: 10.1101/gad.240002
- O'Brodovich, H., Yang, P., Gandhi, S., & Otulakowski, G. (2008). Amiloride-insensitive Na⁺ and fluid absorption in the mammalian distal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *294*(3), L401-408. doi: 10.1152/ajplung.00431.2007
- Oberfeld, B., Ruffieux-Daidie, D., Vitagliano, J. J., Pos, K. M., Verrey, F., & Staub, O. (2011). Ubiquitin-specific protease 2-45 (Usp2-45) binds to epithelial Na⁺ channel (ENaC)-ubiquitylating enzyme Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol*, *301*(1), F189-196. doi: 10.1152/ajprenal.00487.2010
- Oelberg, D. G., Xu, F., & Shabarek, F. (1993). Sodium/proton transport by apical membranes of type-II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta*, *1149*(1), 19-28.
- Ohh, M., & Takei, F. (1995). Regulation of ICAM-1 mRNA stability by cycloheximide: role of serine/threonine phosphorylation and protein synthesis. *J Cell Biochem*, *59*(2), 202-213. doi: 10.1002/jcb.240590210
- Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I. N., & Hentze, M. W. (2001). Lipoxigenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*, *104*(2), 281-290.
- Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B. J., Mann, M., & Hentze, M. W. (1997). mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*, *89*(4), 597-606.
- Ostrowski, J., Kawata, Y., Schullery, D. S., Denisenko, O. N., & Bomsztyk, K. (2003). Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci. *Nucleic Acids Res*, *31*(14), 3954-3962.
- Ostrowski, J., Schullery, D. S., Denisenko, O. N., Higaki, Y., Watts, J., Aebersold, R., . . . Bomsztyk, K. (2000). Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *J Biol Chem*, *275*(5), 3619-3628.
- Otulakowski, G., Freywald, T., Wen, Y., & O'Brodovich, H. (2001). Translational activation and repression by distinct elements within the 5'-UTR of ENaC alpha-subunit mRNA. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, *281*(5), L1219-L1231.
- Otulakowski, G., Rafii, B., Bremner, H. R., & O'Brodovich, H. (1999). Structure and hormone responsiveness of the gene encoding the alpha-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Am J Respir.Cell Mol.Biol*, *20*(5), 1028-1040.

- Otulakowski, G., Raffi, B., Harris, M., & O'Brodivich, H. (2006). Oxygen and glucocorticoids modulate alphaENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34(2), 204-212. doi: 10.1165/rcmb.2005-0273OC
- Otulakowski, G., Raffi, B., & O'Brodivich, H. (2004). Differential translational efficiency of ENaC subunits during lung development. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol*, 30(6), 862-870.
- Palanisamy, V., Jakymiw, A., Van Tubergen, E. A., D'Silva, N. J., & Kirkwood, K. L. (2012). Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J Dent Res*, 91(7), 651-658. doi: 10.1177/0022034512437372
- Parent, R. A. (1992). *Treatise on Pulmonary Toxicology, Volume I: Comparative Biology of the Normal Lung*. (1^e éd.).
- Patton, J. S., & Byron, P. R. (2007). Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov*, 6(1), 67-74. doi: 10.1038/nrd2153
- Paunescu, T. G., Blazer-Yost, B. L., Vlahos, C. J., & Helman, S. I. (2000). LY-294002-inhibitable PI 3-kinase and regulation of baseline rates of Na(+) transport in A6 epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(1), C236-247.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428
- Pelechano, V., & Perez-Ortin, J. E. (2008). The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast*, 25(2), 85-92. doi: 10.1002/yea.1548
- Perlewitz, A., Nafz, B., Skalweit, A., Fahling, M., Persson, P. B., & Thiele, B. J. (2010). Aldosterone and vasopressin affect {alpha}- and {gamma}-ENaC mRNA translation. *Nucleic Acids Res*.
- Persson, P. B., Skalweit, A., Mrowka, R., & Thiele, B. J. (2003). Control of renin synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(3), R491-497. doi: 10.1152/ajpregu.00101.2003
- Pestka, S. (1971). Inhibitors of ribosome functions. *Annu Rev Microbiol*, 25, 487-562. doi: 10.1146/annurev.mi.25.100171.002415
- Peters, D. M., Vadasz, I., Wujak, L., Wygrecka, M., Olschewski, A., Becker, C., . . . Morty, R. E. (2014). TGF-beta directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(3), E374-383. doi: 10.1073/pnas.1306798111
- Petrache, I., Birukova, A., Ramirez, S. I., Garcia, J. G., & Verin, A. D. (2003). The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28(5), 574-581. doi: 10.1165/rcmb.2002-0075OC
- Pichon, X., Wilson, L. A., Stoneley, M., Bastide, A., King, H. A., Somers, J., & Willis, A. E. (2012). RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation. *Curr Protein Pept Sci*, 13(4), 294-304.
- Pieczyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., . . . Anderson, P. (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J*, 19(15), 4154-4163. doi: 10.1093/emboj/19.15.4154
- Planes, C., Escoubet, B., Blot-Chabaud, M., Friedlander, G., Farman, N., & Clerici, C. (1997). Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17(4), 508-518. doi: 10.1165/ajrcmb.17.4.2680

- Pochynyuk, O., Tong, Q., Medina, J., Vandewalle, A., Staruschenko, A., Bugaj, V., & Stockand, J. D. (2007). Molecular determinants of PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ regulation of the epithelial Na⁺ channel. *J Gen Physiol*, *130*(4), 399-413. doi: 10.1085/jgp.200709800
- Pochynyuk, O., Tong, Q., Staruschenko, A., Ma, H. P., & Stockand, J. D. (2006). Regulation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by phosphatidylinositides. *Am J Physiol Renal Physiol*, *290*(5), F949-957. doi: 10.1152/ajprenal.00386.2005
- Posch, M., Sutterluety, H., Skern, T., & Seiser, C. (1999). Characterization of the translation-dependent step during iron-regulated decay of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem*, *274*(23), 16611-16618.
- Prowse, C. N., Hagopian, J. C., Cobb, M. H., Ahn, N. G., & Lew, J. (2000). Catalytic reaction pathway for the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Biochemistry*, *39*(45), 14002.
- Pugin, J., Ricou, B., Steinberg, K. P., Suter, P. M., & Martin, T. R. (1996). Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med*, *153*(6 Pt 1), 1850-1856. doi: 10.1164/ajrccm.153.6.8665045
- Pugin, J., Verghese, G., Widmer, M. C., & Matthay, M. A. (1999). The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, *27*(2), 304-312.
- Rabani, M., Levin, J. Z., Fan, L., Adiconis, X., Raychowdhury, R., Garber, M., . . . Regev, A. (2011). Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, *29*(5), 436-442. doi: 10.1038/nbt.1861
- Raghavan, A., Dhalla, M., Bakheet, T., Ogilvie, R. L., Vlasova, I. A., Khabar, K. S., . . . Bohjanen, P. R. (2004). Patterns of coordinate down-regulation of ARE-containing transcripts following immune cell activation. *Genomics*, *84*(6), 1002-1013. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.08.007
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*(22), 3100-3112. doi: 10.1038/sj.onc.1210392
- Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., & Chignard, M. (2009). Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One*, *4*(10), e7259. doi: 10.1371/journal.pone.0007259 [doi]
- Ray, D., Kazan, H., Chan, E. T., Pena Castillo, L., Chaudhry, S., Talukder, S., . . . Hughes, T. R. (2009). Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins. *Nat Biotechnol*, *27*(7), 667-670. doi: 10.1038/nbt.1550
- Ray, L. B., & Sturgill, T. W. (1988). Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(11), 3753-3757.
- Reddy, R., Buckley, S., Doerken, M., Barsky, L., Weinberg, K., Anderson, K. D., . . . Driscoll, B. (2004). Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *286*(4), L658-667. doi: 10.1152/ajplung.00159.2003
- Rehen, S. K., Varella, M. H., Freitas, F. G., Moraes, M. O., & Linden, R. (1996). Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina. *Development*, *122*(5), 1439-1448.

- Reisenauer, M. R., Anderson, M., Huang, L., Zhang, Z., Zhou, Q., Kone, B. C., . . . Zhang, W. (2009). AF17 competes with AF9 for binding to Dot1a to up-regulate transcription of epithelial Na⁺ channel alpha. *J Biol.Chem.*, 284(51), 35659-35669. doi: M109.038448 [pii];10.1074/jbc.M109.038448 [doi]
- Reisenauer, M. R., Wang, S. W., Xia, Y., & Zhang, W. (2010). Dot1a contains three nuclear localization signals and regulates the epithelial Na⁺ channel (ENaC) at multiple levels. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 299(1), F63-F76.
- Reynolds, S. D., & Malkinson, A. M. (2010). Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(1), 1-4. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.002
- Richard, K., Ramminger, S. J., Inglis, S. K., Olver, R. E., Land, S. C., & Wilson, S. M. (2003). O₂ can raise fetal pneumocyte Na⁺ conductance without affecting ENaC mRNA abundance. *Biochem Biophys Res Commun*, 305(3), 671-676.
- Richards, J., Greenlee, M. M., Jeffers, L. A., Cheng, K. Y., Guo, L., Eaton, D. C., & Gumz, M. L. (2012). Inhibition of alphaENaC expression and ENaC activity following blockade of the circadian clock-regulatory kinases CK1delta/epsilon. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(7), F918-927. doi: 10.1152/ajprenal.00678.2011
- Richards, J., Jeffers, L. A., All, S. C., Cheng, K. Y., & Gumz, M. L. (2013). Role of Per1 and the mineralocorticoid receptor in the coordinate regulation of alphaENaC in renal cortical collecting duct cells. *Front Physiol*, 4, 253. doi: 10.3389/fphys.2013.00253
- Ritchie, S. A., Pasha, M. K., Batten, D. J., Sharma, R. K., Olson, D. J., Ross, A. R., & Bonham, K. (2003). Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. *Nucleic Acids Res*, 31(5), 1502-1513.
- Robertson, L. K., Mireau, L. R., & Ostergaard, H. L. (2005). A role for phosphatidylinositol 3-kinase in TCR-stimulated ERK activation leading to paxillin phosphorylation and CTL degranulation. *J Immunol*, 175(12), 8138-8145.
- Rocco, P. R., Dos Santos, C., & Pelosi, P. (2009). Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol*, 75(12), 730-740.
- Roedding, A. S., Tong, S. Y., Au-Yeung, W., Li, P. P., & Warsh, J. J. (2013). Chronic oxidative stress modulates TRPC3 and TRPM2 channel expression and function in rat primary cortical neurons: relevance to the pathophysiology of bipolar disorder. *Brain Res*, 1517, 16-27. doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.025
- Roger, T., Out, T. A., Jansen, H. M., & Lutter, R. (1998). Superinduction of interleukin-6 mRNA in lung epithelial H292 cells depends on transiently increased C/EBP activity and durable increased mRNA stability. *Biochim.Biophys.Acta*, 1398(3), 275-284. doi: S0167-4781(98)00075-X [pii]
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 59(3), 423-450.
- Rossier, B. C., & Stutts, M. J. (2009). Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu Rev Physiol*, 71, 361-379. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163108
- Roux, J., Kawakatsu, H., Gartland, B., Pespeni, M., Sheppard, D., Matthay, M. A., . . . Pittet, J. F. (2005). Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *J.Biol.Chem.*, 280(19), 18579-18589. doi: M410561200 [pii];10.1074/jbc.M410561200 [doi]

- Rubinfeld, G. D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D. P., Neff, M., . . . Hudson, L. D. (2005). Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*, 353(16), 1685-1693. doi: 10.1056/NEJMoa050333
- Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Guszczynski, T., Copeland, T. D., Yamaguchi, H., Appella, E., . . . Ashwell, J. D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol*, 6(4), 390-395. doi: 10.1038/ni1177
- Sartori, C., & Matthay, M. A. (2002). Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J*, 20(5), 1299-1313.
- Sataranatarajan, K., Lee, M. J., Mariappan, M. M., & Feliers, D. (2008). PKCdelta regulates the stimulation of vascular endothelial factor mRNA translation by angiotensin II through hnRNP K. *Cell Signal*, 20(5), 969-977. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.01.016
- Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 19(4), 2435-2444.
- Schlag, G., Redl, H., & Hallstrom, S. (1991). The cell in shock: the origin of multiple organ failure. *Resuscitation*, 21(2-3), 137-180.
- Schulz, C., Farkas, L., Wolf, K., Kratzel, K., Eissner, G., & Pfeifer, M. (2002). Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand.J Immunol.*, 56(3), 294-302. doi: 1137 [pii]
- Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., . . . Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342. doi: 10.1038/nature10098
- Schwarz, M. A. (2001). Acute lung injury: cellular mechanisms and derangements. *Paediatr Respir Rev*, 2(1), 3-9. doi: 10.1053/prrv.2000.0095
- Scocca, J. R., Charron, M., Shaper, N. L., & Shaper, J. H. (2003). Determination of the half-life of the murine beta4-galactosyltransferase-1 mRNA in somatic cells using the tetracycline-controlled transcriptional regulation system. *Biochimie*, 85(3-4), 403-407.
- Shanmugam, N., Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2008). Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 283(52), 36221-36233. doi: 10.1074/jbc.M806322200
- Sharova, L. V., Sharov, A. A., Nedorezov, T., Piao, Y., Shaik, N., & Ko, M. S. (2009). Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res*, 16(1), 45-58. doi: 10.1093/dnares/dsn030
- Shi, H., Asher, C., Chigaev, A., Yung, Y., Reuveny, E., Seger, R., & Garty, H. (2002). Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 277(16), 13539-13547. doi: 10.1074/jbc.M111717200
- Shin, S., Moon, K. C., Park, K. U., & Ha, E. (2012). MicroRNA-513a-5p mediates TNF-alpha and LPS induced apoptosis via downregulation of X-linked inhibitor of apoptotic protein in endothelial cells. *Biochimie*, 94(6), 1431-1436. doi: 10.1016/j.biochi.2012.03.023
- Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., & Hurley, L. H. (2002). Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18), 11593-11598. doi: 10.1073/pnas.182256799

- Skalweit, A., Doller, A., Huth, A., Kahne, T., Persson, P. B., & Thiele, B. J. (2003). Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. *Circ Res*, *92*(4), 419-427. doi: 10.1161/01.RES.0000059300.67152.4E
- Sladic, R. T., Lagnado, C. A., Bagley, C. J., & Goodall, G. J. (2004). Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. *Eur J Biochem*, *271*(2), 450-457.
- Smith, D. E., Otulakowski, G., Yeger, H., Post, M., Cutz, E., & O'Brodovich, H. M. (2000). Epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC) expression in the developing normal and abnormal human perinatal lung. *Am J Respir Crit Care Med*, *161*(4 Pt 1), 1322-1331. doi: 10.1164/ajrccm.161.4.9905064
- Solyosi, E. A., Kaestle-Gemhardt, S. M., Vadasz, I., Wang, L., Neye, N., Chupin, C. J., . . . Kuebler, W. M. (2013). Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(25), E2308-2316. doi: 10.1073/pnas.1216382110
- Song, Y., Shi, Y., Harken, A. H., & Meng, X. (2003). Induction of type II alveolar epithelial cells apoptosis in mouse by lipopolysaccharide does not require TNF-alpha. *Chin Med J (Engl)*, *116*(4), 625-629.
- Sourdeval, M., Lemaire, C., Brenner, C., Boisvieux-Ulrich, E., & Marano, F. (2006). Mechanisms of doxycycline-induced cytotoxicity on human bronchial epithelial cells. *Front Biosci*, *11*, 3036-3048.
- Spasov, D. S., & Jurecic, R. (2003). The PUF family of RNA-binding proteins: does evolutionarily conserved structure equal conserved function? *IUBMB Life*, *55*(7), 359-366. doi: 10.1080/15216540310001603093
- Stains, J. P., Lecanda, F., Towler, D. A., & Civitelli, R. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses transcription from a cytosine/thymidine-rich element in the osteocalcin promoter. *Biochem J*, *385*(Pt 2), 613-623. doi: 10.1042/BJ20040680
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., & Rotin, D. (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J*, *16*(21), 6325-6336. doi: 10.1093/emboj/16.21.6325
- Stoecklin, G., & Kedersha, N. (2013). Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol*, *768*, 197-211. doi: 10.1007/978-1-4614-5107-5_12
- Sugita, M., Ferraro, P., Dagenais, A., Clermont, M. E., Barbry, P., Michel, R. P., & Berthiaume, Y. (2003a). Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs. *Am J Respir. Crit Care Med.*, *167*(10), 1440-1450.
- Sugita, M., Ferraro, P., Dagenais, A., Clermont, M. E., Barbry, P., Michel, R. P., & Berthiaume, Y. (2003b). Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, *167*(10), 1440-1450. doi: 10.1164/rccm.200204-312OC
- Sweadner, K. J., & Goldin, S. M. (1980). Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation. *N Engl J Med*, *302*(14), 777-783. doi: 10.1056/NEJM198004033021404
- Takemura, Y., Goodson, P., Bao, H. F., Jain, L., & Helms, M. N. (2010). Rac1-mediated NADPH oxidase release of O₂⁻ regulates epithelial sodium channel activity in the alveolar epithelium. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, *298*(4), L509-L520.

- Tani, H., Mizutani, R., Salam, K. A., Tano, K., Ijiri, K., Wakamatsu, A., . . . Akimitsu, N. (2012). Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res*, 22(5), 947-956. doi: 10.1101/gr.130559.111
- Thorley, A. J., Grandolfo, D., Lim, E., Goldstraw, P., Young, A., & Tetley, T. D. (2011). Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS One*, 6(7), e21827. doi: 10.1371/journal.pone.0021827
- Tibbles, L. A., & Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol.Life Sci.*, 55(10), 1230-1254.
- Tong, X., Van Dross, R. T., Abu-Yousif, A., Morrison, A. R., & Pelling, J. C. (2007). Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. *Mol Cell Biol*, 27(1), 283-296. doi: 10.1128/MCB.01282-06
- Tourriere, H., Chebli, K., & Tazi, J. (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*, 84(8), 821-837.
- Tran, H., Schilling, M., Wirbelauer, C., Hess, D., & Nagamine, Y. (2004). Facilitation of mRNA deadenylation and decay by the exosome-bound, DExH protein RHAU. *Mol Cell*, 13(1), 101-111.
- Trask, D. K., & Muller, M. T. (1988). Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(5), 1417-1421.
- Uhal, B. D. (1997). Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 1), L1031-1045.
- Van Etten, J., Schagat, T. L., Hrit, J., Weidmann, C. A., Brumbaugh, J., Coon, J. J., & Goldstrohm, A. C. (2012). Human Pumilio proteins recruit multiple deadenylases to efficiently repress messenger RNAs. *J Biol Chem*, 287(43), 36370-36383. doi: 10.1074/jbc.M112.373522
- Van Scott, M. R., Hester, S., & Boucher, R. C. (1987). Ion transport by rabbit nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5496-5500.
- Van Seuning, I., Ostrowski, J., & Bomsztyk, K. (1995). Description of an IL-1-responsive kinase that phosphorylates the K protein. Enhancement of phosphorylation by selective DNA and RNA motifs. *Biochemistry*, 34(16), 5644-5650.
- Vannini, A., & Cramer, P. (2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell*, 45(4), 439-446. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.023
- Vasquez, M. M., Castro, R., Seidner, S. R., Henson, B. M., Ashton, D. J., & Mustafa, S. B. (2008). Induction of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 (SGK1) by cAMP regulates increases in alpha-ENaC. *J Cell Physiol*, 217(3), 632-642. doi: 10.1002/jcp.21534
- Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6), 1105-1118. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.038
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934. doi: 10.1126/science.1149460

- Vazquez-Pianzola, P., Urlaub, H., & Suter, B. (2011). Pabp binds to the *osk* 3'UTR and specifically contributes to *osk* mRNA stability and oocyte accumulation. *Dev Biol*, 357(2), 404-418. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.07.009
- Venkatesh, V. C., & Katzberg, H. D. (1997). Glucocorticoid regulation of epithelial sodium channel genes in human fetal lung. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1), L227-L233.
- Verkman, A. S. (2007). Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol*, 159(3), 324-330. doi: 10.1016/j.resp.2007.02.012
- Vlasova-St Louis, I., & Bohjanen, P. R. (2011). Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Curr Opin Genet Dev*, 21(4), 444-451. doi: 10.1016/j.gde.2011.03.002
- Vlasova, I. A., Tahoe, N. M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J. R., . . . Bohjanen, P. R. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell*, 29(2), 263-270. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.024
- Wang, H., Traub, L. M., Weixel, K. M., Hawryluk, M. J., Shah, N., Edinger, R. S., . . . Johnson, J. P. (2006). Clathrin-mediated endocytosis of the epithelial sodium channel. Role of epsin. *J Biol Chem*, 281(20), 14129-14135. doi: 10.1074/jbc.M512511200
- Wang, H. C., Zentner, M. D., Deng, H. T., Kim, K. J., Wu, R., Yang, P. C., & Ann, D. K. (2000). Oxidative stress disrupts glucocorticoid hormone-dependent transcription of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit in lung epithelial cells through ERK-dependent and thioredoxin-sensitive pathways. *J.Biol.Chem.*, 275(12), 8600-8609.
- Wang, S., Zhang, J., Theel, S., Barb, J. J., Munson, P. J., & Danner, R. L. (2006). Nitric oxide activation of Erk1/2 regulates the stability and translation of mRNA transcripts containing CU-rich elements. *Nucleic Acids Res*, 34(10), 3044-3056. doi: 10.1093/nar/gkl386
- Wang, X., Finegan, K. G., Robinson, A. C., Knowles, L., Khosravi-Far, R., Hinchliffe, K. A., . . . Tournier, C. (2006). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ*, 13(12), 2099-2108. doi: 10.1038/sj.cdd.4401969
- Ware, L. B. (2006). Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*, 27(4), 337-349. doi: 10.1055/s-2006-948288
- Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J Med.*, 342(18), 1334-1349.
- Wein, G., Rossler, M., Klug, R., & Herget, T. (2003). The 3'-UTR of the mRNA coding for the major protein kinase C substrate MARCKS contains a novel CU-rich element interacting with the mRNA stabilizing factors HuD and HuR. *Eur J Biochem*, 270(2), 350-365.
- Weston, C. R., & Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 19(2), 142-149. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.001
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1), 143-180.
- Wiemuth, D., Ke, Y., Rohlf, M., & McDonald, F. J. (2007). Epithelial sodium channel (ENaC) is multi-ubiquitinated at the cell surface. *Biochem J*, 405(1), 147-155. doi: 10.1042/BJ20060747

- Wiener-Kronish, J. P., Sakuma, T., Kudoh, I., Pittet, J. F., Frank, D., Dobbs, L., . . . Matthay, M. A. (1993). Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute P. aeruginosa pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* (1985), 75(4), 1661-1669.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., & Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci*, 118(Pt 5), 981-992. doi: 10.1242/jcs.01692
- Wilkinson, M. F., & Shyu, A. B. (2001). Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays*, 23(9), 775-787. doi: 10.1002/bies.1113
- Wilkinson, W. J., Benjamin, A. R., De Proost, I., Orogo-Wenn, M. C., Yamazaki, Y., Staub, O., . . . Kemp, P. J. (2011). Alveolar epithelial CNGA1 channels mediate cGMP-stimulated, amiloride-insensitive, lung liquid absorption. *Pflugers Arch*, 462(2), 267-279. doi: 10.1007/s00424-011-0971-0
- Wu, J., Li, C., Zhao, S., & Mao, B. (2010). Differential expression of the Brunol/CELF family genes during *Xenopus laevis* early development. *Int J Dev Biol*, 54(1), 209-214. doi: 10.1387/ijdb.082685jw
- Wu, T. T., Chen, T. L., Loon, W. S., Tai, Y. T., Cherng, Y. G., & Chen, R. M. (2011). Lipopolysaccharide stimulates syntheses of toll-like receptor 2 and surfactant protein-A in human alveolar epithelial A549 cells through upregulating phosphorylation of MEK1 and ERK1/2 and sequential activation of NF-kappaB. *Cytokine*, 55(1), 40-47. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.005
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., . . . Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031), 338-345. doi: 10.1038/nature03441
- Xu, H., & Chu, S. (2007). ENaC alpha-subunit variants are expressed in lung epithelial cells and are suppressed by oxidative stress. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 293(6), L1454-L1462.
- Xu, H., Ferro, T. J., & Chu, S. (2007). Cigarette smoke condensate inhibits ENaC alpha-subunit expression in lung epithelial cells. *Eur Respir J*, 30(4), 633-642. doi: 10.1183/09031936.00014107
- Xu, N., Chen, C. Y., & Shyu, A. B. (1997). Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol*, 17(8), 4611-4621.
- Yamagata, T., Yamagata, Y., Nishimoto, T., Hirano, T., Nakanishi, M., Minakata, Y., . . . Berthiaume, Y. (2009). The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells. *Respir.Physiol Neurobiol.*, 166(1), 16-23.
- Yamboliev, I. A., Wiesmann, K. M., Singer, C. A., Hedges, J. C., & Gerthoffer, W. T. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinases regulate ERK and p38 MAP kinases in canine colonic smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(2), C352-360.
- Yang, E., van Nimwegen, E., Zavolan, M., Rajewsky, N., Schroeder, M., Magnasco, M., & Darnell, J. E., Jr. (2003). Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Res*, 13(8), 1863-1872. doi: 10.1101/gr.1272403

- Yekta, S., Shih, I. H., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, *304*(5670), 594-596. doi: 10.1126/science.1097434
- Yoo, J. S., Takahasi, K., Ng, C. S., Ouda, R., Onomoto, K., Yoneyama, M., . . . Fujita, T. (2014). DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. *PLoS Pathog*, *10*(3), e1004012. doi: 10.1371/journal.ppat.1004012
- Yosefzon, Y., Koh, Y. Y., Chritton, J. J., Lande, A., Leibovich, L., Barziv, L., . . . Arava, Y. (2011). Divergent RNA binding specificity of yeast Puf2p. *RNA*, *17*(8), 1479-1488. doi: 10.1261/rna.2700311
- Yoshida, Y., & Hamada, H. (1997). Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun*, *230*(2), 426-430. doi: 10.1006/bbrc.1996.5975
- Yu, Z., Kong, Q., & Kone, B. C. (2013a). Sp1 trans-activates and is required for maximal aldosterone induction of the alphaENaC gene in collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, *305*(5), F653-662. doi: 10.1152/ajprenal.00177.2013
- Yu, Z. Y., Kong, Q., & Kone, B. C. (2013b). Physical and functional interaction of Rnf2 with Af9 regulates basal and aldosterone-stimulated transcription of the alpha-ENaC gene in a renal collecting duct cell line. *Biosci Rep*, *33*(5). doi: 10.1042/BSR20130086
- Zambon, M., & Vincent, J. L. (2008). Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest*, *133*(5), 1120-1127. doi: 10.1378/chest.07-2134
- Zentner, M. D., Lin, H. H., Deng, H. T., Kim, K. J., Shih, H. M., & Ann, D. K. (2001). Requirement for high mobility group protein HMGI-C interaction with STAT3 inhibitor PIAS3 in repression of alpha-subunit of epithelial Na⁺ channel (alpha-ENaC) transcription by Ras activation in salivary epithelial cells. *J Biol Chem*, *276*(32), 29805-29814. doi: 10.1074/jbc.M103153200
- Zentner, M. D., Lin, H. H., Wen, X., Kim, K. J., & Ann, D. K. (1998). The amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is transcriptionally down-regulated in rat parotid cells by the extracellular signal-regulated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, *273*(46), 30770-30776.
- Zhang, D., Li, S., Cruz, P., & Kone, B. C. (2009). Sirtuin 1 functionally and physically interacts with disruptor of telomeric silencing-1 to regulate alpha-ENaC transcription in collecting duct. *J Biol Chem*, *284*(31), 20917-20926. doi: 10.1074/jbc.M109.020073
- Zhang, W., Xia, X., Reisenauer, M. R., Hemenway, C. S., & Kone, B. C. (2006). Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaCalpha in an aldosterone-sensitive manner. *J Biol Chem*, *281*(26), 18059-18068. doi: 10.1074/jbc.M601903200
- Zhang, W., Yu, Z., Wu, H., Chen, L., Kong, Q., & Kone, B. C. (2013). An Af9 cis-element directly targets Dot1a to mediate transcriptional repression of the alphaENaC gene. *Am J Physiol Renal Physiol*, *304*(4), F367-375. doi: 10.1152/ajprenal.00537.2011
- Zhao, W., Zhao, J., Hou, M., Wang, Y., Zhang, Y., Zhao, X., . . . Guo, D. (2014). HuR and TIA1/TIAL1 are involved in regulation of alternative splicing of SIRT1 pre-mRNA. *Int J Mol Sci*, *15*(2), 2946-2958. doi: 10.3390/ijms15022946
- Zhou, R., Tomkovicz, V. R., Butler, P. L., Ochoa, L. A., Peterson, Z. J., & Snyder, P. M. (2013). Ubiquitin-specific peptidase 8 (USP8) regulates endosomal trafficking of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem*, *288*(8), 5389-5397. doi: 10.1074/jbc.M112.425272

Zhu, S., Yue, G., Shoemaker, R. L., & Matalon, S. (1996). Adult alveolar type II cells lack cAMP and Ca(2+)-activated Cl-channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 218(1), 302-308. doi: 10.1006/bbrc.1996.0053

Annexes

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

Solution SGGS

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

Solution I

Pour 1 rat

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

Solution II

Pour 1 rat

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

Milieu MEM

Pour 1 bouteille

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

Annexe 2. Solutions pour l'immunobuvardage de type Western.

Tampon de lyse

1X	1X	5X
NaCl 150mM	1,75g	8,77g
EDTA 5mM	2mL EDTA 0,5M	10mL EDTA 0,5M
TRIS 50mM	1,21g	6,06g
Triton X-100 1% V/V	2mL	10mL
pH 7,5		Total 200mL

Tampon d'électrophorèse 4X 10mL

Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (62,5mM final) 2,5mL

SDS 20% (2% final) 2mL

glycérol (10% final) 2mL

Bleu de bromophénol (0,02% final) 4mg

Aliquoter 500µL, garder à -20°C et ajouter 40µL de β-mercaptoéthanol le jour de l'expérience

Tampon de migration 10X

Glycine 1,92M 72g

Tris 0,25M 15,1g

SDS 1% 5g

Compléter à 500mL avec H₂O

Tampon de transfert 10X

Glycine (192mM pour 1X) 145g

Tris (25mM pour 1X) 30g

SDS (0,01% pour 1X) 5mL SDS 20%

Compléter à 1L avec H₂O et conserver à 4°C

Tampon de transfert 1X + méthanol 10%

Transfert buffer 10X 200mL

MeOH 200mL

H₂O 1,6L

Annexe 3. Solutions pour l'isolation de protéines liant l'ARN par chromatographie d'affinité.

Tampon « Binding and Washing » 2X

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

1 mM EDTA

2 M NaCl

Tampon DEPC-A

DEPC-treated 0.1 M NaOH

DEPC-treated 0.05 M NaCl

Tampon DEPC-B

DEPC-treated 0.1 M NaCl

Tampon A

50mM Tris-HCl pH 7,4

150mM KCl

0,1mM EDTA

1% (v/v) NP-40

20mM NaF

(avant utilisation)

4mM DTT

PMSF 10µL/mL de tampon

Protease inhibitor cocktail 50µL/mL de tampon

Phosphatase inh. cocktail 10µL/mL de tampon

Tampon B 2X

100mM KCl

20mM MgCl₂

20% (v/v) glycérol

(avant utilisation) (1X)

2µg/µL héparine

2µg/µL tRNA

50U/mL RNaseOut

470 µL H₂O

Tampon C

25mM Tris-HCl pH 7,4

100mM NaCl

5mM MgCl₂

5% (v/v) glycérol

Annexe 4. Solutions pour l'isolation de l'ARNm α ENaC par chromatographie d'affinité à l'aide de protéines chimériques GST.

Tampon « Binding and Washing » 1X

125 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150mM NaCl

Tampon RIPA

50mM Tris-HCl pH 7,4

150mM NaCl

0,1% SDS

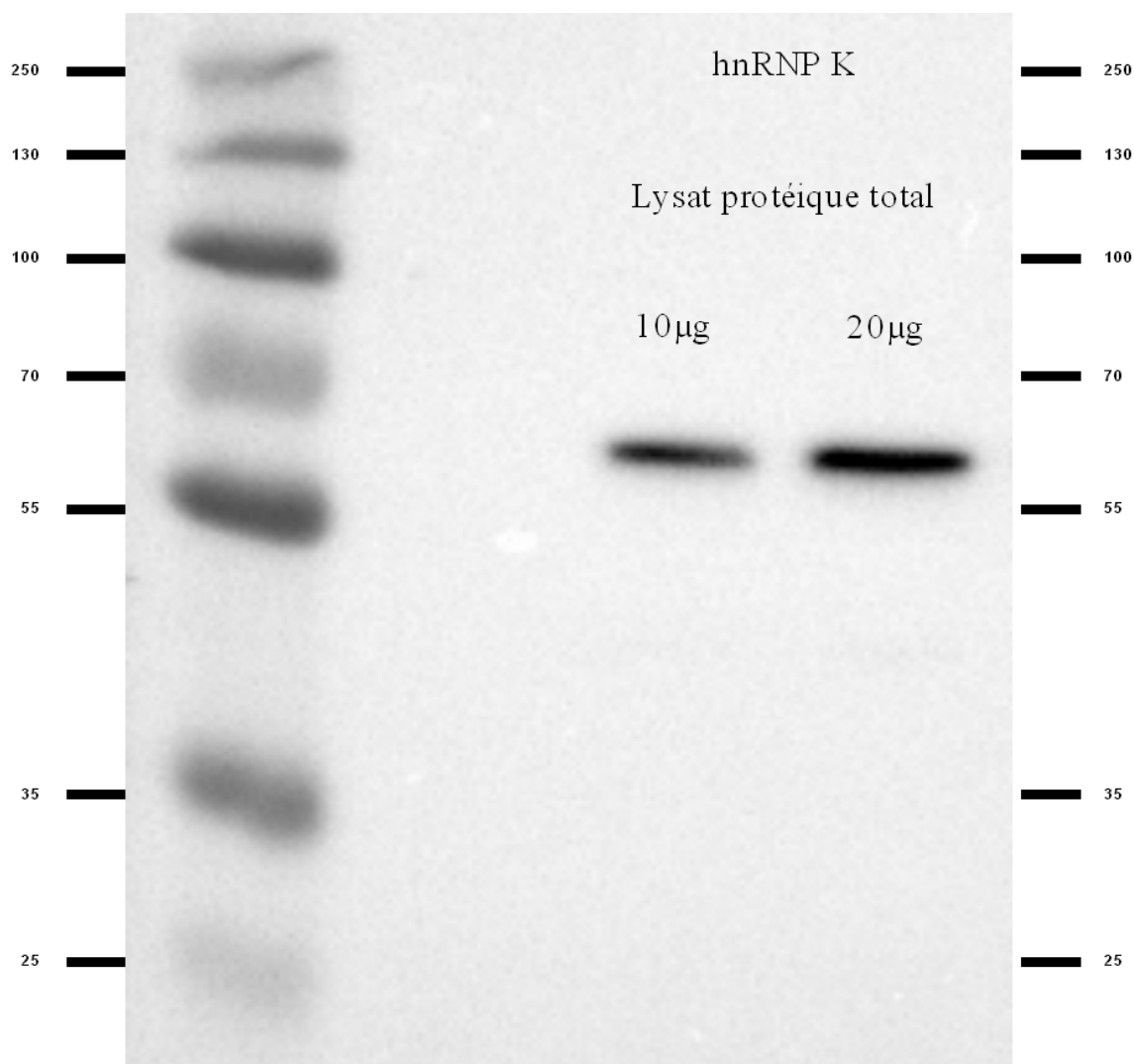
0,5% Na.Deoxycholate

1% Triton X-100

4,3mM EDTA

0,25U/ μ L RNase out

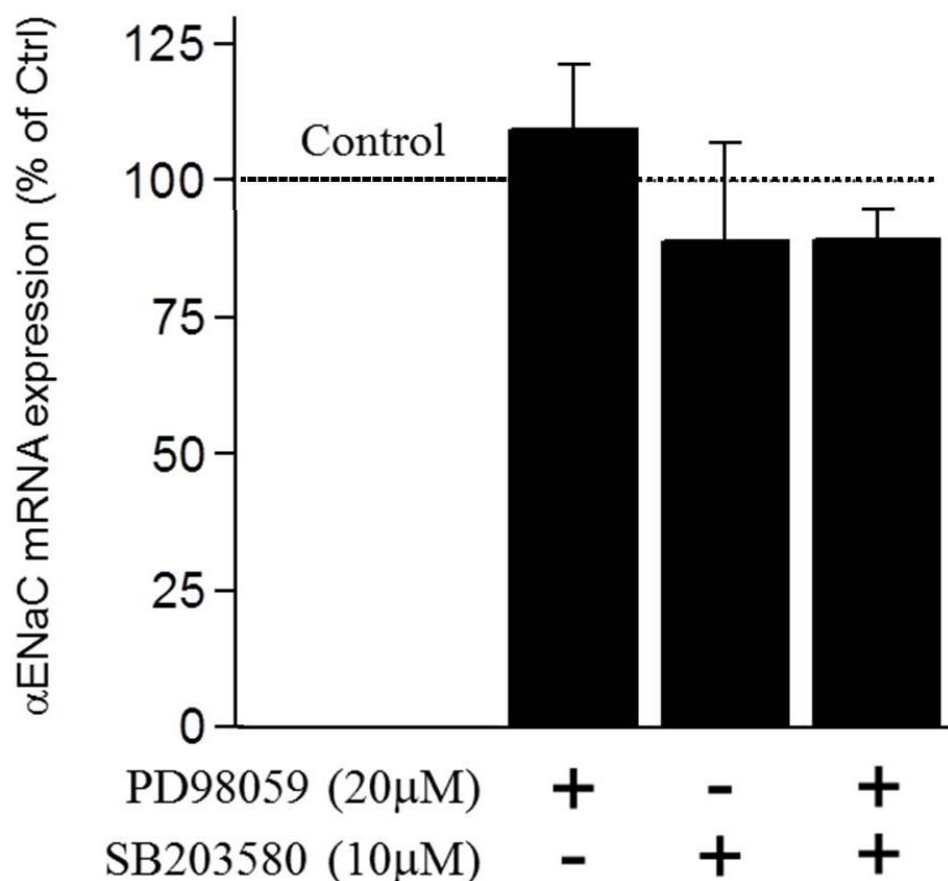
Annexe 5. Résultats complémentaires à la surexpression de hnRNP K.



Annexe Figure 1. Expression endogène de hnRNP K

Les protéines totales de cellules épithéliales alvéolaires ont été extraites. Le niveau d'expression de la protéine hnRNP K a été évalué par immunobuvardage de type Western.

Annexe 6. Résultats complémentaires à la modulation de l'ARNm α ENaC par différents stress



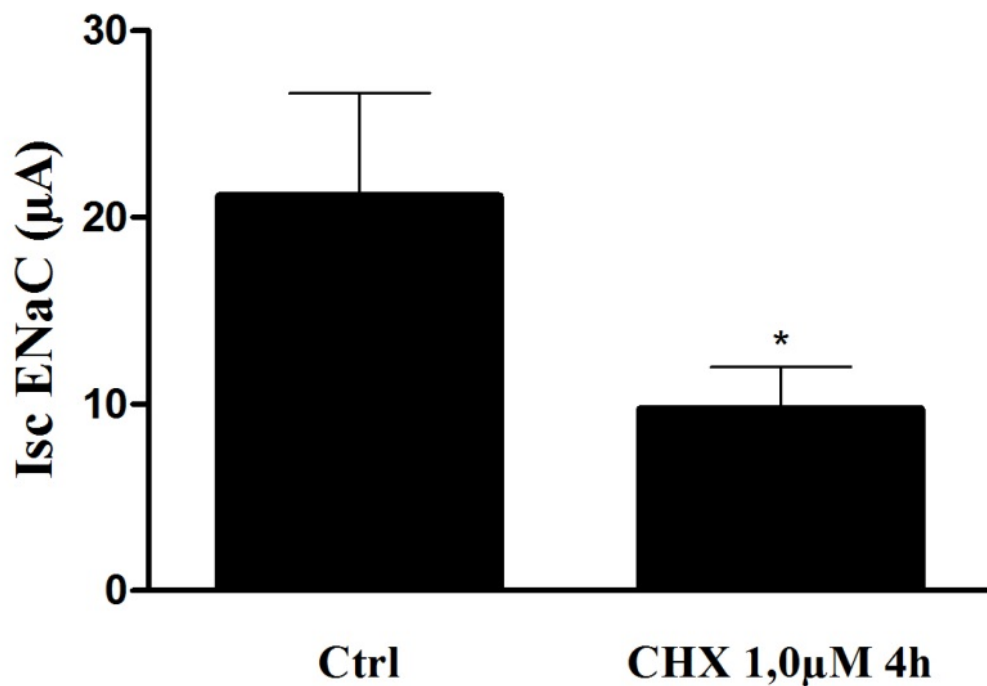
Annexe Figure 2. Effets des inhibiteurs de MAPK sur la modulation de l'expression de l'ARNm α ENaC par les LPS.

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées durant 5h avec les inhibiteurs PD98059 (inhibiteur de ERK) et SB203580 (inhibiteur de p38). Le pourcentage d'expression de l'ARNm α ENaC déterminé par Northern Blot est présenté pour chaque condition expérimentale. Les données sont présentées sous la forme de % \pm ESM comparées aux cellules non traitées suite à une normalisation avec la β -actine ($n \geq 3$).

Annexe 6 Matériels et Méthodes

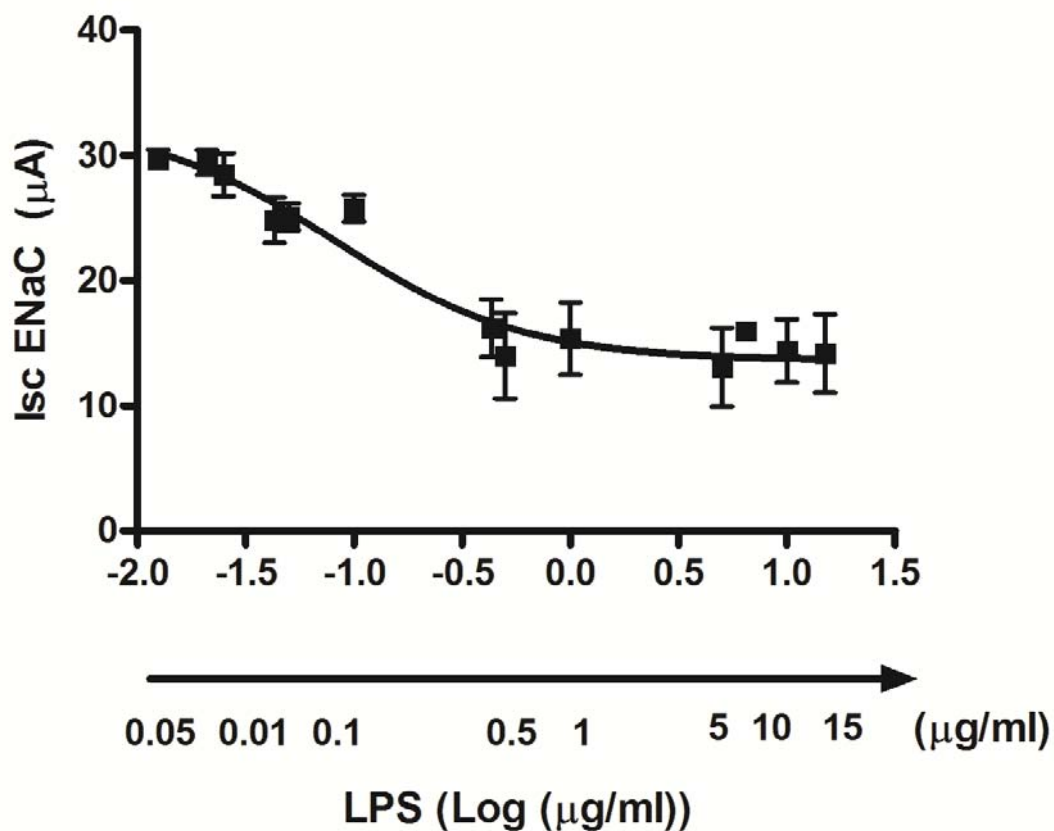
Mesure du courant transépithélial (Isc) en chambre de Ussing

Cette technique est basée sur les travaux effectués par notre laboratoire (Boncoeur et al., 2010; Dagenais et al., 2013). Brièvement, des cellules épithéliales alvéolaires cultivées sur des filtres Costar 4cm² (Costar Transwell) ont été cultivées durant quatre jours et traités pendant 4h avec de la cycloheximide 1,0μM ou des LPS 15μg/mL. Pour les mesures de courant, les filtres ont été montés dans une chambre de Ussing en contact avec un tampon physiologique chaud (NaCl 140mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, glucose 10mM et TES 10mM, pH 7.4) au niveau apical et basolatéral. Suite à une stabilisation du courant transépithélial, les monocouches de cellules ont été traitées du côté apical avec de l'amiloride 10μM, afin de mesurer le courant sensible à l'amiloride en condition contrôle ou de traitement. La mesure du courant est effectuée en appliquant une différence de potentiel (U) de 0mV, qui permet, lorsque le voltage est clampé à 1mV de façon intermittente, de mesurer la résistance (R) de la monocouche cellulaire en Ohm. Selon la loi d'Ohm, il est alors possible d'évaluer le courant transépithélial en μA.



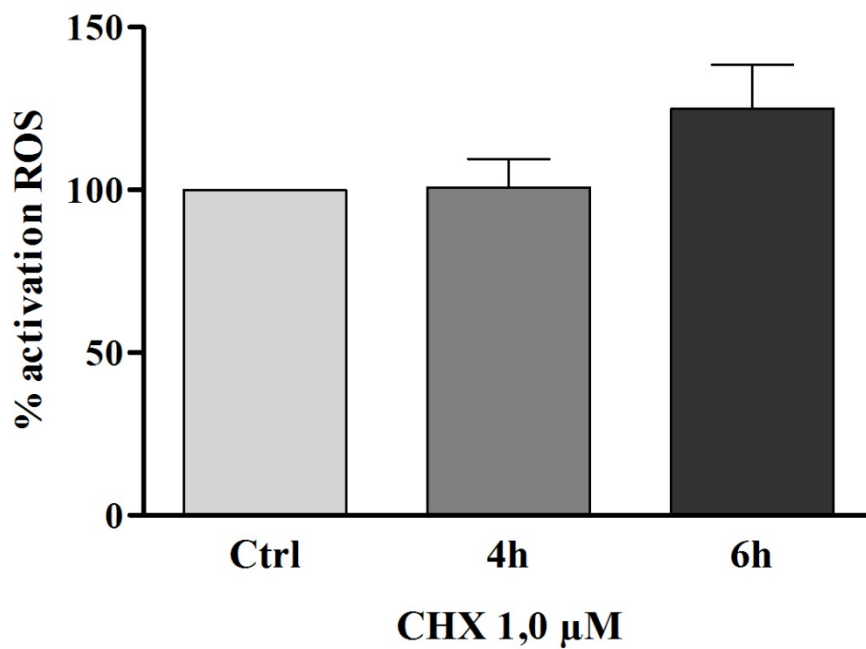
Annexe Figure 3. Modulation du courant transépithélial (ENaC) par la cycloheximide

Les cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire sur filtre ont été traitées à la cycloheximide 1,0µM durant 4h. Les mesures du courant transépithélial (ENaC) ont été effectuées en chambre de Ussing dans une solution physiologique, puis suite à l'obtention d'un courant stable, la variation du courant (ΔI) a été mesurée avant et après l'ajout d'amiloride (10µM) (n=4).



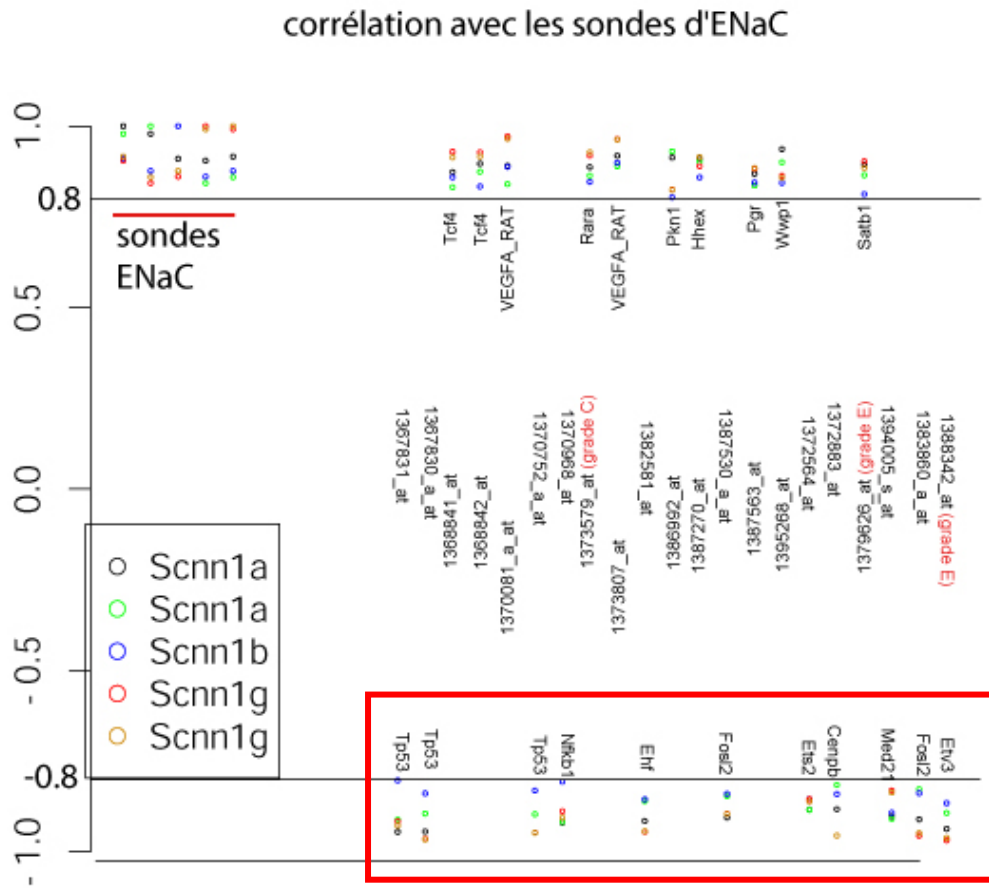
Annexe Figure 4. Modulation du courant transépithélial (ENaC) par les LPS

Les cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire sur filtre ont été traitées aux LPS durant 4h. Les mesures du courant transépithélial (ENaC) ont été effectuées en chambre de Ussing dans une solution physiologique, puis suite à l'obtention d'un courant stable, la variation du courant (ΔI) a été mesurée avant et après l'ajout d'amiloride (10μM) (n≥2).



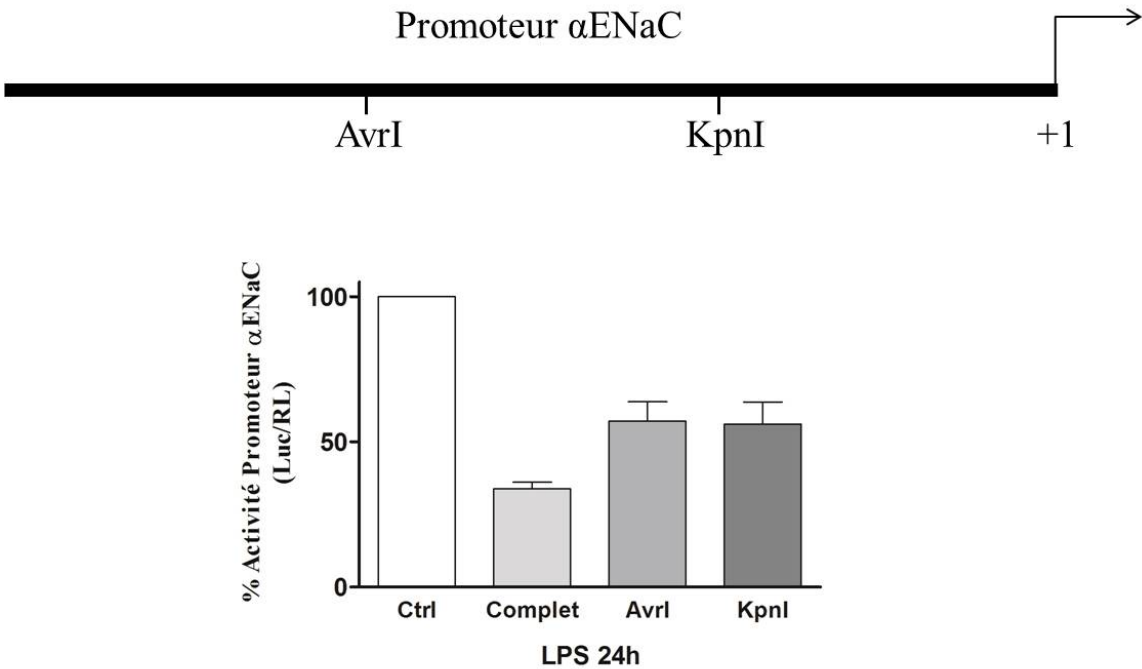
Annexe Figure 5. Sécrétion de dérivés réactifs de l'oxygène par la cycloheximide

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec de la cycloheximide 1,0μM durant 4 ou 6h. L'activation de dérivés réactifs de l'oxygène a été évaluée avec le kit OxiSelect™ Intracellular ROS Assay (Cell Biolabs inc.) et est présentée sous la forme de % ± ESM par rapport aux cellules non traitées (n=6).



Annexe Figure 6. Corrélation entre l'expression des ARNm ENaC et des facteurs de transcription

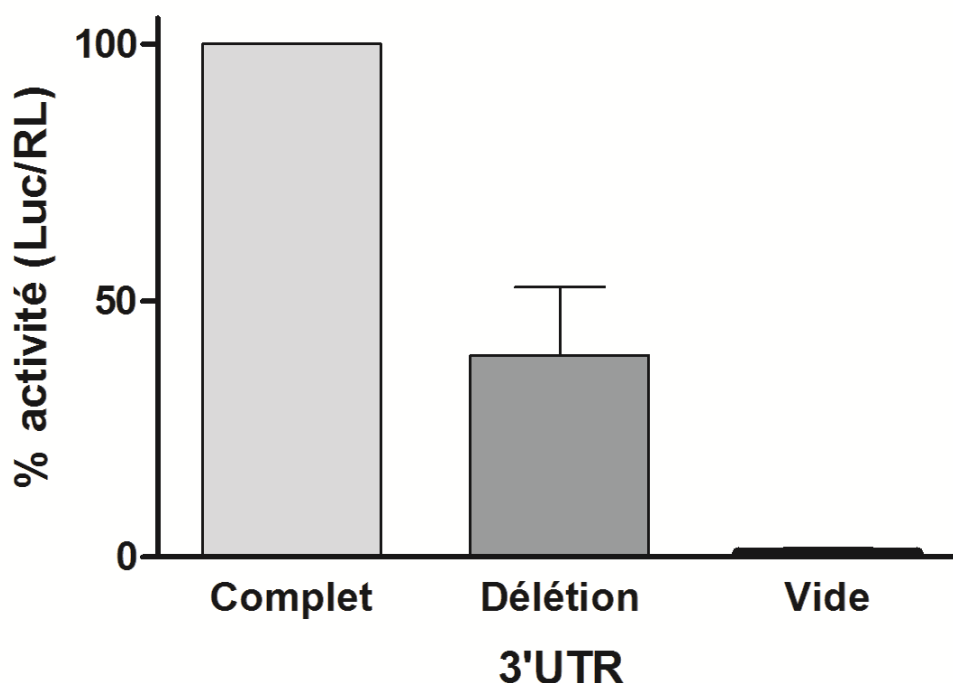
Lorsque l'expression de l'ARNm α ENaC est à la baisse, différents gènes appartenant à la famille des facteurs de transcription ETS sont exprimés.



Annexe Figure 7. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par les LPS sur différents mutants de délétion

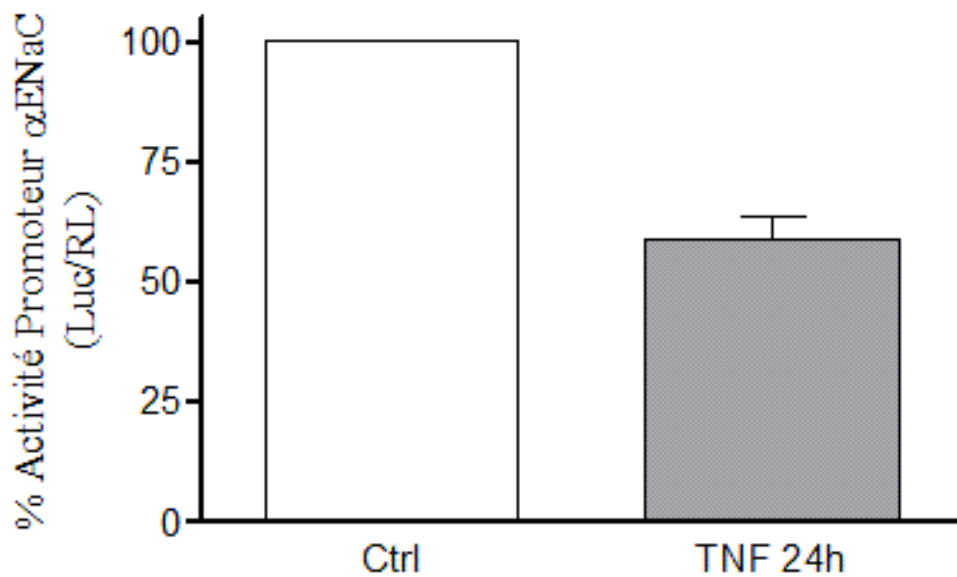
Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec une construction α ENaC-Luc où le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* est régulé par une région de 3-kb du promoteur α ENaC. Ces cellules ont été cotransfectées avec le vecteur pRL-SV40 codant pour la luciférase *Renilla reniformis* afin de normaliser le signal. Suite à la transfection (48h), les cellules ont été traitées avec des LPS 15 μ g/mL durant 24h. Les signaux émis par les luciférases *Photinus pyralis* et *Renilla reniformis* ont été mesurés à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corporation). L'activité du promoteur α ENaC est exprimée sous la forme du % \pm ESM de l'activité luciférase comparée aux cellules non traitées suite à la normalisation avec le signal de la *Renilla reniformis* (n \geq 9).

Annexe 7. Résultats complémentaires au rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm α ENaC dans la modulation de sa stabilité



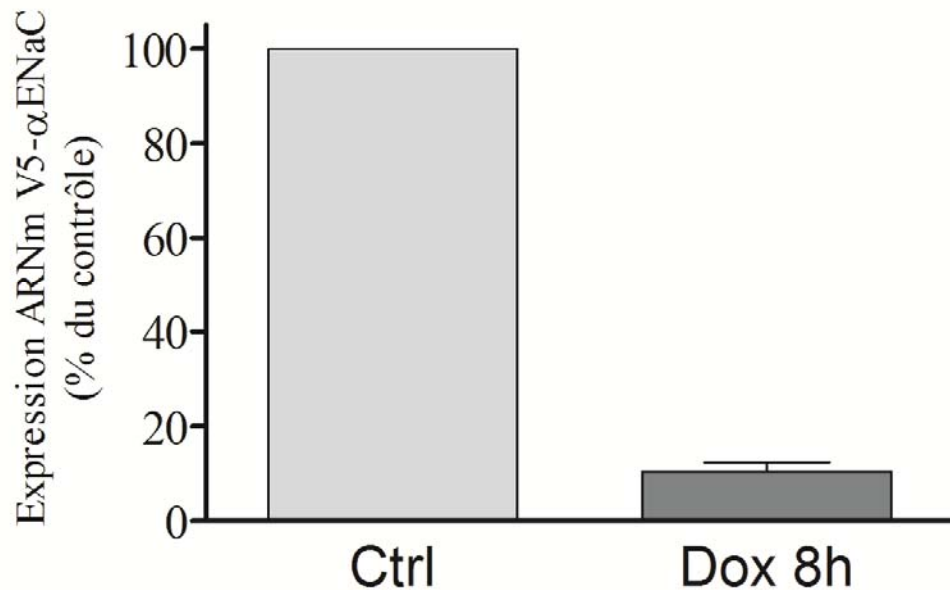
Annexe Figure 8. Modulation de l'activité luciférase de chimères composées de différents 3'UTR α ENaC

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées par électroporation avec des plasmides pTRE-tight codant pour le gène rapporteur de la luciférase de *Photinus pyralis* suivi des séquences du 3'UTR α ENaC complet (894bp), du 3'UTR α ENaC dépourvu de sa région 3' distale (374bp) ou vide. Les plasmides pTet-Off et pRL-SV40 ont été cotransfectés afin de permettre respectivement l'expression de pTRE-tight et la normalisation du signal luciférase mesurée à l'aide du Dual-Luciférase Reporter Assay System. L'activité Luc/RL est exprimée sous la forme de % \pm ESM comparés à la chimère Luc- 3'UTR α ENaC complet ($n \geq 2$).



Annexe Figure 9. Modulation de l'activité du promoteur α ENaC par le TNF- α

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec une construction α ENaC-Luc où le gène de la *Firefly Luciferase* est régulé par une région de 3-kb du promoteur α ENaC. Ces cellules ont été cotransfectées avec le vecteur pRL-SV40 codant pour la luciférase *Renilla reniformis* afin de normaliser le signal. Suite à la transfection (48h), les cellules ont été traitées avec du TNF- α 100ng/mL durant 24h. Les signaux émis par *Firefly Luciferase* et *Renilla reniformis* ont été mesurés à l'aide du Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corporation). L'activité du promoteur α ENaC est exprimée sous la forme du % \pm ESM de l'activité luciférase comparée aux cellules non traitées suite à la normalisation avec le signal de la *Renilla reniformis* (n=8).



Annexe Figure 10. Inhibition de l'expression de l'ARNm V5-αENaC par la doxycycline

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été transfectées avec le plasmide pTRE-tight codant pour l'épitope V5 en amont du cadre de lecture ouvert de l'ARNm αENaC et de son 3'UTR complet. Le plasmide pTet-Off a été co-transfecté afin d'exprimer l'ARNm V5-αENaC. Les cellules ont été traitées avec de la doxycycline 1.0µg/mL durant une période de 8h. L'expression de l'ARNm V5-αENaC a été quantifiée par RT-qPCR et exprimée en % d'expression de l'ARNm V5-αENaC comparé aux cellules non traitées ± ESM après la normalisation avec l'ARNm tTA-Ad (n=6).

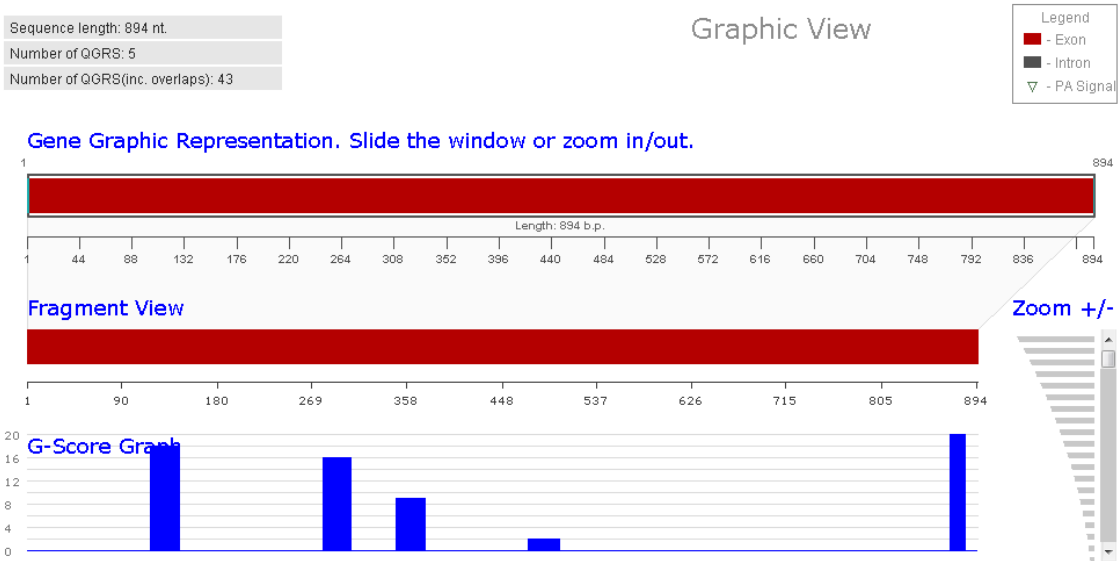
Annexe 8. Résultats complémentaires à la modulation de l'ARNm α ENaC par les protéines liant l'ARN

Promoteur α ENaC = Séquence riche en pyrimidine (CT-riche)

```
GTAATGATCAGAGGAAAAGACGAGTGTGTTGTTCTGTTTACAACCTGCTGCTCTTCCGCATTGTGACGAC
CGAAAACCTGGTTGGTTGTTTTGGAGGGTCAGTTTCCTTATCTGAAAAGTGGAGAAGGAGCCAGCCTCCCT
CGTCTTAAGGAAGGTCTCATGAATGTGTCAAGGTGTCTGTCAAACAGCCTAGCTAGCGGGCGGAACCCAG
GTTGACTGTTTCAAGAGTGAAGACGAGGCATTAGCTCAGAGCGGATCCTCTTATTTGTCTGGTAAACGCCT
TATTCCTGCCAGATTGAGCTGCCATGCCAGTCTCCAAGGGTGTCACTTGTAAATGGGTCCCTCCAGGGTGTG
ACTTGAAAATGGATCCCTCCTTCCACCTCCCCCCCCACCCGTGCTCCCCCACCCTGGTTCTTATCCCTG
TCCTCATTACCCTTATCTCACTGTATTTCAACTACCTGTTATGCAGGCCTGTTGCTTCCTATGAGCCTCT
GTGGCTGCTGGGTCTGTGTCTGCAGGTCTGGGGCACAGAGAATACTCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGAGAGAGTGCCTGGTAGGAAGAGGCAGTGTGCACACCCGGAGCATT
GTGGCTGCCCTCTCCAGGGCTCAAGGGAGGCTATCACTAGCAAGTTCTGCAGGGCCTGGGCTGTGTGAAT
GACTCTCCCGTGGCTCTTTACACTTTTGGGGTGGGAGTTTGAGGCTTTTACACCTGTGTGGTCACTGCTT
GCCTCTGTCTCCTCTAGCTGGCGTAGCTCGAGGGAGATTTTGGAGACAAACACAGCCCGGATGAAGGAGC
TTCTTAGTGTGCCACCCTCCTTGCCCCAGATACTGGCAAGGGCAGAGCTGGTGGTCTCTCCAGTATCT
GTCATCCCTGCCTGTCCCTGGGCTCTTGGTCTGTGCCCGCAGAGCTCTGCCTGGCCCCACGCACATTCC
TGCAACCCTGTGACCACAACAGGGGACATTACACATTCTGGCCTATCAGCCGATGGTGTCAAAAAGAAC
AGAATGTCCTAGGACCTGGCCCAGCCCTACTTCACCTGGGCCCTCCAGGCCTGGACAGGGCCAGGAA
GATGGGGTGAGAAGTTTAGAGCGAAGAGGATGGGGAAGAGGGTGGTGGGGTCCAGAGGTGCTCCCAGTTT
TGGGGGACCCATTCTCCTTTTCCCTCCAGGATCTTGGGTGTGAGGCTGACCTGGGATGACCTTGAGGGAC
CTCCATCAGAAGGGACCCTGTTTTTTGAGAGTCCACTTAAGCTTTCTTTCCCTGGCCATCTTGCCCTGAC
AGGGGAGTTCCTTTGGGACTGGCT CCCTCCTCTTCCCTCCTCCATCTTCCCTCAGCTCTTTGCCCAGT
CCTGTGCTGCTGTCTCTCTTTTCTGCCTTCCCTGTTCTCCTGGTTTCCCCACCTACTCTCAGCGATCCTC
CTTCCGCTTTTGCCTTCCCTGGCTTTTGTGTGTAGAATCCTTCTTCCCTGCACAGGTTCTCTAAGCCTCAC
CTGTCTCCTGTCCCTAGTCTCCTTGTAGTCAAGTTCGCCATCAGTCCCTGGCCGAAACTCTTCAGCAGGT
ACCCGGTTCACCTGTCCCAAGAGCCCTCCTCCCTGGAGAACTCCAGACCAGACTCCTCCTCCGACCCT
CCCCCTCTGCCCTGCTCACCTTAATGAGATGCTAATGAGGCTTCTGTGCTGCCATCCTTGCGGGTGG
CTGACGGGGCGGTCTCCAGAGCCAGGCACTGCACCTGTGAGGTGAGAGGGTGGAGAGGCTCCGCTGCCAGA
TTTAACTGGAAGGAACCAGTCAACAGCCAGCCACACTGGAAGCCGGGAGCAGGAGGCAGCTCCGGCCT
CCTGCAGCCCCGCGGTCCCCGAGGCAGAGAAGGCGGTAGCACGGAGCTGGAGGCCAGGGCTAGAGCCTAGA
GAAGAGGACCCAGGAGGAGACAGGGAAGGCAAGGGAGGAAGTGAAGCAGGATCAGAGAGCCTGGCACAGA
AAGGGAGACCCAAAGAGAAGCGGGAGTCAAGTGGGCCAAGAGGGCGTGAAAGCTGGAGCCAGTCAAACAG
TCCGGGAGGAAAAAGGGCAAGAGGGAGAGACGCTAAGCCAGGCAGTGCCTGCTGTGGGGACCCAGGGAG
GCGCTAGCGGGCAAACGAAGGTGGCCTTCGCTGTGAAGTCCAGTGGCCACTCCAGAGAAGCTCAATACTG
CTTGGTTGGCCCCGACTCCAGAAGGTGAGTGGCTCCTGAAAAGGTGGAGGAGGGTGGGAGGGAGAGTGA
ACTCAGCCTGGGATGCGGGCACGGTCCCGGACAGCCCATCTGCCTTACGCTAATGATGCTGGACCAC
ACCAGAGCCCTGAGCTCAACATTGACCTAGACCTTACGCCTCCA
```

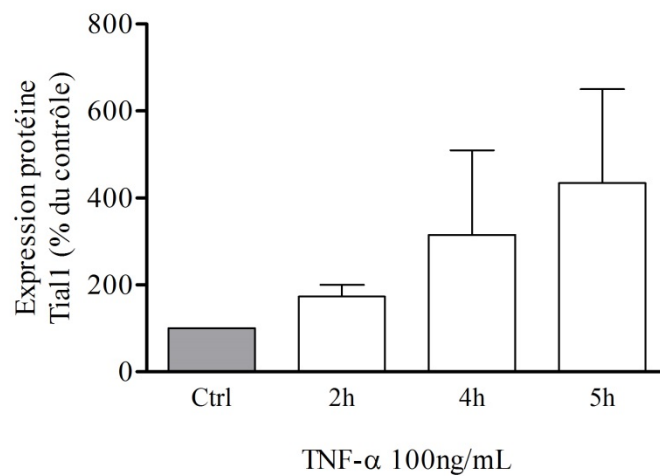
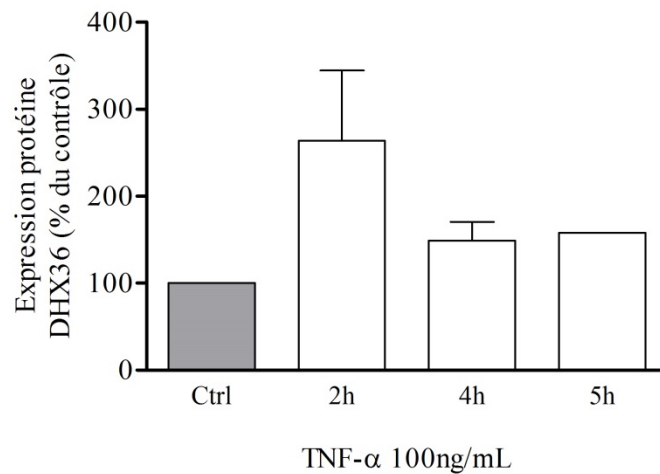
Annexe Figure 11. Identification de séquence riche en pyrimidines dans le promoteur α ENaC

On retrouve des séquences « CT-riche » dans le promoteur α ENaC correspondant à des sites de liaison potentiels pour la protéine hnRNP K.



Annexe Figure 12. Présence de régions quadruplex dans le 3'UTR α ENaC

On retrouve des régions quadruplex dans le 3'UTR α ENaC correspondant à des structures permettant la liaison avec la protéine DHX36.



Annexe Figure 13. Modulation de l'expression de DHX36 et TIAL1 par le TNF- α

Des cellules épithéliales alvéolaires ont été traitées avec du TNF- α 100ng/mL durant une période de 2h à 5h. Des immunobuvardages de type Western de DHX36, TIAL1 et β -actine ont été effectués. L'expression de DHX36 et TIAL1 a été quantifiée à l'aide d'un ratio protéine/ β -actine pour chaque temps étudié et exprimée en % d'expression comparée aux cellules non traitées \pm ESM. (n \geq 1)