

Université de Montréal

**Modulation du transport des fluides lors de lésions  
pulmonaires induites par la transplantation pulmonaire : études  
des mécanismes expliquant l'absence de réponse aux  $\beta$ -agonistes**

Par  
Chloé Richard  
Département de Médecine  
Faculté de Médecine

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

April 2006

© Chloé Richard, 2006





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Modulation du transport des fluides lors de lésions  
pulmonaires induites par la transplantation pulmonaire : études  
des mécanismes expliquant l'absence de réponse aux  $\beta$ -agonistes**

Présenté par :  
Chloé Richard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : \_\_\_\_\_ Denis DeBlois

Directeur de recherche : \_\_\_\_\_ Yves Berthiaume

Codirecteur de recherche : \_\_\_\_\_ Pasquale Ferraro

Membre du jury : \_\_\_\_\_ Suhayla Mukaddam-Daher

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_

## Sommaire

En post-transplantation pulmonaire, on observe un phénomène appelé lésion d'ischémie-reperfusion qui entraîne un œdème d'importance variable pouvant compromettre la survie des patients. L'épithélium alvéolaire joue un rôle important pour la résorption de cet œdème. Les agents  $\beta_2$ -adrénergiques, telle la terbutaline, sont souvent utilisés en clinique pour stimuler la clairance alvéolaire. Par contre, il a été précédemment démontré qu'il n'y a pas de stimulation de la clairance liquidienne dans le poumon transplanté de chien suite à une stimulation avec la terbutaline. L'objectif de ce travail de maîtrise était d'évaluer si la non-réponse des poumons transplantés à la terbutaline, un agent  $\beta_2$ -adrénergique, pouvait s'expliquer par une modification de la cascade  $\beta$ -adrénergique. L'hypothèse de travail était que l'inflammation, présente en post-transplantation pulmonaire, pouvait diminuer le nombre de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ou les rendre potentiellement dysfonctionnels. Premièrement, il a été déterminé qu'il n'y avait pas de diminution du nombre ou de l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans le poumon transplanté. Deuxièmement, il a été démontré qu'un traitement de dbcAMP+aminophylline, permettant de contrecarrer la machinerie des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, ne permettait pas de stimuler la clairance alvéolaire dans le poumon transplanté. L'impact négatif de la transplantation pulmonaire sur  $\alpha$ ENaC, une protéine jouant un rôle central pour le transport de  $\text{Na}^+$ , a ensuite été confirmé. Par la suite, l'impact de molécules inflammatoires sur la réponse des cellules alvéolaires aux agonistes  $\beta$ -adrénergiques a été exploré *in vitro*. L'accumulation d'AMPc dans les cellules alvéolaires en culture contrôles et traitées au TNF $\alpha$  pendant 24hres suite à une stimulation à la terbutaline et à la forskoline a été comparée. Le traitement au TNF $\alpha$  semblait par ailleurs diminuer l'efficacité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique à répondre à la terbutaline. Les résultats faits en chambre de Ussing, quant à eux, démontraient l'impact négatif d'un traitement au TNF $\alpha$  sur le transport du sodium suite à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. En effet, une cinétique différente de réponse à la terbutaline, ainsi qu'un courant amiloride-sensible fortement diminué ont été observés. En conclusion, l'état inflammatoire présent en post-transplantation pulmonaire ne semble pas affecter de façon importante le système  $\beta$ -adrénergique, mais affecte à la baisse le canal épithélial sodique (ENaC). Il semble donc que l'incapacité des poumons transplantés à répondre à la terbutaline lors d'un état inflammatoire sévère soit davantage causée par cette chute d'ENaC.

Mots-clés :

Transplantation pulmonaire, clairance alvéolaire, récepteur  $\beta$ -adrénergique, terbutaline, lésion d'ischémie-reperfusion.

## Summary

Ischemia-reperfusion injury of the lung and its associated high permeability pulmonary edema are a constant phenomenon after lung transplantation. The alveolar epithelium is recognized to play an important role in the resolution of this edema. Recently it has been suggested that  $\beta_2$ -adrenergic agonists could accelerate the resolution of pulmonary edema in the setting of acute lung injury. It has been previously shown however that terbutaline, a  $\beta_2$ -adrenergic agonist, could not stimulate alveolar liquid clearance in an ischemia-reperfusion lung transplantation model. The objective of this study was to determine if the lack of response to a  $\beta_2$ -adrenergic agonist could be explained by changes in  $\beta$ -adrenergic receptor cascade in transplanted lungs. The hypothesis was the inflammation present after lung transplantation could decrease the number of  $\beta_2$ -adrenergic receptor or disrupt its cascade. Firstly, it has been determined that there was no change in the number or affinity of  $\beta$ -adrenergic receptor in the transplanted lungs. It has also been shown that the transplanted lungs do not respond to the dbcAMP+aminophylline treatment, which allows stimulation of lung liquid clearance without acting through the receptor. The negative impact of lung transplantation on  $\alpha$ ENaC, a protein that plays a critical role in the sodium transport in the lung, was also confirmed. Secondly, the potential impact of inflammatory molecules, such as  $\text{TNF}\alpha$ , on the response of alveolar cells to terbutaline stimulation was explored *in vitro*. The cAMP accumulation of control cells and cells treated for 24 hours with  $\text{TNF}\alpha$  upon stimulation with terbutaline and forskoline was compared.  $\text{TNF}\alpha$  decreased the efficiency of  $\beta_2$ -adrenergic receptor to respond to terbutaline. Preliminary results in Ussing chamber have shown that  $\text{TNF}\alpha$ -treated alveolar cells have a reduced kinetic response to terbutaline stimulation and a decreased amiloride-sensitive current. In conclusion, the inflammatory state resulting from lung transplantation does not appear to have an important impact on the  $\beta$ -adrenergic system, but do have a negative impact on the expression of the epithelium sodium channel ENaC. It appears that the non-response of the transplanted lungs to terbutaline when in presence of a severe inflammatory state may results from the downregulation of ENaC.

**Keywords:** lung transplant, terbutaline, alveolar fluid clearance,  $\beta$ -adrenergic receptor, ischemia-reperfusion injury.

## Table des matières

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Anatomie fonctionnelle du système respiratoire .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Les voies respiratoires .....	1
1.1.2 Les alvéoles pulmonaires .....	2
1.1.3 L'épithélium alvéolaire .....	3
1.1.4 Le liquide pulmonaire .....	4
<b>1.2 Transport du sodium au niveau de l'épithélium pulmonaire.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 L'importance de la clairance liquidienne pour le maintien de l'homéostasie pulmonaire .....	5
1.2.2 Le fonctionnement du transport du sodium au niveau de l'épithélium alvéolaire .....	6
1.2.3 Rôle et structure d'ENaC .....	9
1.2.3.1 Expression et association des sous-unités d'ENaC .....	9
1.2.3.2 Les canaux cationiques non-spécifiques (NSCC) .....	10
1.2.4 Rôle et structure de la pompe Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase.....	11
1.2.4.1 Expression des sous-unités de la pompe .....	11
1.2.4.2 Modulation de la pompe.....	11
<b>1.3 La transplantation pulmonaire : modalité thérapeutique pour les patients atteints de la fibrose kystique .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 La fibrose kystique (FK).....	13
1.3.2 La transplantation pulmonaire .....	14
1.3.2.1 Types de maladies nécessitant une transplantation pulmonaire .....	15
1.3.2.2 Moyenne de survie .....	15
1.3.3 Complications en post-transplantation pulmonaire.....	15
<b>1.4 La lésion d'ischémie-reperfusion .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Impact de la lésion d'ischémie-reperfusion .....	16
1.4.2 Événements moléculaires impliqués dans la LIRI.....	18
1.4.3 Impact de l'inflammation sur la clairance alvéolaire lors de lésion d'ischémie-reperfusion .....	21
<b>1.5 Modulation de la clairance alvéolaire par les récepteurs β-adrénergiques.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Rôles et types de récepteurs adrénergiques.....	22
1.5.2 Récepteurs β-adrénergiques .....	23
1.5.2.2 Voies de signalisation des récepteurs β-adrénergiques .....	24
1.5.2.3 Agonistes β2-adrénergiques .....	25
1.5.3 Rôle des récepteurs β <sub>2</sub> -adrénergiques au niveau de l'épithélium alvéolaire .....	26
1.5.4 Relation entre le CFTR et les récepteurs β <sub>2</sub> -adrénergiques.....	27
1.5.5 Impact de l'inflammation sur la modulation de la clairance alvéolaire par les agonistes β-adrénergiques .....	28
<b>1.6 Hypothèses et objectifs.....</b>	<b>29</b>

<b>2</b>	<b>MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>31</b>
2.1	<b>Transplantation unipulmonaire chez le chien .....</b>	<b>31</b>
2.1.1	Animaux .....	31
2.1.2	Procédure chirurgicale pour le prélèvement des poumons du donneur.....	31
2.1.3	Procédure chirurgicale pour la greffe chez le receveur.....	32
2.2	<b>Mesure de clairance <i>in vivo</i> .....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Préparation de l'instillat, instillation et échantillonnage.....	33
2.2.2	Dosage de protéines par Biuret.....	33
2.2.3	Mesure de la fraction d'eau du liquide alvéolaire par la méthode gravimétrique .....	34
2.2.4	Calcul de la clairance.....	34
2.3	<b>Études de liaison pour les récepteurs <math>\beta</math>-adrénergiques.....</b>	<b>35</b>
2.3.1	Isolation des membranes et dosage de protéines.....	35
2.3.2	Mise au point des conditions pour les expériences de liaison.....	36
2.4	<b>Mesures gravimétriques .....</b>	<b>38</b>
2.4.1	Mesure du poids mouillé/poids sec.....	39
2.4.2	Dosage de l'hémoglobine dans le sang et le surnageant.....	39
2.5	<b>Quantification de l'expression de CFTR et d'<math>\alpha</math>ENaC par Northern blot.....</b>	<b>39</b>
2.5.1	Purification de l'ARN.....	40
2.5.2	Northern blot.....	40
2.6	<b>Culture cellulaire .....</b>	<b>41</b>
2.6.1	Chirurgie expérimentale.....	41
2.6.2	Traitement des poumons et purification des cellules .....	41
2.6.3	Mise en culture des cellules .....	42
2.7	<b>Mesure de cAMP intracellulaire par EIA.....</b>	<b>42</b>
2.7.1	Traitement et stimulation des cellules.....	43
2.8	<b>Mesure du courant de court-circuit des cellules de type II .....</b>	<b>43</b>
2.8.1	Traitement et stimulation des cellules.....	44
2.8.2	Mesure du courant amiloride-sensible .....	44
2.9	<b>Statistiques.....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>46</b>
3.1	<b>Suivi hémodynamique des chiens avant et après la transplantation pulmonaire.....</b>	<b>46</b>
3.2	<b>Effet de la transplantation pulmonaire sur le nombre de récepteurs <math>\beta</math>-adrénergiques dans les poumons .....</b>	<b>47</b>
3.3	<b>Effet de la transplantation pulmonaire sur l'affinité des récepteurs <math>\beta</math>-adrénergiques pour l'ICI 118 551.....</b>	<b>48</b>
3.4	<b>Effet d'un traitement combiné de dbcAMP+aminophylline sur la clairance alvéolaire suite à une transplantation pulmonaire.....</b>	<b>49</b>
3.5	<b>Effet de la transplantation pulmonaire et du traitement combiné dbcAMP+ aminophylline sur le ratio poids mouillé/poids sec des poumons.....</b>	<b>50</b>
3.6	<b>Effet de la transplantation pulmonaire sur l'expression de CFTR et d'<math>\alpha</math>-ENaC .....</b>	<b>51</b>
3.7	<b>Effet d'un traitement de 24 heures au TNF<math>\alpha</math> 100ng/mL sur la stimulation des cellules ATII par la terbutaline et par la forskoline .....</b>	<b>52</b>

3.8	Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ 100ng/mL sur le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline en chambre de Ussing .....	53
<b>FIGURE 9</b>	.....	<b>55</b>
<b>FIGURE 10</b>	.....	<b>56</b>
<b>FIGURE 11</b>	.....	<b>57</b>
<b>FIGURE 12</b>	.....	<b>58</b>
<b>FIGURE 13</b>	.....	<b>59</b>
<b>FIGURE 14</b>	.....	<b>60</b>
<b>FIGURE 15</b>	.....	<b>61</b>
<b>FIGURE 16</b>	.....	<b>62</b>
<b>FIGURE 17</b>	.....	<b>63</b>
<b>FIGURE 18</b>	.....	<b>64</b>
<b>FIGURE 19</b>	.....	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>66</b>
4.1	Absence de stimulation de la clairance alvéolaire par l'AMPc en post-transplantation pulmonaire.....	67
4.1.1	Absence de modulation du nombre de récepteurs $\beta$ -adrénergiques en post-transplantation pulmonaire.....	68
4.1.2	Incapacité d'un traitement combiné de dbcAMP+aminophylline à stimuler la clairance alvéolaire dans un poumon transplanté.....	69
4.2	Impact de la transplantation pulmonaire sur l'expression des protéines impliquées dans le transport du sodium.....	72
4.2.1	Modulation de l'expression d' $\alpha$ ENaC .....	72
4.2.2	Absence de détection de CFTR.....	74
4.3	Impact de l'inflammation sur la réponse aux agents $\beta$ -adrénergiques <i>in vitro</i> .....	75
4.3.1	Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ sur la cascade des récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans des cellules alvéolaires .....	76
4.3.2	Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ sur le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires stimulées à la terbutaline en chambre de Ussing .....	77
<b>5</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>80</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>XIII</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Les principaux types de récepteurs adrénergiques	p.23
<b>Tableau 2 :</b>	Compilation des ratios de récepteurs $\beta$ -adrénergiques selon les espèces	p.24
<b>Tableau 3 :</b>	Suivi hémodynamique des chiens avant et après la transplantation unipulmonaire gauche	p.54

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Schéma des voies aériennes selon Weibel.....	p. 1
<b>Figure 2 :</b>	Barrière hémato-pulmonaire.....	p. 2
<b>Figure 3 :</b>	Épithélium alvéolaire.....	p. 4
<b>Figure 4 :</b>	Représentation schématique des principaux canaux et transporteurs présents dans les cellules alvéolaires et permettant les mouvements ioniques.....	p. 7
<b>Figure 5 :</b>	Voie de signalisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	p. 24
<b>Figure 6 :</b>	Structure de la molécule de terbutaline.....	p. 26
<b>Figure 7 :</b>	Structure de la molécule de forskoline.....	p. 26
<b>Figure 8 :</b>	Structure de la molécule de dibutyryl cyclic-AMP.....	p. 26
<b>Figure 9 :</b>	Oxygénation des chiens pendant l'expérience.....	p. 55
<b>Figure 10 :</b>	Compilation des résultats des études de liaison.....	p. 56
<b>Figure 11 :</b>	Quantification du nombre de récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans les poumons de chiens.....	p. 57
<b>Figure 12 :</b>	Comparaison des constantes d'affinité du ICI 118 551 entre le poumon natif et le poumon transplanté.....	p. 58
<b>Figure 13 :</b>	Clairance alvéolaire dans le poumon transplanté.....	p. 59
<b>Figure 14 :</b>	Mesures gravimétriques des poumons natifs et transplantés.....	p. 60
<b>Figure 15 :</b>	Résultats de Northern blot pour $\alpha$ ENaC.....	p. 61
<b>Figure 16 :</b>	Accumulation d'AMPc intracellulaire suite à la stimulation des cellules alvéolaires avec la terbutaline $10^{-4}$ M.....	p. 62
<b>Figure 17 :</b>	Accumulation d'AMPc intracellulaire suite à la stimulation des cellules alvéolaires avec la forskoline $10^{-5}$ M.....	p. 63

- Figure 18 :** Résultats préliminaires de l'effet d'un traitement de 24 hres au TNF $\alpha$  sur le courant généré par des cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline..... p. 64
- Figure 19 :** Effet d'un traitement de 24 hres au TNF $\alpha$  sur le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline..... p. 65

## Liste des sigles et abréviations

AC	Adénylate cyclase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALC	<i>Alveolar Liquid Clearance</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	Peptide natriuritique atrial ou peptide auriculaire natriuritique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASL	<i>Airway Surface Liquid</i>
ATI	<i>Alveolar type I cell</i>
ATII	<i>Alveolar type II cell</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CMV	cytomégalovirus
cpm	<i>Count per minute</i>
dbcAMP	<i>Dibutyryl cyclic acid monophosphate</i>
dCTP	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxyde synthase</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FBS	<i>Foetal bovine serum</i>
FK	Fibrose Kystique
GDP	Guanosine diphosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
[H] <sup>3</sup> DHA	3H-dihydroalprenolol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
iNOS	<i>Inductible nitric oxyde synthase</i>
ICAM-1	<i>inter-cellular adhesion molecule-1</i>
ICYP	Iodo cyano pindolol
IgG	Immunoglobuline G
IL-1 $\beta$ , -2, -6, -8, -11, -12, -17	Interleukines

IFN- $\gamma$	Interféron gamma
$I_{sc}$	Courant de court-circuit
$K_i$	Constante d'inhibition
LIRI	<i>Lung Ischemia-Reperfusion Injury</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MIP-1, -2 $\alpha$	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1, -2alpha</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
$Na^+ / HCO_3^-$	Co-transporteur sodium/bicarbonate
$Na^+ / K^+$ ATP ase	Pompe sodium/potassium adénosine triphosphate
$Na^+ / K^+ / 2Cl^-$	Co-transporteur sodium/potassium/2 chlores
NO	Monoxyde d'azote
nNOS	<i>Neuronal nitric oxyde synthase</i>
NSCC	<i>Non selective cationic channel</i>
$O_2^-$	Radical superoxyde
$OH^-$	Radical hydroxyl
$ONOO^-$	Peroxynitrite
PCL	<i>Peri-Ciliary Liquid</i>
PGF	<i>Primary Graft Failure</i>
PKA	Protéine kinase A
RANTES	Cytokine
$R_{te}$	Résistance transépithéliale
siRNA	<i>Silencer Ribonucleic Acid</i>
SOD	Superoxyde dismutase
SRDA	Syndrome de détresse respiratoire aigu
TNF $\alpha, \beta$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha, bêta</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential channels</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
$V_{te}$	Différence de potentiel transépithéliale

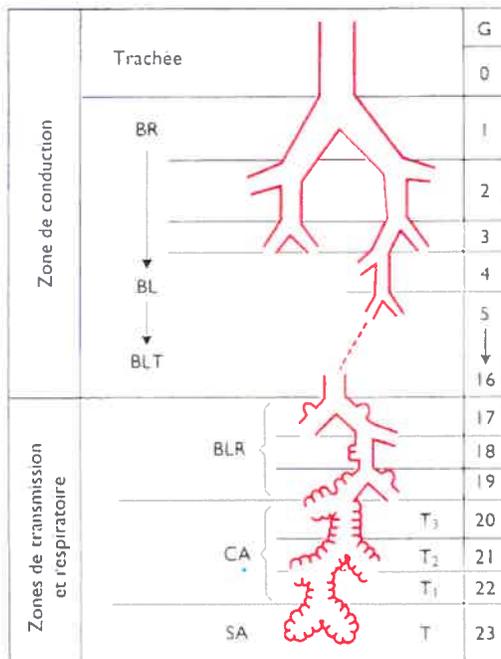
# 1 Introduction

## 1.1 Anatomie fonctionnelle du système respiratoire

S'il est une chose dont l'organisme dépend, c'est l'oxygène. En effet, il est possible de se passer d'eau et de nourriture pour quelques temps, mais le corps humain ne peut se passer d'oxygène. De cette dépendance fonctionnelle absolue découle la fonction principale du système respiratoire : l'apport d'oxygène et l'excrétion de gaz carbonique, déchet du métabolisme.

### 1.1.1 Les voies respiratoires

Le système respiratoire se divise en deux zones distinctes, chacune possédant un rôle défini : la zone de conduction et la zone respiratoire. La zone de conduction comprend toutes les voies respiratoires responsables de l'arrivée d'oxygène dans la zone respiratoire. Elle est composée de structures relativement rigides qui permettent de purifier, humidifier et réchauffer l'air inspiré. Elle s'étend du nez, en passant par le pharynx, le larynx, la trachée, l'arbre bronchique, puis se termine dans les bronchioles terminales. Ensuite, cet air dépourvu de poussières et de bactéries arrive dans la zone respiratoire, siège des échanges gazeux.<sup>56,88</sup>



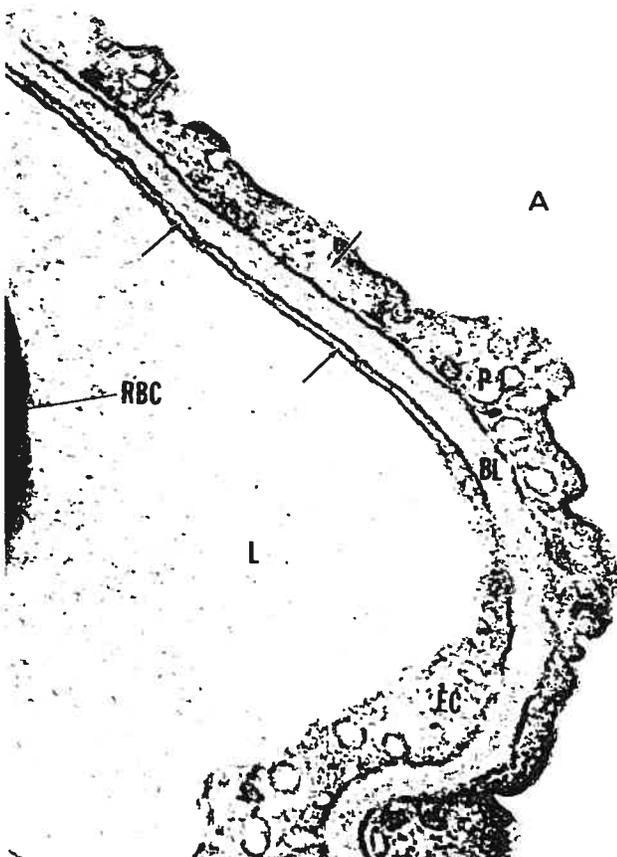
**Figure 1** : Schéma des voies aériennes selon Weibel. Les 16 premières générations de conduits forment la zone de conduction, alors que les 7 dernières forment la zone respiratoire.

BR : bronche, BL : bronchiole, BLT : bronchiole terminale, BLR : bronchiole respiratoire, CA : canal alvéolaire, SA : sac alvéolaire.<sup>134</sup>

La zone respiratoire, quant à elle, se compose de structures microscopiques ; c'est-à-dire des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des alvéoles. Comme son nom l'indique, son rôle est de permettre les échanges gazeux entre le sang et l'air.<sup>88</sup>

### 1.1.2 Les alvéoles pulmonaires

La paroi des alvéoles, appelée membrane alvéolo-capillaire, est le lieu précis des échanges gazeux entre l'air et le sang. Cette paroi est composée d'un épithélium alvéolaire qui joue un rôle majeur au niveau des échanges gazeux et de l'homéostasie du liquide pulmonaire. De l'autre côté de la membrane alvéolo-capillaire se trouve des capillaires dans lesquels passe le sang qui doit être oxygéné. La surface totale disponible pour effectuer les échanges gazeux chez l'humain est impressionnante : environ  $100\text{m}^2$ .<sup>134</sup> La paroi des alvéoles est majoritairement constituée de cellules épithéliales appelées pneumocytes, épithéliocytes ou cellules alvéolaires. Il existe deux types de pneumocytes et chacun possède un rôle qui lui est propre.



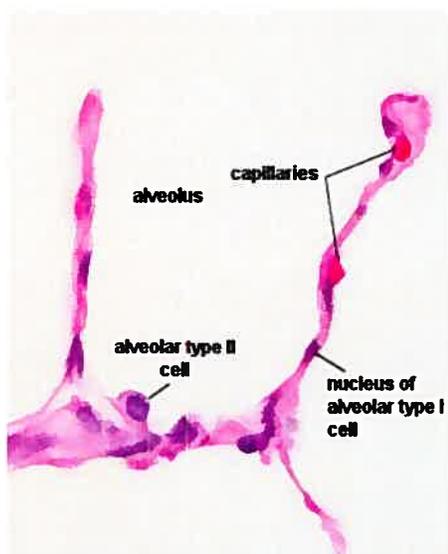
**Figure 2 :** Barrière hémato-pulmonaire. La barrière hémato-pulmonaire se compose des pneumocytes de type I (P1), des cellules endothéliales des capillaires (EC), ainsi que d'une très fine lame basale intercalaire (BL). De chaque côté de cette barrière se trouve, d'une part, l'espace alvéolaire (A) qui est vide, et d'autre part, la lumière du capillaire (L) qui laisse voir une partie de globule rouge (RBC). Comme on peut le remarquer, les cellules qui composent la barrière hémato-pulmonaire possèdent un cytoplasme très peu développé afin de former une structure qui soit la plus fine possible.<sup>52</sup>

### 1.1.3 L'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est composé de deux types de pneumocytes : les cellules alvéolaires de type I (ATI) et de type II (ATII). De part l'expression différentielle des protéines au niveau de leurs membranes apicale et basolatérale, ces cellules forment un épithélium que l'on dit polarisé.<sup>53</sup> En effet, cette différence de composition protéique permet un transport transépithélial d'électrolytes et d'eau, permettant ainsi la réabsorption de liquide présent dans les alvéoles.

Les cellules ATI sont des cellules épithéliales squameuses de forme allongée qui occupe plus de 95% de la surface de l'alvéole. Elles sont aussi très minces, de sorte que les cellules endothéliales des capillaires sont par endroits tellement rapprochés des cellules ATI, que leurs lames basales sont fusionnées. Ainsi, cette barrière alvéolo-capillaire est d'épaisseur minimale, entre 0,5 à  $1\mu\text{m}$ <sup>134</sup>, et permet aux gaz de diffuser aisément.

Les cellules ATII, quant à elles, sont des cellules épithéliales de forme cuboïde qui occupent de 2 à 5% de la surface de l'alvéole. Elles sont granuleuses et contiennent des inclusions lipidiques.<sup>56</sup> Leur rôle est de synthétiser et recycler le surfactant, un mélange complexe de plusieurs lipides, de protéines et d'ions qui permet de diminuer la tension de surface du film liquidien qui recouvre les alvéoles. En effet, le surfactant empêche les alvéoles de s'affaisser. Les cellules ATII ont aussi la capacité de se différencier en cellules ATI, servant ainsi à la régénération de l'épithélium pulmonaire soit au cours du développement normal<sup>4</sup> ou lors de lésion pulmonaire lorsque la membrane basale est dénudée.<sup>3</sup> Il est reconnu que les cellules ATII possèdent également un rôle important dans la clairance liquidienne des poumons.<sup>47,53,54</sup>



**Figure 3** : Épithélium alvéolaire. Les cellules ATI sont de forme allongée et aplatie, comparativement aux cellules ATII qui sont de forme cuboïde. (Internet :<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corelpages/respiratory/respir.htm#lablung>)

#### 1.1.4 Le liquide pulmonaire

Au niveau des voies aériennes, on retrouve le liquide de surface des voies aériennes (ASL). L'ASL se divise en deux composantes : le mucus et le liquide périciliaire. Le mucus est sécrété par les cellules épithéliales à gobelet et par des petites glandes sous muqueuses. Les cellules à gobelet se retrouvent à la surface de l'épithélium pulmonaire et sont présentes dans les dix premières générations de l'arbre bronchique.<sup>135</sup> Le rôle du mucus est de capter les particules et les bactéries de l'air afin qu'elles ne se retrouvent pas dans les alvéoles. Le mucus voyage du bas des voies aériennes vers le haut grâce aux cellules épithéliales ciliées. Il est dirigé vers le larynx où il peut être expulsé par la toux ou avalé. On appelle ce mouvement de mucus la clairance mucociliaire. Le liquide périciliaire (PCL) est le liquide dans lequel baignent les cils des cellules épithéliales ciliées. Ces cils effectuent un battement qui permet au mucus de voyager vers le larynx à une vitesse de 1 cm/min. Le PCL permet de garder le mucus à une distance optimale de l'épithélium pulmonaire afin d'effectuer la clairance mucociliaire. La consistance et la composition ionique de ce liquide doivent être finement régulées afin de permettre une clairance mucociliaire efficace et le maintien de certaines propriétés anti-infectieuses du mucus.

Au niveau de l'alvéole, les cellules qui composent l'épithélium alvéolaire ont pour rôle le maintien d'un mince film liquidien. C'est grâce à leur capacité de transport ionique que les cellules composant l'épithélium alvéolaire sont capables de réguler la composition de ce liquide et ainsi d'assurer l'homéostasie du liquide pulmonaire.

## **1.2 Transport du sodium au niveau de l'épithélium pulmonaire**

### 1.2.1 L'importance de la clairance liquidienne pour le maintien de l'homéostasie pulmonaire

La fonction pulmonaire normale et l'intégrité des tissus pulmonaires dépendent tous deux du maintien de l'équilibre des fluides aux niveaux des poumons. Cette balance liquidienne est maintenue grâce à du transport actif d'ions<sup>36</sup> qui permet à l'épithélium pulmonaire de maintenir l'espace alvéolaire relativement exempt de liquide afin de permettre une fonction optimale du système respiratoire.

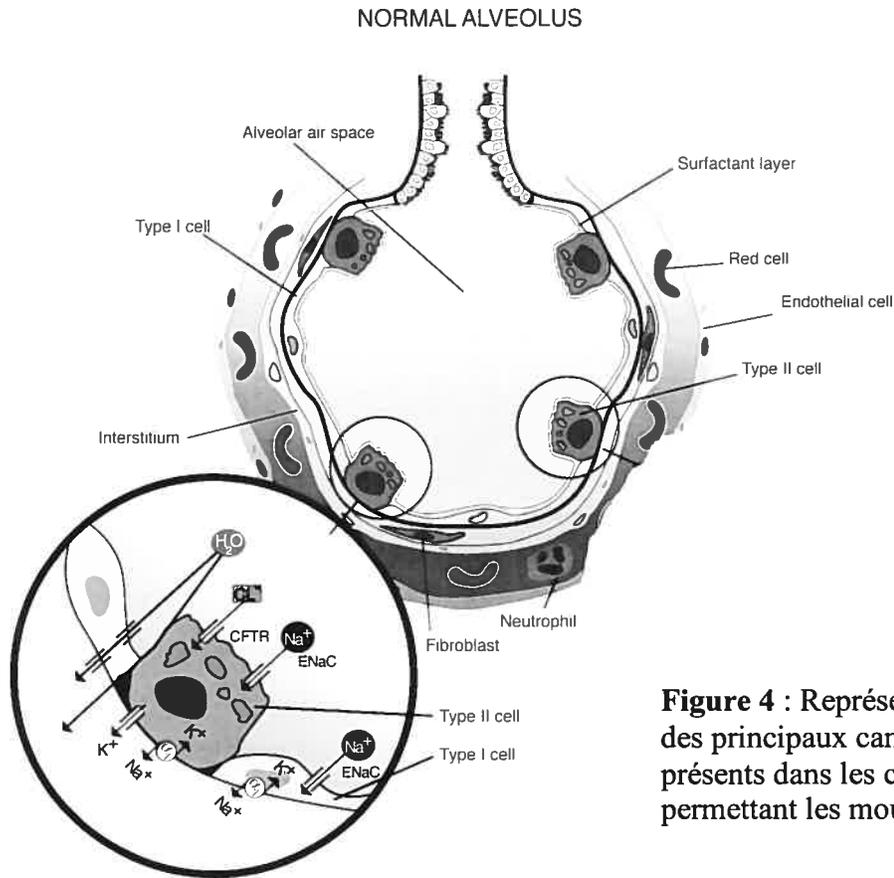
L'importance du transport ionique pour se débarrasser d'un excès de liquide présent dans les alvéoles est illustrée lors de la naissance d'un enfant. En effet, pendant la vie intra-utérine, les poumons sont remplis de liquide que l'épithélium pulmonaire sécrète à l'aide d'un transport actif de chlore permettant la création d'un gradient osmotique.<sup>23,25,106,127</sup> Le rôle de ce liquide est de permettre le développement normal des poumons. Dès la naissance, l'épithélium pulmonaire doit donc passer d'une fonction sécrétrice à une fonction d'absorption afin de se débarrasser de ce liquide et permettre la respiration. En 1990, des expériences de O'Brodovich et coll. ont démontré que l'instillation d'amiloride, un inhibiteur du transport du sodium, avant la première respiration des cochons d'Inde nouveau-nés, amenait une détresse respiratoire et de l'hypoxémie.<sup>101</sup> En 1996, les expériences de Hummler et coll. sur des souris knock-out pour  $\alpha$ -ENaC, un canal sodique impliqué dans la balance liquidienne des poumons, ont démontré une clairance liquidienne déficiente et une détresse respiratoire amenant une mort prématurée des nouveau-nés.<sup>59</sup> Une autre étude a clairement démontré *in vivo* chez des souris nouveaux nés  $\alpha$ -

ENaC(-/-)Tg<sup>+</sup> une prédisposition à l'œdème pulmonaire en présence d'un transport sodique inadéquat.<sup>40</sup>

Chez l'adulte, la clairance liquidienne est indispensable dans un contexte de pathologie amenant un œdème pulmonaire. Chez des patients souffrant du syndrome de détresse respiratoire, Ware et coll. ont noté que la clairance liquidienne était compromise chez la grande majorité de ces patients et que la survie était significativement améliorée chez ceux dont la clairance était maximale.<sup>133</sup> Ces évidences suggèrent donc que le transport du sodium soit de première importance pour la clairance liquidienne des poumons en période périnatale et pour le maintien de l'homéostasie pulmonaire chez l'adulte.

### 1.2.2 Le fonctionnement du transport du sodium au niveau de l'épithélium alvéolaire

Les cellules qui composent l'épithélium alvéolaire possèdent de nombreux mécanismes de transports ioniques impliqués dans l'homéostasie du liquide pulmonaire. Sur la membrane apicale des cellules alvéolaires, on retrouve des mécanismes de transport qui permettent l'entrée de sodium dans la cellule tels que : les canaux ENaC et cationiques non-spécifiques (NSCC), le co-transporteur Na<sup>+</sup>-D-glucose<sup>104</sup> et le transporteur Na<sup>+</sup>-acides aminés.<sup>66</sup> On retrouve aussi à la membrane apicale des canaux potassiques de type K<sub>v</sub><sup>76</sup> et des canaux chlore dont le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)<sup>20</sup>. Au niveau basolatéral, on retrouve la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase, des canaux potassiques, l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>84</sup>, le co-transporteur Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-83</sup> et Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-115</sup>.



**Figure 4** : Représentation schématique des principaux canaux et transporteurs présents dans les cellules alvéolaires et permettant les mouvements ioniques.<sup>57</sup>

C'est via la création d'un gradient électrochimique par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase située en basolatéral que les ions comme le sodium peuvent être absorbés dans la cellule en apical, excrétés en basolatéral et ainsi établir un gradient osmotique propice à la réabsorption d'eau. L'eau peut ensuite être réabsorbée soit par la voie trans cellulaire ou para cellulaire vers le pôle sanguin.

Pour ce qui est des canaux potassiques comme le  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , le  $\text{IK}_{\text{CA}}$  et le  $\text{KvLQT1}$ , ils sont présents au niveau des cellules alvéolaires en basolatéral.<sup>77</sup> En général, le rôle de ces canaux potassiques serait le maintien du gradient électrochimique nécessaire au transport trans épithélial de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{Cl}^-$ .<sup>103</sup> En effet, ils permettent le maintien du potentiel membranaire et empêchent l'accumulation de  $\text{K}^+$  dans la cellule.

Comme vu précédemment, l'épithélium alvéolaire est composé de deux types de pneumocytes possédant chacun un rôle particulier. Les cellules ATII sont connues depuis longtemps pour être impliquées dans le transport du sodium au niveau de l'épithélium alvéolaire. En effet, les premières études démontraient que les cellules ATII en culture étaient capables de former des dômes<sup>54</sup>, et que la formation de ces dômes était inhibée en présence d'amiloride et de ouabaine, respectivement un inhibiteur du transport du sodium au niveau apical et un inhibiteur de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ . La formation de ces dômes est secondaire au transport ionique qui provoque une réabsorption d'eau et ainsi soulève les cellules.

Selon les dernières évidences expérimentales, il semblerait que les deux types de pneumocytes soient impliqués dans le transport du sodium. Les cellules ATI ont depuis toujours été perçues comme des cellules qui réabsorbaient passivement l'eau. Ce n'est que récemment qu'elles ont été impliquées dans le transport du sodium, et donc ainsi associées à la clairance alvéolaire. Étant donné l'importante surface couverte par ce type cellulaire dans les alvéoles, leur implication dans l'équilibre liquidien des poumons constituait une hypothèse intéressante. Dans un premier temps, il fut démontré qu'elles avaient une très grande perméabilité à l'eau et qu'elles contenaient des aquaporines (canaux à l'eau).<sup>49,53,114</sup> Par la suite, la découverte que les cellules ATI exprimaient la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  et le canal épithélial sodique ENaC est venu renforcer cette hypothèse.<sup>18</sup> Une équipe est dernièrement venue bouleverser les concepts, en démontrant d'un point de vue fonctionnel que les cellules ATI contenaient non seulement la machinerie nécessaire au transport du sodium, mais qu'elles transportaient bel et bien le sodium.<sup>67</sup> Depuis, une autre étude fait état que les cellules ATI possèdent aussi des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, récepteurs impliqués dans la stimulation de la clairance alvéolaire.<sup>81</sup> Ces résultats suggèrent donc un rôle potentiel des cellules alvéolaires de type I dans l'homéostasie des liquides pulmonaires et donc dans la résolution de l'œdème pulmonaire. Il est important de mentionner que les études *in vitro* sur les cellules ATI sont compliquées par la difficulté d'isolation de ce type cellulaire en particulier.

### 1.2.3 Rôle et structure d'ENaC

Les ions  $\text{Na}^+$  diffusent de manière passive au travers de la membrane apicale des cellules ATII majoritairement par les canaux cationiques amiloride-sensibles. Les canaux sodiques épithéliaux (ENaC) sont connus pour être la principale voie d'entrée des ions sodium dans les cellules épithéliales. Il existe trois sous-unités homologues de ENaC : la sous-unité principale  $\alpha$ -ENaC, et deux sous-unités régulatrices  $\beta$ -ENaC et  $\gamma$ -ENaC.  $\alpha$ -ENaC a été cloné en 1993 par Canessa et coll. à partir d'une librairie d'ADNc provenant de colon de rat.<sup>21</sup> Par la suite, cette équipe a montré l'existence de  $\beta$  et  $\gamma$ -ENaC.<sup>22</sup> Des expériences d'hybridation *in situ* faites *in vivo* dans des alvéoles pulmonaires ont démontré la présence des ARNm de  $\alpha$ -ENaC et  $\gamma$ -ENaC, ainsi que de faible quantité de  $\beta$ -ENaC.<sup>46</sup> Des expériences *in vitro* ont quant à elles montré la présence des trois sous-unités dans les cellules alvéolaires.<sup>63</sup>

#### 1.2.3.1 Expression et association des sous-unités d'ENaC

On remarque que le transport du  $\text{Na}^+$  est relativement simple dans certains épithéliums: le sodium entre dans la cellule via ENaC, un canal hautement sélectif pour le  $\text{Na}^+$  par rapport au  $\text{K}^+$ , et inhibé par de faibles concentrations d'amiloride. Par contre, et c'est le cas des cellules alvéolaires, il arrive que la situation soit un peu plus compliquée. En effet, des études de canaux unitaires en patch-clamp sur des cellules alvéolaires ont identifié au moins 4 types différents de canaux sensibles à l'amiloride possédant des caractéristiques différentes au niveau de leur sélectivité envers le  $\text{Na}^+$  par rapport au  $\text{K}^+$  et de leur conductance unitaire. De nombreuses évidences expérimentales amènent à penser que la variabilité observée au niveau des canaux sodiques épithéliaux proviendrait d'un assemblage différent des trois sous-unités de ENaC. Par exemple, il semblerait que les canaux avec une haute spécificité (HSC) seraient composés de l'assemblage de  $\alpha$ -ENaC,  $\beta$ -ENaC et  $\gamma$ -ENaC, alors que les canaux non-spécifique (NSCC) seraient composés de  $\alpha$ -ENaC seul ou en combinaison avec des protéines autres que  $\beta$  ou  $\gamma$ .<sup>62,63</sup> On croit que les canaux à haute spécificité formeraient un pore selon une architecture hétérotétramérique formée de 2  $\alpha$ , 1  $\beta$  et 1  $\gamma$ .<sup>48</sup>

### 1.2.3.2 Les canaux cationiques non-spécifiques (NSCC)

En 1993, Feng et coll. ont démontré la présence d'un NSCC présentant une sélectivité  $[P_{Na^+}/P_{K^+}]$  de 1.15 sur la membrane apicale des cellules ATII de rat en culture. Ce canal possédait une sensibilité moindre pour l'amiloride que les canaux hautement spécifiques, et l'activation semblait dépendante des niveaux de calcium intracellulaire.<sup>47</sup> En 1998, Jain et coll. ont publié des expériences faites sur des cellules ATII de rat et montrant un NSCC ayant une sélectivité  $[P_{Na^+}/P_{K^+}]$  de 0.97 et qui semblait être inhibé par une protéine kinase activée par le GMPc.<sup>61</sup> Or, Jain et coll. ont démontré en 2001 que la variation observée *in vitro* quant aux différents types de canaux sodiques (assemblage différent d'ENaC) semblait être modulée par les conditions de culture. En effet, les cellules alvéolaires cultivées sur des supports perméables en présence de stéroïdes et avec une interface air-liquide, possédaient des canaux hautement spécifiques pour le sodium contrairement aux cellules cultivées sur plastique sans stéroïde et avec une interface liquide-liquide.<sup>63</sup> Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'assemblage différent des 3 isoformes d'ENaC résulte en canaux possédant non seulement des propriétés biophysiques différentes, mais possédant des mécanismes de régulation différents.

Dernièrement, la présence d'ARNm de TRPC6 a été démontrée dans le poumon humain entier. TRPC6 fait partie de la famille des canaux TRPC, qui veut dire 'transient receptor potential (TRP) channels'. TRPC6 est un canal cationique non-sélectif. Bien que sa présence dans les cellules alvéolaires n'ait pas encore été démontrée, il pourrait être un candidat intéressant pour expliquer la présence de NSCC dans les cellules alvéolaires.<sup>75</sup>

Pour l'instant, il n'a pas encore été démontré si les NSCC sont composées d'assemblages différents des 3 isoformes d'ENaC ou de canaux différents (TRPC). Davantage d'expériences seront nécessaires pour identifier clairement la composition des NSCC. Par ailleurs, malgré les différentes hypothèses quant à

son ou ses identités moléculaires, l'importance physiologique que pourraient jouer les NSCC dans le transport du sodium est encore mal connue.

#### 1.2.4 Rôle et structure de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase

La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase est un enzyme qui permet la création d'un gradient électrochimique utilisé par la cellule comme source d'énergie primaire pour le transport actif des autres ions. Elle échange le sodium intracellulaire contre le potassium extracellulaire selon un ratio de 3 :2 par molécule d'ATP hydrolysée.<sup>82</sup> Afin de bien fonctionner, la pompe a donc besoin d'énergie.

##### 1.2.4.1 Expression des sous-unités de la pompe

La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase est une protéine membranaire hétérodimérique située du côté basolatéral des cellules épithéliales alvéolaires et constituée de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans certains tissus, il est parfois possible de retrouver une sous-unité  $\gamma$ , mais son importance au niveau du poumon n'est pas connue. Il existe à ce jour 4 isoformes  $\alpha$  et 5 isoformes  $\beta$  exprimés en fonction du tissu et du stade de développement de l'organe.<sup>107</sup> On sait que la sous-unité  $\alpha$  est la portion catalytique de l'enzyme. Cette sous-unité contient aussi un site de liaison à la ouabaïne, ainsi qu'un élément de réponse à l'AMPc.<sup>136</sup> Le rôle de la sous-unité  $\beta$  est quant à lui controversé, mais on pense qu'elle pourrait être nécessaire pour l'assemblage fonctionnel de la pompe<sup>64</sup> et pour assurer l'insertion de la pompe dans un endroit spécifique de la membrane cellulaire<sup>92</sup>. L'importance relative de chacune des deux sous-unités semble varier d'un tissu à l'autre, mais il appert que la quantité de sous-unité  $\beta$  détermine en partie l'activité de la pompe dans le poumon<sup>44</sup> et les cellules ATII<sup>11</sup>.

##### 1.2.4.2 Modulation de la pompe

Plusieurs études ont démontré que l'activité basale de la pompe est le tiers de sa capacité maximale. En conséquence, il est possible d'augmenter rapidement l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase selon deux

mécanismes : en augmentant l'affinité et le recrutement de la pompe. En effet, des études font état de l'augmentation rapide de la clairance alvéolaire suite à un traitement avec des agonistes  $\beta$ -adrénergiques et dopaminergiques. Or, on sait que les agonistes  $\beta$ -adrénergiques et dopaminergiques sont capables d'augmenter le recrutement de la pompe à partir des compartiments endosomaux intracellulaires, et que ce mécanisme est dépendant de certaines protéines du cytosquelette.<sup>16,17</sup> Il a aussi été démontré dans des cellules de type II que l'ANP, un puissant agent natriurique, diurétique et vasodilatateur, inhibait l'influx de sodium vers l'intérieur de la cellule, grâce à l'activation du GMPc. Au niveau du rein, il a été démontré que l'ANP diminuait la probabilité d'ouverture des canaux sensibles à l'amiloride, ce qui pourrait expliquer cette diminution de l'entrée de sodium dans les cellules de type II. Or, dans cette étude sur les cellules de type II, l'ANP n'avait pas d'effet sur la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ .<sup>126</sup> Par contre, il est bien connu que l'ANP, via l'activation de GMPc et de la protéine kinase G, a un effet inhibiteur sur la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  dans le rein.<sup>12</sup> Davantage d'études sont nécessaires pour comprendre le rôle de l'ANP sur le transport sodique dans les cellules alvéolaires.

La régulation à long terme de la pompe se produit par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. On sait que la transcription de certaines sous-unités de la pompe peut être modulée dans le poumon par des hormones comme l'aldostérone, le dexaméthasone<sup>11,26</sup> et l'insuline. L'aldostérone est aussi capable d'augmenter l'insertion de la pompe dans la membrane plasmique.<sup>105</sup> Notre laboratoire a même démontré une augmentation de l'expression de la pompe par les agents  $\beta$ -adrénergiques suite à une stimulation de plusieurs jours.<sup>93</sup> On pense que l'effet transcriptionnel et post-transcriptionnel de la dopamine et des agents  $\beta$ -adrénergiques passeraient par la voie de ERK.

Récemment, des études *in vitro* et *in vivo* utilisant des modèles surexprimant la sous-unité  $\alpha$  ou  $\beta$  ont fait état d'une stimulation importante de la clairance alvéolaire. Par ailleurs, il semblerait que des rats surexprimant la sous-unité  $\beta_1$  de la pompe aurait une tolérance améliorée à l'hyperoxie et une clairance

alvéolaire plus importante que des rats contrôlés.<sup>8,43,86</sup> Toutes les stratégies capables d'augmenter l'activité et la quantité de pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase pourraient être potentiellement intéressantes afin de stimuler la clairance alvéolaire des patients souffrant de pathologies causant un œdème pulmonaire.

### **1.3 La transplantation pulmonaire : modalité thérapeutique pour les patients atteints de la fibrose kystique**

#### 1.3.1 La fibrose kystique (FK)

La fibrose kystique, aussi appelée mucoviscidose, est une maladie génétique autosomique récessive affectant environ 1 naissance sur 2500 au Canada.<sup>120</sup> La FK est causée par une mutation dans le gène du canal chlore CFTR, un canal impliqué dans le maintien de l'homéostasie des liquides pulmonaires.<sup>112</sup> Ainsi, il y a une diminution de CFTR fonctionnel à la membrane, amenant un transport épithélial de chlore anormal.

En effet, à l'état basal, l'épithélium des voies aériennes absorbe activement le sodium, ce qui provoque une absorption passive de chlore au niveau apical des cellules épithéliales. La route d'absorption du chlore en apical n'est pas encore tout à fait claire. En effet, certaines hypothèses suggèrent que le chlore pénètre dans les cellules par des canaux chlore de type CFTR, et d'autres suggèrent une route d'absorption paracellulaire. Au niveau de l'épithélium pulmonaire, par contre, CFTR sécrète du chlore afin de réguler les mouvements d'eau, ce qui permet de toujours avoir un niveau adéquat de liquide péricillaire. En effet, le canal CFTR, lorsque activé par l'AMPc, permet de sécréter le chlore afin d'ajuster le niveau du liquide péricillaire. Le rôle de CFTR au niveau de l'épithélium pulmonaire peut sembler contradictoire avec son rôle au niveau de l'épithélium des voies aériennes. En effet, davantage de travaux seront nécessaires afin d'éclaircir le rôle exact de CFTR.

Lorsqu'il y a une mutation dans le gène de CFTR, on retrouve une diminution de la sécrétion d'ions  $\text{Cl}^-$  par l'épithélium pulmonaire, ce qui provoque une hyperabsorption de sodium. En conséquence, on observe une absorption accrue d'eau qui contribue à la déshydratation du mucus. L'aspect du mucus ainsi modifié, il en résulte deux types d'anomalies. Premièrement, les propriétés biophysiques du liquide pulmonaire sont altérées, ce qui amène une importante diminution de la clairance mucociliaire. Deuxièmement, les modifications ioniques du liquide pulmonaire provoquent une chute des défenses naturelles de la muqueuse des voies aériennes contre les infections.<sup>29</sup> L'état plus épais et collant du mucus fait que les bactéries et les pathogènes restent dans les poumons, amenant ainsi des infections microbiennes à répétition. Ces infections contribuent à la persistance d'un état inflammatoire dans les poumons, ce qui amène leur dégradation. L'atteinte pulmonaire des patients fibrose kystique est responsable de plus de 90% des morbidités et mortalités associées à la FK.<sup>29</sup> Or, le gène CFTR est exprimé dans de nombreux autres tissus, notamment le pancréas, l'épididyme, l'intestin, les glandes sudoripares et les glandes salivaires. L'atteinte de la FK ne se limite donc pas aux poumons; c'est une atteinte systémique dans bien des cas. Les patients ont alors des troubles digestifs importants et on remarque une sueur salée. Il existe plus de 1000 mutations différentes dans le gène CFTR pouvant entraîner la FK, mais la plus fréquente est la  $\Delta\text{F508}$ .<sup>58</sup> Ces mutations provoquent la diminution de l'activité ou du nombre de canal CFTR à la membrane. Dépendamment du type de mutation (le génotype), le phénotype de l'atteinte du patient peut être différent. Par contre, dans la grande majorité des cas où les poumons sont atteints, la diminution de la capacité respiratoire amène progressivement le patient vers l'insuffisance respiratoire. La seule possibilité de survie pour ses patients reste alors la transplantation pulmonaire.

### 1.3.2 La transplantation pulmonaire

La première transplantation pulmonaire chez l'humain a eu lieu en 1963 par D<sup>r</sup> James Hardy et ses collègues à l'Université du Mississippi. Par contre, ce n'est que depuis 1983 que cette technique est

devenue un succès. Selon les dernières données, on effectuerait à travers le monde plus de 1500 transplantations pulmonaires chaque année.<sup>129</sup> Il existe deux types de transplantation pulmonaire : unilatérale et bilatérale. La transplantation unilatérale consiste à transplanter un seul poumon et la transplantation bilatérale à transplanter les deux poumons.

#### 1.3.2.1 Types de maladies nécessitant une transplantation pulmonaire

Il existe de nombreuses maladies terminales affectant les poumons et qui nécessitent une transplantation pulmonaire pour prolonger la survie des patients. Les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) représentent à elles seules 39% de toutes les transplantations pulmonaires. La fibrose pulmonaire idiopathique représente 17%, la fibrose kystique 16%, l'emphysème causé par une déficience en  $\alpha$ 1-antitrypsine 9% et l'hypertension pulmonaire primaire 4,2%. D'autres maladies plus rares, telles la sarcoïdose, les bronchiectasies et la lymphangioléiomyomatose font partie de la liste, mais leur importance relative est plus faible (moins de 3%).<sup>129</sup>

#### 1.3.2.2 Moyenne de survie

Selon le Registre de la Société Internationale de Transplantation cardiaque et pulmonaire<sup>129</sup>, la survie des patients transplantés entre janvier 1990 et juin 2002 est de 84% 3 mois après l'intervention, 74% à 1 an, 58% à 3 ans, 47% à 5 ans et 27% à 10 ans. Il est à noter que la survie c'est beaucoup améliorée depuis quelques années étant donné le travail effectué au niveau de l'amélioration des techniques chirurgicales, des solutions de préservation des organes ainsi que dans la prise en charge du patient.

#### 1.3.3 Complications en post-transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire est une opération très invasive et éprouvante pour le patient qui est déjà très affaibli avant l'opération. En post-transplantation pulmonaire, une multitude de complications peuvent survenir et menacer à la fois la fonction du greffon et la survie du patient. La complication la

plus fréquente en post-transplantation pulmonaire est la dysfonction primaire du greffon (PGF), une forme sévère de lésion d'ischémie-reperfusion, qui sera discutée plus loin. Selon les registres, 31,5% des décès sont attribuables à la PGF dans les premiers 30 jours suivant la transplantation.<sup>129</sup> La deuxième complication la plus fréquente est l'infection non-CMV qui cause plus de 20,4% des décès pendant la période péri-opératoire. Cette susceptibilité aux infections n'est pas surprenante, étant donné l'état d'immunosuppression des patients. Les troisièmes causes en liste avec 19,3% des décès sont les complications techniques d'origines multiples.

#### **1.4 La lésion d'ischémie-reperfusion**

La lésion d'ischémie-reperfusion (LIRI) est une complication fréquente suite à une transplantation d'organe et peut avoir des conséquences graves sur la survie des patients. La LIRI se caractérise par des infiltrats pulmonaires diffus, une augmentation du gradient alvéolo-capillaire et une diminution de la compliance pulmonaire. Elle survient suite aux étapes de prélèvement, préservation et transplantation du greffon.

##### **1.4.1 Impact de la lésion d'ischémie-reperfusion**

Le stress engendré par l'ischémie-reperfusion du greffon cause des dommages importants à la microcirculation pulmonaire<sup>5</sup>, entraînant ainsi une fuite de protéines vers les compartiments alvéolaires. Cette perméabilité vasculaire accrue entraîne la formation d'un œdème pulmonaire non-cardiogénique qui peut compromettre la survie du patient et une infiltration importante de cellules inflammatoires contribuant à l'exacerbation de la lésion. Selon les études, l'incidence de la lésion d'ischémie-reperfusion varie entre 15-35%. Heureusement, dans la grande majorité des cas, la lésion est légère et ne représente pas de conséquence clinique majeure.<sup>30</sup> Or, chez un certain nombre de patients la lésion est sévère et persistante, amenant le patient à être supplémenté en oxygène et sous ventilation mécanique pour une

période prolongée. Le terme dysfonction primaire (PGF) du greffon est attribué à cette condition clinique.<sup>31</sup> Les résultats d'une étude publiée dans CHEST en 1998 démontrent que 60% des patients greffés atteints de PGF sont décédés avant même de quitter l'hôpital.<sup>30</sup>

La lésion d'ischémie-reperfusion présente de nombreuses similarités avec le syndrome de détresse respiratoire aigu (SRDA) autant sur le plan clinique, radiologique qu'histologique. Le SRDA est une pathologie fréquente et représente la cause la plus importante de morbidité et de mortalité aux soins intensifs. De fait, le taux de mortalité est d'environ 40%.<sup>38,85,95,138</sup> De nombreux facteurs peuvent causer le SDRA, mais les plus fréquents sont, entre autres, les infections (sepsis, pneumonie), un traumatisme, une aspiration de liquide gastrique ou une inhalation de fumée et de gaz toxique.<sup>108</sup> On associe le SDRA à des facteurs de risques cliniques qui pourraient soit être impliqués directement dans le développement de la lésion pulmonaire, ou via un processus secondaire suite à l'activation de processus inflammatoires systémiques. Cette inflammation viendrait donc, en conséquence, endommager les capillaires pulmonaires et, comme lors de la LIRI, favoriser la création d'un œdème pulmonaire entraînant l'hypoxémie du patient. Il semblerait donc que la perméabilité accrue des capillaires pulmonaires serait la cause de l'œdème pulmonaire que l'on retrouve dans les deux types de lésions.

On sait maintenant que le rôle de l'épithélium pulmonaire est fondamental dans la résolution de la LIRI et du SRDA. Un épithélium fonctionnel permet la réparation de la lésion et la résorption de l'œdème. En effet, les cellules ATII, de par leur rôle de cellules progénitrices, permettent la réparation de l'alvéole et contribuent aussi à la clairance de l'œdème. Il a été démontré que les patients qui n'étaient pas capables de résorber l'œdème pulmonaire durant la période initiale du SRDA avaient une insuffisance respiratoire prolongée et un plus haut risque de mortalité. Une autre étude faite sur des patients greffés pulmonaires et présentant les signes de LIRI a aussi démontré que les patients ayant conservés une capacité de clairance alvéolaire présentaient moins d'hypoxie et d'infiltrats lors de la radiographie que ceux dont la clairance

était moindre ou absente.<sup>132</sup> Ces résultats suggèrent donc que la préservation de la fonction épithéliale de clairance alvéolaire soit d'une grande importance pour l'amélioration de la condition des patients souffrant de SRDA et de LIRI. Il semble donc logique de penser qu'une thérapie permettant de stimuler l'épithélium à se débarrasser de l'œdème pulmonaire, comme l'utilisation d'agonistes  $\beta$ -adrénergiques, pourrait aider la condition des patients et améliorer leur survie.<sup>108</sup>

#### 1.4.2 Événements moléculaires impliqués dans la LIRI

La LIRI est une lésion pulmonaire aiguë dont la pathogenèse est très complexe. Elle se caractérise par des événements qui sont médiés par de nombreux type cellulaire et cytokines. L'hypothèse est que la LIRI surviendrait de manière biphasique : une phase initiale médiée par les macrophages résidents du poumon du donneur et une phase subséquente médiée par les neutrophiles. Initialement (premier 30 minutes), les macrophages produiraient une variété de cytokines et de chémokines, incluant le  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-8}$  et  $\text{MIP-2}\alpha$ , qui recrutent et activent les neutrophiles du receveur amenant ainsi le développement de la seconde phase qui se produit de 4 à 6 heures post-reperfusion. L'activation des neutrophiles cause alors un relargage massif d'enzymes protéolytiques et de radicaux libres causant des dommages irréversibles au poumon transplanté.<sup>42</sup> On pense que les cellules endothéliales sont les cellules qui sont les plus sensibles à ce stress oxydatif.

Bien que la préservation hypothermique de l'organe ait des bénéfices considérables au niveau de la durée de préservation, on sait par ailleurs qu'elle possède de nombreux désavantages. En effet, cette période d'ischémie froide amène un stress oxydatif important, l'inactivation de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ , une relâche massive de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, une libération de fer et l'induction de signaux de mort cellulaire qui peuvent tous provoquer la relâche de médiateurs pro-inflammatoires qui vont ultérieurement activer les leucocytes du receveur au moment de la reperfusion.

Le stress oxydatif est caractérisé par la formation de radicaux libres comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyl ( $OH\cdot$ ). Ces molécules possèdent un rôle crucial dans le développement de la lésion d'ischémie-reperfusion puisqu'elles sont très instables et réagissent avec la première structure rencontrée. Suite à une période post-ischémique, l'endothélium est la source majeure de l'anion superoxyde, qui ensuite produit le  $OH\cdot$ . En conditions normales, les cellules sont capables de contrer les effets de l'anion superoxyde grâce à la superoxyde-dismutase (SOD), capable de convertir le superoxyde en  $H_2O_2$ . Le problème, lors de la période de reperfusion de l'organe, est que ces défenses naturelles sont dépassées étant donné la quantité importante d'anion superoxyde produit.<sup>6</sup>

L'endothélium est aussi une source majeure de NO. Le NO est produit grâce à la NO synthase (NOS) dont il existe 3 isoformes. La NOS est soit neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) ou inducible (iNOS) et ces effets sont soit directs ou indirects. Les effets directs du NO sont bénéfiques car ils surviennent lors d'une production brève et faible par la nNOS et la eNOS. Le NO produit par la eNOS, par exemple, permet de diminuer l'agrégation plaquettaire et leucocytaire sur l'endothélium. Par contre, lors d'un effet indirect, le NO est produit massivement par la iNOS et réagit avec l'oxygène ou l'anion superoxyde afin de former des radicaux libres indésirables.<sup>6</sup> Dans un contexte de transplantation, on sait qu'il y a une baisse du niveau de NO endogène et une hausse importante de la quantité d'oxydants. On pense que le NO endogène serait incapable de faire profiter l'organe de ces effets vasodilatateurs bénéfiques, pouvant ainsi provoquer le phénomène de non-reperfusion dans certaines parties de l'organe. Par ailleurs, la grande production de l'anion superoxyde cause une importante accumulation de peroxyde d'hydrogène amorçant ainsi la libération de médiateurs inflammatoires. Le peroxyde peut aussi activer  $NF\kappa B$ , un régulateur de première importance dans l'expression génique de nombreuses cytokines et facteurs d'adhésion. En effet, on sait que  $NF\kappa B$  est impliqué dans la transcription de  $TNF\alpha$  et  $\beta$ , de plusieurs interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17), certaines chémokines (IL-8, MIP-1, RANTES), quelques enzymes (iNOS, cyclo-oxygénase inducible) ainsi que des facteurs d'adhésion (ICAM-1,

VCAM-1, E-sélectine, P-sélectine). Une étude a démontré que l'inhibition de NFκB par transfection dans un modèle de transplantation de rat diminue l'œdème pulmonaire et la séquestration des neutrophiles.<sup>60</sup>

Le NO endogène en lui-même est capable d'inhiber les substances qui activent NFκB. Il appert donc que la baisse de production de NO endogène se produisant dans les premiers instants suite à une période d'ischémie-reperfusion promouvoit la synthèse de ses médiateurs pro-inflammatoires. Donc, la perte de la production endogène bénéfique de NO amène une série d'événements qui résultent en une dysfonction endothéliale importante et un phénomène subséquent de lésion tissulaire médiée par les neutrophiles. Cette perturbation de l'endothélium vasculaire provoque une hausse de la perméabilité des capillaires pulmonaires et cause l'œdème pulmonaire typiquement observé lors d'une LIRI.

Des expériences de Serrick et coll. en 1994 ont démontré des niveaux significativement plus élevés de TNF-α, d'IFN-γ et d'IL-2 dans le lavage broncho-alvéolaire de chiens transplantés. Cette augmentation de libération de cytokines pro-inflammatoires était maximale à 4 heures post-transplantation et retournait à des niveaux normaux 24 heures post-transplantation.<sup>122</sup> Une autre étude a démontré des niveaux très élevés de TNFα, IL1-β, IL-6 et IL-8 dans le sérum des patients suite à une transplantation pulmonaire.<sup>87</sup>

Krishnasdasan et coll. ont utilisé un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat où ils ont traité les animaux avec différents anticorps 5 minutes avant la reperfusion. Le groupe de rats ayant reçu des anticorps anti-IL-1β et celui ayant reçu des anticorps anti-TNF-α ont tous deux subies une diminution de leur index de perméabilité et du recrutement des neutrophiles. Ils ont par ailleurs observé un effet additif sur la baisse de perméabilité et le recrutement des neutrophiles dans le groupe ayant reçu un traitement combiné.<sup>74</sup> Il est connu que le TNF-α contribue au recrutement des neutrophiles dans le poumon en augmentant la production de facteurs d'adhésion par l'endothélium. On sait aussi que les neutrophiles semblent être des médiateurs importants dans la réponse inflammatoire suivant une ischémie-reperfusion.

Ces résultats suggèrent donc un effet bénéfique potentiel de la diminution du TNF-α et d'IL-1β pour diminuer les lésions endothéliales présentes dans un contexte de LIRI. En somme, cette diminution des

niveaux de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  aurait un effet protecteur contre la dysfonction endothéliale présente dans la LIRI.

#### 1.4.3 Impact de l'inflammation sur la clairance alvéolaire lors de lésion d'ischémie-reperfusion

Ware & coll. ont démontré chez des patients transplantés et souffrant de LIRI, que la capacité de clairance de l'épithélium pulmonaire semble préservée chez la majorité des patients malgré une apparente hausse de la perméabilité des capillaires pulmonaires, signe d'une atteinte endothéliale. Par contre, on observait chez les patients qui n'avaient pas de clairance alvéolaire plus d'hypoxie, des infiltrats radiologiques persistant et des dommages alvéolaires.<sup>132</sup> Leurs résultats suggèrent donc que l'inflammation puisse affecter la clairance alvéolaire de base lors de lésions d'ischémie-reperfusion, compromettant ainsi la survie des patients.

Berthiaume & coll. ont proposé que la sévérité de la lésion explique probablement l'hétérogénéité observée entre la conservation ou la perte de la capacité de clairance dans un modèle donné. L'ensemble des résultats expérimentaux semble démontrer que lors de lésion pulmonaire sévère, la clairance alvéolaire est souvent compromise.<sup>14</sup> En effet, l'équipe de Pittet a observé que certains des moutons chez qui on avait instillé du *Pseudomonas* avaient conservé une ALC normale ou légèrement augmentée, alors que les autres n'avaient aucune clairance. Il est intéressant de mentionner qu'une atteinte épithéliale était observée dans ce dernier groupe.<sup>110</sup> D'autres travaux de recherches fait dans différents modèles font aussi état de cette absence de clairance alvéolaire suite à une lésion pulmonaire.<sup>73,125</sup> Il semblerait donc que les lésions pulmonaires sévères associées à une atteinte endothéliale et épithéliale seraient celles où on observe cette baisse de clairance.

## 1.5 Modulation de la clairance alvéolaire par les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

On sait depuis de nombreuses années que les agonistes  $\beta$ -adrénergiques stimulent le transport de sodium *in vitro*<sup>28,39,53</sup> et *in vivo*<sup>13,15,100</sup> en conditions normales. D'autres groupes ont démontré que les agonistes  $\beta$ -adrénergiques étaient aussi capables de stimuler la clairance alvéolaire dans certaines conditions pathologiques.<sup>51,91</sup> En effet, l'administration de terbutaline, un agoniste  $\beta_2$ -adrénergique, est capable de renverser la baisse de clairance induite par l'hypoxie sur des cellules alvéolaires épithéliales.<sup>130</sup> On remarque donc un intérêt grandissant pour l'utilisation des agonistes  $\beta$ -adrénergiques en clinique afin de stimuler la résorption de l'œdème pulmonaire en condition pathologique.

### 1.5.1 Rôles et types de récepteurs adrénergiques

Le système nerveux sympathique possède un rôle central dans la régulation de différentes fonctions des organes du corps humain, en particulier lors d'une réponse au stress. Les catécholamines, telles l'épinéphrine et la norépinéphrine, sont responsables des effets du système sympathique sur les organes via l'activation des récepteurs adrénergiques. Les médicaments qui miment l'effet des catécholamines sur ces récepteurs sont appelés des sympathicomimétiques. Les récepteurs adrénergiques se classent selon trois grandes familles : les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques, ainsi que les récepteurs dopaminergiques. Selon la famille et le sous-type de récepteur, les effets sont multiples, dont voici les principaux :

**Tableau 1 : Les principaux types de récepteurs adrénergiques**

Type de récepteurs adrénergiques	Tissus	Actions
$\alpha_1$	Muscle lisse vasculaire (innervé)	Contraction
	Muscle de dilatation pupillaire	Contraction (dilatation de la pupille)
	Coeur	Augmente la force de contraction
$\alpha_2$	Plaquettes	Agrégation plaquettaire
	Muscle lisse vasculaire	Contraction
	Adipocytes	Inhibe la lipolyse
$\beta_1$	Coeur	Augmente la force et le rythme des contractions
$\beta_2$	Système respiratoire, urinaire et les muscles lisses vasculaires	Relaxation des muscles lisses
	Muscles squelettiques	Augmente la recapture du potassium
	Foie	Active la glycogénolyse
$\beta_3$	Adipocytes	Active la lipolyse
$D_1$	Muscles lisses	Dilatation des vaisseaux sanguins dans le rein

Tiré de Basic & Clinical Pharmacology<sup>70</sup>

### 1.5.2 Récepteurs $\beta$ -adrénergiques

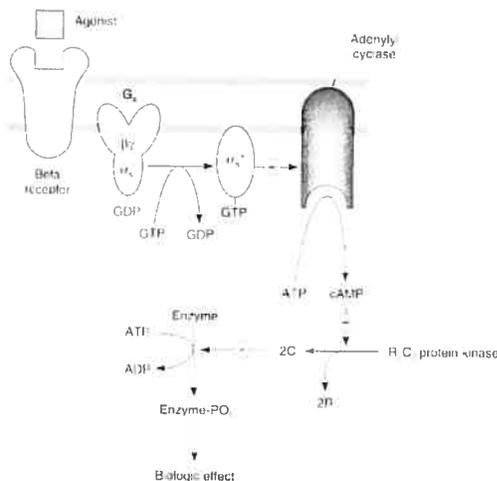
Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont des récepteurs à 7 passages transmembranaires et sont couplés à des protéines G. Ces récepteurs sont très présents dans les poumons ; en effet, il appert que leur nombre croît à mesure que l'on se déplace en distal du système respiratoire. Les alvéoles pulmonaires contiendraient plus de 90% des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques situés dans les poumons.<sup>24</sup> Par contre, la proportion de chaque sous-type de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques semble fluctuer selon l'espèce :

**Tableau 2** : Compilation des ratios de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques selon les espèces

Référence	Tissu et espèce	Ratio $\% \beta_2$ : $\% \beta_1$
Liang, W & coll., 2002 <sup>80</sup>	Poumons de cochons	58 :42
Sano, M & coll., 1993 <sup>119</sup>	Poumons humains	73 :27
Jones, LG & coll., 1987 <sup>68</sup>	Cellules alvéolaires de type II de rat	66 :33
Abraham, G & coll., 2003 <sup>2</sup>	Poumons de chevaux	79 :21
Nambi, P & coll., 1984 <sup>98</sup>	Poumons de rats	82 :18
	Poumons de lapins	28 :72
	Poumons de cochons d'Inde	85 :15
	Poumons de chiens	80 :20

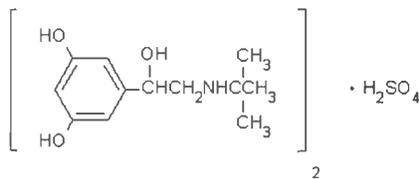
### 1.5.2.2 Voies de signalisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Comme les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont des récepteurs couplés au protéine G, la liaison d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique provoque la dissociation de GDP de la sous-unité alpha de la protéine G. Le GTP se lie ensuite à la protéine G et la sous-unité  $\alpha$  se dissocie de la sous-unité  $\beta\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  activée liée au GTP peut alors activer son effecteur. L'effecteur des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est l'adénylate cyclase (AC). Une fois activée, l'AC convertit l'ATP en AMPc, et cette hausse d'AMPc intracellulaire active à son tour des protéines kinases comme, entre autres, la PKA.

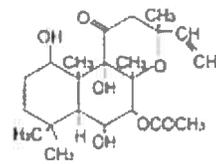
**Figure 5** : Voie de signalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.<sup>70</sup>

### 1.5.2.3 Agonistes $\beta$ 2-adrénergiques

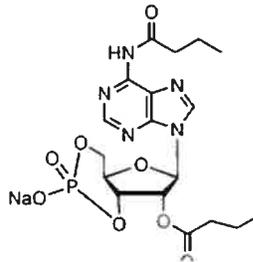
L'isoprotérénol, la dobutamine, l'albutérol et la terbutaline sont tous des agonistes  $\beta$ -adrénergiques, à la différence qu'ils ne possèdent pas tous la même affinité pour chacun des sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. En effet, la terbutaline est un agoniste spécifique au récepteur  $\beta_2$ -adrénergique; c'est-à-dire qu'elle active de manière spécifique ce sous-type de récepteur. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que l'administration d'une concentration entre  $10^{-4}$ M et  $10^{-5}$ M de terbutaline était capable d'augmenter le transport du sodium et donc de stimuler la clairance alvéolaire.<sup>15,28,125</sup>



**Figure 6** : Structure de la molécule de terbutaline



**Figure 7** : Structure de la molécule de forskoline



**Figure 8** : Structure de la molécule de dibutyryl cyclic-AMP

Il existe des moyens pour augmenter l'AMPc intracellulaire sans passer par l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. En effet, l'utilisation de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, permet d'augmenter l'AMPc intracellulaire en contournant la machinerie du récepteur.<sup>32</sup> Il est aussi possible d'utiliser le dbAMPc, un analogue perméable à l'AMPc intracellulaire, afin d'augmenter directement l'AMPc intracellulaire.

### 1.5.3 Rôle des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques au niveau de l'épithélium alvéolaire

Des expériences *in vivo*<sup>9,15,109</sup>, *ex vivo*<sup>116</sup> et *in vitro*<sup>93</sup> ont démontré que l'effet des catécholamines sur l'épithélium alvéolaire pouvait être inhibé par le propranolol, un antagoniste spécifique des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques. En effet, Charron et coll. ont démontré que la stimulation de la clairance induite par l'épinéphrine, un agoniste adrénérrique non-spécifique, était inhibée par le propranolol, prouvant ainsi que l'effet était médié par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Ils ont aussi démontré que l'augmentation de la clairance par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques passait par une augmentation du transport du sodium, puisque la stimulation de la clairance était bloquée par l'amiloride.<sup>27</sup> Bien qu'il existe trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont les plus nombreux, composant plus de 80% de la population des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au niveau de l'épithélium alvéolaire. De par leur nombre, il semble qu'ils soient les candidats idéals pour être impliqués dans la stimulation de la clairance alvéolaire. Or, les expériences de Sakuma et coll. ont démontré qu'il était possible d'augmenter la clairance alvéolaire dans des poumons de rat *ex vivo* à l'aide de dénopamine, un agoniste  $\beta_1$ -adrénérrique. Ils ont par ailleurs démontré que cette stimulation était aussi importante que celle obtenue avec la terbutaline, un agoniste  $\beta_2$ -adrénérrique.<sup>116,118</sup> Ces résultats sont en opposition avec les résultats de Tibayan et coll. qui ont démontré, grâce à l'utilisation de différents antagonistes spécifiques à chacun des sous-types de récepteurs, que la stimulation de la clairance alvéolaire par un agoniste  $\beta$ -adrénérrique non-spécifique passait par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénérriques.<sup>128</sup> Malgré ces résultats contradictoires, il semble y avoir un consensus sur l'importance des récepteurs  $\beta_2$ -adrénérriques dans la stimulation de la clairance alvéolaire. Il est important de mentionner que l'utilisation d'agonistes  $\beta_1$ -adrénérriques en clinique serait difficile de par leurs importants effets sur la modulation de l'activité cardiaque.

La stimulation de la clairance alvéolaire induite par les agonistes  $\beta_2$ -adrénérriques serait causée par une stimulation directe et indirecte du transport du sodium via une augmentation de l'AMPc intracellulaire. En effet, les  $\beta_2$ -agonistes augmenteraient *in vitro* le temps et la probabilité d'ouverture des canaux

sodiques et favoriseraient leur exocytose vers la membrane apicale. Il est aussi connu qu'une élévation d'AMPC stimule le CFTR en augmentant sa phosphorylation<sup>7</sup> et l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase en augmentant, entre autre, son insertion à la membrane basolatérale<sup>17</sup>. Il appert donc que la stimulation de la clairance alvéolaire par les agents  $\beta_2$ -adrénergiques se joue à plusieurs niveaux.

#### 1.5.4 Relation entre le CFTR et les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

Il a récemment été démontré que le CFTR était présent dans les alvéoles.<sup>20</sup> Or, le rôle qu'il semble y jouer représente encore une énigme. En effet, les expériences qui suivent démontrent que le CFTR ne fait pas que sécréter du chlore comme dans l'épithélium des voies aériennes, mais qu'il est aussi possible de stimuler l'entrée de chlore par CFTR dans les cellules de l'épithélium alvéolaire. En 1991, Kim & coll.<sup>72</sup> ont démontré qu'une stimulation à la terbutaline pouvait causer, outre ces effets sur l'augmentation du transport du sodium, une réabsorption active de  $^{36}\text{Cl}$  dans des cellules alvéolaires. Par la suite, des expériences par l'équipe de O'Grady<sup>65</sup> en chambre de Ussing sur des cellules alvéolaires montrent que la stimulation du transport du sodium observée suite à une exposition aux agents  $\beta_2$ -adrénergiques provient d'une augmentation de la perméabilité apicale au chlore. Ils concluent que cette augmentation de l'entrée de chlore provoque l'augmentation subséquente de l'absorption de sodium. En 1998, Jiang et coll.<sup>65</sup> ont fait des expériences de substitution de l'ion chlore en chambre de Ussing. Ils ont observé une absence de stimulation du courant  $I_{\text{sc}}$  par la terbutaline, alors que la réponse à l'amiloride était inchangée. Ces expériences sont donc venues renforcer l'hypothèse que la stimulation du courant trans épithéliale de sodium est secondaire à une activation de l'absorption de chlore. Il est intéressant de se questionner sur l'identité du canal responsable de cette augmentation de l'entrée de chlore lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Récemment, Brochiero et coll.<sup>20</sup> ont démontré la présence d'un canal chlore CFTR fonctionnel sur des cellules alvéolaire fraîchement isolées. Dans un modèle de poumon intact, Fang et coll.<sup>45</sup> ont démontré que la présence de CFTR semble être cruciale pour la stimulation de la clairance alvéolaire médiée par l'AMPC, mais pas pour la clairance basale. En effet, on n'observait aucune

stimulation de la clairance par l'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, chez les souris  $\Delta F508$  contrairement aux souris wild-type. Les souris  $\Delta F508$  sont des souris qui ne possèdent pas de CFTR à la membrane apicale des cellules. Par ailleurs, le fait qu'il soit activé par l'AMPc intracellulaire est un autre indice en faveur de CFTR et en fait le candidat tout désigné.<sup>123</sup>

L'ensemble de ces résultats semble donc pointer le CFTR comme principal responsable de cette entrée de chlore suite à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. D'ailleurs, en 2005, Mutlu et coll.<sup>96</sup> ont surexprimé CFTR *in vivo* chez des rats et ont observé une stimulation de 92% de la clairance alvéolaire par rapport aux rats infectés par des adénovirus vides. Cette stimulation de la clairance était dépendante d'une stimulation du transport du chlore puisque lors de l'addition d'inhibiteurs du transport du chlore, la stimulation était abolie. En résumé, il n'est pas encore clairement défini si l'activation du transport de sodium est responsable à elle seule de la stimulation de la clairance par les agents  $\beta$ -adrénergiques ou si elle dépend également du transport de chlore et en particulier du canal CFTR.

#### 1.5.5 Impact de l'inflammation sur la modulation de la clairance alvéolaire par les agonistes $\beta$ -adrénergiques

La modulation de la réponse aux agents  $\beta$ -adrénergiques par différentes cytokines dans le cœur est connue depuis de nombreuses années. En 1990, une équipe avait démontré que le TNF $\alpha$  pouvait affecter le couplage des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques avec l'adénylate cyclase dans des cardiomyocytes en culture. Ainsi, il était impossible de stimuler les niveaux d'AMPc dans ces cellules.<sup>32</sup> Au niveau du poumon, l'équipe de Pittet a observé en 1999 l'inhibition de la stimulation de la clairance alvéolaire par des agonistes  $\beta$ -adrénergiques suite à un choc hémorragique. L'inhibition était causée par des mécanismes oxydatifs dépendant des neutrophiles.<sup>94</sup> Par ailleurs, l'équipe de Pittet a dernièrement rapporté une diminution de l'expression d' $\alpha$ ENaC dans des cellules ATII de rat et humaine suite à une exposition de 6

h à IL-1 $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire. Cette diminution d'expression était dépendante de la voie de la p38 MAPK-kinase.<sup>113</sup> Dagenais & coll. ont aussi démontré qu'un traitement de 24 h au TNF $\alpha$  diminuait de 50% l'expression de la protéine d' $\alpha$ ENaC.<sup>35</sup> L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'inflammation peut moduler à la fois l'expression de protéines impliquées dans l'ALC et la réponse aux agents  $\beta$ -adrénergiques.

Il a démontré, dans un modèle canin de lésion inflammatoire induite par la transplantation pulmonaire, qu'il y avait une baisse de la clairance alvéolaire de base et une absence de réponse à la terbutaline, un agoniste  $\beta_2$ -adrénergique, dans le poumon transplanté par rapport au poumon natif (non-transplanté). Il a aussi démontré que cette absence de réponse à la terbutaline était accompagnée d'une baisse importante de l'expression protéique et des ARNm d' $\alpha$ ENaC, alors que la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase n'était pas affectée dans le poumon transplanté.<sup>125</sup>

## 1.6 Hypothèses et objectifs

Le transport du sodium est un phénomène central pour la clairance liquidienne dans les poumons et est donc très important pour le bon maintien de la fonction pulmonaire. En effet, le transport du sodium joue un rôle majeur dans la réabsorption de l'œdème pulmonaire. Il semblerait que le transport du sodium soit modulé par de nombreux facteurs, particulièrement en situation pathologique. De fait, les patients souffrant de pathologies inflammatoires des poumons se retrouvent souvent avec un œdème pulmonaire qui peut compromettre leur survie. Il est important de mieux comprendre comment l'état inflammatoire module la clairance alvéolaire afin de trouver éventuellement des molécules capables de la stimuler. Les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques sont souvent utilisés en clinique pour stimuler la clairance alvéolaire des poumons et ainsi aider à résorber l'œdème. Par contre, il a été démontré qu'il n'y a pas de stimulation de la clairance liquidienne dans le poumon transplanté de chien suite à une stimulation avec la terbutaline,

un agoniste  $\beta_2$ -adrénergique. Le modèle de transplantation pulmonaire induit une lésion inflammatoire sévère appelée lésion d'ischémie-reperfusion. La manifestation clinique de la lésion d'ischémie-reperfusion est un œdème pulmonaire pouvant compromettre la ventilation du patient.

Le but de cette étude est donc de comprendre pourquoi il n'y a pas de réponse aux agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques lors d'un état inflammatoire sévère présent suite à une transplantation pulmonaire et de voir si l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires peut modifier la cascade des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques *in vitro*. Notre hypothèse est que l'absence de réponse à la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques par la terbutaline pourrait s'expliquer par une diminution de la densité de ces récepteurs ou une dysfonction de ces derniers.

Les objectifs principaux de cette étude sont :

- 1) Comparer par des études de liaison la quantité et l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans les tissus pulmonaires normaux et transplantés de chien.
- 2) Utiliser un traitement combiné de dbAMPc, un analogue de l'AMPc, et d'aminophylline, un inhibiteur de phosphodiésterases, afin de stimuler la clairance alvéolaire des poumons transplantés de chien.
- 3) Comparer l'expression d' $\alpha$ ENaC et de CFTR dans les tissus pulmonaires normaux et transplantés de chien afin d'expliquer l'incapacité de stimuler la clairance alvéolaire par une augmentation d'AMPc intracellulaire.
- 4) Explorer l'effet des molécules inflammatoires tel que le TNF $\alpha$  sur le courant amiloride-sensible et l'accumulation d'AMPc de cellules alvéolaires en culture suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique.

## 2 Méthodologie

Toutes les expériences effectuées sur des animaux dans le contexte de cette étude ont été faites selon les directives canadiennes pour la protection des animaux et approuvées par le CIPA.

### 2.1 Transplantation unipulmonaire chez le chien

#### 2.1.1 Animaux

18 chiens mâles et femelles de 19-30kg ont été utilisés. Neuf transplantations unipulmonaires orthotopiques gauches ont été effectuées chez les chiens en tenant compte du poids des animaux donneurs et receveurs. Le groupe transplanté non-traité était composé de 5 chiens receveurs, et le groupe transplanté traité au dbcAMP+aminophylline de 4 chiens receveurs.

#### 2.1.2 Procédure chirurgicale pour le prélèvement des poumons du donneur

L'induction de l'anesthésie des chiens donneurs a été faite à l'aide de Propofol (4mg/kg) IV suite à l'administration d'un mélange de pré-anesthésiques IM [Glycopyrrolate (0.01mg/kg), Atravet (0.04mg/kg), Mépéridine (4mg/kg)]. Les chiens ont ensuite été intubés et ventilés par ventilateur avec un volume de 18 mL/kg, une concentration d'oxygène inspiré de 1.0 et une pression de fin d'expiration de 5 cmH<sub>2</sub>O. Le maintien de l'anesthésie a été fait avec de l'isoflurane (1.0-3.0% et du pancuronium IV (0.1mg/kg)). Une fois la sternotomie médiane effectuée, l'héparine sodium IV a été donnée à l'animal (400U/kg, Leo Pharma Inc.) et un cathéter a été introduit dans le tronc de l'artère pulmonaire. La veine cave supérieure et l'aorte ascendante ont été clampées, la veine cave inférieure et l'appendice auriculaire gauche sectionnés, puis la vasculature du donneur perfusée avec de l'Euro-Collins (50mL/kg) froid via le cathéter dans l'artère pulmonaire à une hauteur de 30 cm. À l'aide d'une solution de lactate Ringer froid, nous avons fait un refroidissement topique des poumons. Suite à la perfusion, les poumons ont été

gonflés avec de l'air ambiant, la trachée clampée puis coupée, et les poumons placés dans un sac de plastique avec du lactate Ringer froid. Une fois fermé, le sac a été placé sur la glace pour une période d'ischémie froide d'environ 3 heures.

### 2.1.3 Procédure chirurgicale pour la greffe chez le receveur

Les chiens receveur ont été anesthésiés de la même manière que les chiens donneurs. Afin de pouvoir mesurer la pression artérielle et prendre des prélèvements sanguins, un cathéter 16G fut inséré dans l'artère fémorale. Par la suite, un cathéter Swan Ganz 8Fr fut introduit dans l'artère pulmonaire via la veine fémorale afin d'obtenir la pression de l'artère pulmonaire. Une thoracotomie gauche a ensuite été faite afin de pouvoir exciser le poumon natif gauche du receveur. Les poumons du donneur furent disséqués et l'artère pulmonaire gauche, l'oreillette gauche et la bronche souche gauche nettoyées de tous tissus conjonctifs. Par la suite, les anastomoses de la bronche souche gauche, de l'artère pulmonaire gauche et de l'oreillette gauche ont été faites. Le poumon transplanté fut reperfusé et ré-expendu afin de rétablir la ventilation de ce poumon. Par la suite, un suivi hémodynamique a été fait pour une période de 8 heures. La durée de l'ischémie totale moyenne était de  $220 \pm 15$  minutes pour le groupe non-traité et de  $200 \pm 4$  minutes pour le groupe traité. Les paramètres tels que : la pression artérielle moyenne, la pression moyenne dans l'artère pulmonaire, le pouls, la saturation et la température furent notés pendant toute la durée de l'anesthésie. Des échantillons de gaz artériel ont été pris avant la greffe et à chaque heure afin d'ajuster la ventilation pendant la durée de l'anesthésie. L'oxygénation des chiens fut calculée en faisant le ratio  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ . Après une période de 8 heures post-transplantation, les animaux ont été sacrifiés en clampant l'aorte et l'artère pulmonaire. Les poumons ont ensuite été divisés en lobes et congelés dans de l'azote liquide, avant d'être gardé à  $-80^\circ\text{C}$  pour des études subséquentes.

## 2.2 Mesure de clairance *in vivo*

La mesure de clairance alvéolaire (ALC) permet d'évaluer la capacité de l'épithélium pulmonaire à résorber l'œdème. Après 4 heures de reperfusion, la bronche souche inférieure du poumon transplanté a été canulée afin d'instiller 30 mL d'une solution de BSA 5% préchauffée à 37°C. Le lobe canulé a ensuite été gonflé avec une pression positive d'air entre 6 à 7 mmH<sub>2</sub>O (FIO<sub>2</sub>= 0,21) sans ventilation.

### 2.2.1 Préparation de l'instillat, instillation et échantillonnage

L'instillat a été préparé à une concentration de 5% d'albumine sérique bovine (BSA) dans du lactate Ringer. La concentration protéique de la solution a été vérifiée en faisant un dosage de Biuret (voir 2.5.2). La solution seule a été instillée chez le groupe non-traité, et la solution contenant un ajout de 10<sup>-3</sup>M de dbcAMP+ 10<sup>-3</sup>M d'aminophylline a été instillée chez le groupe traité. Une perfusion d'aminophylline 1 mg/kg/hre, démarrée 1 heure avant l'instillation, a aussi été faite chez le groupe traité.

Le traitement a été choisi puisqu'il a été démontré efficace pour stimuler la clairance alvéolaire *in vivo* chez le mouton.<sup>13</sup>

La concentration protéique de départ correspondait au prélèvement de 1 mL fait 1 minute suite à l'instillation. Par la suite, un échantillon de 700 µl a été prélevé à chaque heure. La mesure de clairance, exprimée en pourcentage du liquide instillé, nous donne une idée de la capacité de l'épithélium alvéolaire à effectuer la clairance liquidienne. Une ALC négative peut être interprétée comme une accumulation de liquide au niveau pulmonaire, alors qu'une ALC positive démontre une réabsorption de liquide vers le compartiment interstitiel.

### 2.2.2 Dosage de protéines par Biuret

Le dosage de Biuret est une technique permettant de déterminer la concentration de protéines totale d'un échantillon.<sup>37</sup> Cette technique est surtout utilisée pour doser des échantillons de sérum ou de plasma.

Une des forces de cette technique est que le réactif réagit de manière égale peu importe la protéine. Le standard de protéines que nous avons utilisé est du HSA et gamma-globulines à 80 mg/mL. Les échantillons de liquide alvéolaire ont été centrifugés pendant 5 minutes afin de séparer l'instillat du surfactant avant d'effectuer le dosage. Un volume de 40µl d'échantillon a été utilisé en duplicata pour le dosage et un autre 40µl pour faire le blanc de l'échantillon. Le réactif de Biuret est composé de 0,012M CuSO<sub>4</sub>, 0,032M K,Na-tartrate, 0,030M KI et de 0,60M NaOH. Le blanc de Biuret est composé de 0,032M K,Na-tartrate, 0,030M KI et de 0,60M NaOH. La réaction se fait à température pièce pendant 30 minutes. On lit ensuite la réaction au spectrophotomètre à 540nm en utilisant de l'eau pour faire le zéro. La concentration de protéines est par la suite déterminée à l'aide d'une courbe standard faite à partir des dilutions du standard de protéines.

### 2.2.3 Mesure de la fraction d'eau du liquide alvéolaire par la méthode gravimétrique

100µL de liquide alvéolaire en duplicata a été utilisé pour mesurer la fraction d'eau du liquide alvéolaire. L'échantillon est déposé dans une assiette d'aluminium afin de connaître le poids de l'échantillon et mis à sécher au four Pasteur à 87°C pour 24-48 heures afin de faire évaporer l'eau avant de reprendre le poids. Il est alors possible de connaître la fraction d'eau contenue dans le liquide alvéolaire.

$$\text{Fraction d'Eau (\%)} = (\text{Poids}_{\text{mouillé}} - \text{Poids}_{\text{sec}}) / \text{volume échantillon} \times 100$$

### 2.2.4 Calcul de la clairance

La mesure de la clairance alvéolaire a été faite en utilisant la concentration protéique initiale de l'instillat (1 min post-instillation) et la concentration protéique finale à différents temps selon la formule suivante :

$$\text{ALC (\%)} = (V_i \times Fw_i - V_f \times Fw_f) / (V_i \times Fw_i) \times 100$$

où Fw est la fraction d'eau initiale (i) et finale (f) du liquide alvéolaire mesurée par la méthode gravimétrique. V représente le volume initial (i) et final (f) du liquide alvéolaire et V<sub>f</sub> est calculé avec la formule suivante :  $V_f = (V_i \times TP_i) / TP_f$ , où TP est la concentration protéique mesurée par Biuret.

### 2.3 Études de liaison pour les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Afin de comparer la population de récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  -adrénergiques dans les tissus normaux et transplantés, des études de liaison ont été effectuées en faisant des courbes de compétition. Pour ce faire un antagoniste spécifique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, l'ICYP I<sup>125</sup>, radioligand qui possède une affinité semblable pour les deux sous-types de récepteurs, a été utilisé. Les courbes de compétition s'effectuent en utilisant des concentrations croissantes d'antagonistes hautement spécifiques pour chacun des sous-types de récepteurs. Il est alors possible de déterminer l'affinité de ces ligands non-marqués pour leurs sites de liaison en quantifiant le pouvoir de déplacement de chacun de ces ligands sur le radioligand.

#### 2.3.1 Isolation des membranes et dosage de protéines

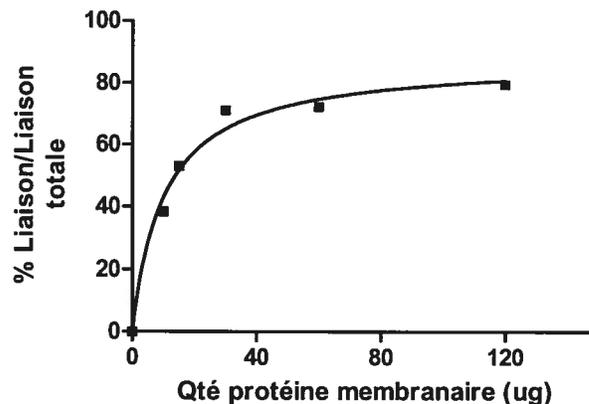
Un morceau de 2-3g de poumon congelé fut taillé avec un marteau. Le morceau de poumon a alors été mis dans un pulvérisateur à tissu, préalablement congelé dans l'azote liquide, afin de réduire le tissu en poudre. La poudre a été transférée dans un tube de plastique contenant 5 mL de tampon de lyse (20mM NaHCO<sub>3</sub>). L'homogénéisation a été faite au polytron 2x10 sec à vitesse maximale dans un bécher contenant de la glace. Le volume a ensuite été complété à 30 mL avec le tampon de lyse et vortexé. Une centrifugation à 900 g pendant 10 minutes à 4°C a été faite. Le surnageant a ensuite été passé dans 4 épaisseurs de coton fromage et puis récolté afin de se débarrasser des gros débris. Une ultracentrifugation à 40 000 g pour 30 minutes à 4°C a permis de récolter les membranes, puis le surnageant a été jetté. Le culot fut resuspendu en vortexant dans 1 mL de tampon de lyse. Une deuxième ultracentrifugation à 40 000 g pour 30 minutes à 4°C a été faite, et le surnageant jetté. Le culot a été resuspendu en vortexant dans 1 mL de tampon d'incubation (TRIS 10mM pH 7.4, 154mM de NaCl, 0.55mM d'acide ascorbique).

La concentration de protéines fut alors déterminée par la technique de Bradford<sup>19</sup> en utilisant de l'albumine sérique de bovin comme standard à une concentration de 2.0  $\mu\text{g/mL}$  à 8  $\mu\text{g/mL}$ .

### 2.3.2 Mise au point des conditions pour les expériences de liaison

Avant de faire les courbes de compétition, les conditions de l'expérience furent mises au point afin d'optimiser la liaison (ei : le temps d'incubation, la concentration de protéines et la concentration de radioactivité). La concentration de protéines a été évaluée dans des tubes de plastique avec différentes concentrations de protéines (10 à 120  $\mu\text{g}$  dans un volume constant de 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'incubation). Ces concentrations de protéines ont été incubées avec une concentration de radioactivité choisie au hasard de 25 000 cpm (dans un volume constant de 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'incubation). Le volume a ensuite été complété à 200  $\mu\text{L}$  avec du tampon d'incubation. Les tubes ont été incubés à température ambiante pour 2 heures sur une plaque agitatrice. La séparation du radioligand lié et non-lié fut effectuée par filtration sur des filtres de fibre de verre Whateman GF/C. Les filtres ont ensuite été comptés au  $\gamma$ -compteur. On exprime ensuite le pourcentage de liaison sur la radioactivité totale en fonction de la concentration de protéines. Suite à cette expérience, la concentration de 10  $\mu\text{g}$  de protéine dans un volume de 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'incubation a été choisie afin d'être dans la phase exponentielle de la réaction.

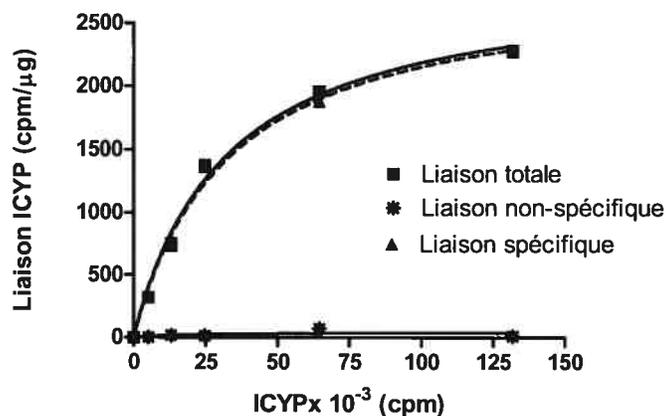
Effet de la concentration de protéine sur le pourcentage de liaison



La concentration de radioactivité optimale fut ensuite évaluée. 10  $\mu\text{g}$  de protéines dans un volume de 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'incubation a été incubé avec des concentrations croissantes de ICYP I<sup>125</sup> allant de 10 000 à 160 000 cpm dans un volume de 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'incubation. Encore une fois, le volume des tubes a été complété à 200  $\mu\text{L}$  avec du tampon d'incubation. La spécificité de la réaction a été évaluée en

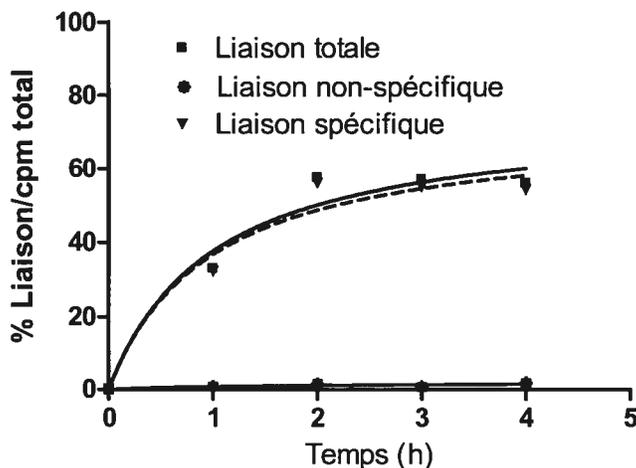
présence de propranolol, un antagoniste  $\beta$ -adrénergique non-spécifique. Les tubes ont ensuite été incubés à température ambiante pour 2 heures sur une plaque agitatrice avant d'être filtrés sur des filtres Whateman GF/C. Les filtres ont ensuite été comptés au  $\gamma$ -compteur. On exprime ensuite la liaison en cpm/ $\mu$ g protéine en fonction de la quantité de radioligand. Suite à cette expérience, une concentration d'environ 20 000 cpm de ICYP I<sup>125</sup> dans un volume de 50  $\mu$ L de tampon d'incubation a été choisie afin d'être dans la phase exponentielle de la réaction.

Effet de la concentration de radioligand sur la liaison



Le temps d'incubation optimal a aussi été évalué. 10  $\mu$ g de protéine dans un volume de 50  $\mu$ L de tampon d'incubation avec 20 000 cpm de ICYP I<sup>125</sup> dans un volume de 50  $\mu$ L de tampon d'incubation ont été utilisés. Le volume des tubes a été complété à 200  $\mu$ L avec du tampon d'incubation. Les tubes ont été incubés à température ambiante pour différents temps allant de 1 heure à 4 heures sur une plaque agitatrice avant d'être filtrés sur des filtres Whateman GF/C. Les filtres ont ensuite été comptés au  $\gamma$ -compteur. On exprime ensuite le pourcentage de liaison sur le compte total en fonction du temps d'incubation. Suite à cette expérience, le temps d'incubation de 2 heures a été choisi pour être dans la phase plateau de la réaction afin que les variations de temps ne soient pas un facteur influençant la réaction.

### Effet de la durée de l'incubation sur la liaison



#### 2.3.3 Courbes de compétition

Afin de déterminer et de caractériser la présence des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de chaque sous-type présents dans les poumons de chiens natifs et transplantés, des courbes de compétition furent effectuées. Pour ce faire,  $10\mu\text{g}$  de protéines membranaire et  $\sim 20\,000$  cpm de ICYP  $I^{125}$  ont été incubés en présence de différentes concentrations d'antagonistes spécifiques pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (CGP 20712A) et  $\beta_2$ -adrénergiques (ICI 118,551). 16 différentes concentrations d'antagonistes furent utilisées allant de  $10^{-12}$  à  $10^{-3}\text{M}$ . La séparation du radioligand lié et non-lié et le comptage ont été effectués comme dit précédemment. L'analyse des résultats (Bmax et Kd) a été effectuée grâce au programme AllFit for Windows 2.13 (Charles et André De Léan, 1993-1997) en utilisant le mode courbes de compétition avec une analyse pour 2 sites de liaison. Dans la présente étude, Bmax est calculé en fmol/mg de protéine et le Kd en mM.

#### 2.4 Mesures gravimétriques

Cette technique a pour but de déterminer le ratio du poids mouillé/poids sec des tissus afin d'évaluer la sévérité de la lésion induite par la transplantation. Il s'agit en fait de déterminer le nombre de g eau/g de tissu sec. Le ratio ainsi obtenu est alors corrigé en fonction de l'hémoglobine sanguine.

#### 2.4.1 Mesure du poids mouillé/poids sec

Un morceau d'environ 3-4 g de chacun des poumons fut homogénéisé avec le même poids en eau, Une petite quantité d'homogénat a été prélevée pour le séchage et le reste fut centrifugé à 6000 g pendant 1 h à 4°C pour obtenir le surnageant. Les assiettes d'aluminium pré-identifiées vides ont été pesées, puis repesées suite à l'addition de quelques gouttes de l'homogénat et du surnageant correspondants. Par la suite, les assiettes ont été placées dans un four Pasteur à 87°C pour 24-48 heures afin de faire évaporer l'eau. Les assiettes ont ensuite été repesées et le calcul du poids de l'échantillon sec a été fait. Il est alors possible de faire un ratio poids mouillé/poids sec corrigé en fonction de la concentration d'hémoglobine du sang et du surnageant afin d'évaluer la sévérité de la lésion induite dans le tissu.

#### 2.4.2 Dosage de l'hémoglobine dans le sang et le surnageant

Le taux d'hémoglobine dans le sang et dans le surnageant des échantillons a été mesuré à l'aide du kit *Hemoglobin B* de chez Wako Chemicals USA (#271-73901). 20 µL de sang et 200 µL de surnageant ont été utilisés pour le dosage. Les absorbances ont été lues à 540 nm au spectrophotomètre. La quantité d'hémoglobine se calcule en g/dl à l'aide de l'équation de la droite déterminée avec une courbe standard. La courbe standard est effectuée avec un échantillon d'HB standard à des concentrations entre 5.0 et 29.9 g/dL. Lors de l'utilisation d'un volume de 200 µL, on doit apporter une correction pour le volume de l'échantillon, puisque le volume recommandé par le fabricant est de 20µL. Cette correction fut déterminée par l'équation suivante :  $HB_{\text{corrigée}} = HB_{\text{calculée}} \times V_{\text{standard}}/V_{\text{inconnu}} \times V_{\text{t inconnu}}/V_{\text{t standard}}$  où V représentait le volume de l'échantillon et Vt le volume totale de la réaction.

### 2.5 Quantification de l'expression de CFTR et d'αENaC par Northern blot

Afin de quantifier l'expression des différents gènes potentiellement impliqués dans la clairance alvéolaire, la technique du Northern blot fut choisie. Cette technique a été choisie afin de poursuivre les

résultats obtenus par le passé avec cette même technique dans le labo. Il a été impossible de comparer ces deux gènes par Western blot puisque l'obtention d'anticorps de chien était problématique et l'homologie inter espèces de ces gènes était faible.

### 2.5.1 Purification de l'ARN

L'expression des ARNm de CFTR et d' $\alpha$ ENaC a été analysée à partir de tissus pulmonaires périphériques natifs et transplantés de chiens gardés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'ARN total a été extrait avec du TRIzol et du chloroforme, puis dosé au spectrophotomètre sous lumière au deutérium à 260-280 nm. Le ratio 260/280 était entre 1,6 et 2,0.

### 2.5.2 Northern blot

Pour le Northern blot,  $10\mu\text{g}$  par échantillon d'ARN total a été utilisé. L'ARN a été séparé par électrophorèse sur gel de 1% agarose-formaldéhyde, avant d'être coloré au SyberGreen pour en vérifier l'intégrité. Les bandes ont été visualisées par «PhosphorImaging» au Typhoon (Molecular Dynamics, CA). L'ARN total a ensuite été transféré par buvardage sur une membrane de nylon pendant la nuit avec le tampon standard 10X de citrate de sodium. La membrane a été fixée aux ultraviolets et conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'hybridation. L'hybridation s'est faite avec une sonde d'ADNc codant pour le gène  $\alpha$ ENaC de rat et une sonde d'ADNc codant pour le gène de CFTR de rat et marquées aux dCTP<sup>32</sup> par la DNA polymérase I (random labelling). La membrane a ensuite pu être visualisée par autoradiographie. La quantité d' $\alpha$ ENaC a été normalisée par la bande d'ARN ribosomal 18S sur le gel coloré au SyberGreen. Suite à cette normalisation, la densité des bandes de l'ARNm du poumon transplanté et de l'ARNm du poumon natif a pu être comparé avec le programme ImageQuant. Les résultats pour le poumon transplanté sont exprimés en % de l'ARNm d' $\alpha$ ENaC restant par rapport au poumon natif. Les résultats obtenus pour CFTR n'ont pu être présentés puisque nous avons été incapables de voir une bande. Il est possible qu'étant donné la faible expression de CFTR dans les alvéoles pulmonaires, cela pourrait

expliqué que nous n'ayons pas été capable de le détecter. Par ailleurs, il semble aussi possible que la différence d'espèces entre la sonde et l'ARN utilisé ait pu être la cause de cette absence de détection.

## 2.6 Culture cellulaire

### 2.6.1 Chirurgie expérimentale

La chirurgie expérimentale pour l'obtention des cellules épithéliales de type II a été pratiquée sur des rats mâles Sprague-Dawley pesant entre 175-200g. Suite à une anesthésie au Somnotol par injection intrapéritonéale (40mg/kg), une incision abdominale du bas de l'abdomen jusqu'au cou a été faite. Ensuite, l'ouverture de la cage thoracique a été faite afin d'exposer le cœur et les poumons à l'aide d'un écarteur. Le thymus a par la suite été retiré et la trachée isolée. Une trachéotomie a été faite avec un cathéter de grosseur 18 permettant la ventilation de l'animal pendant la perfusion. L'animal a par la suite été saigné en coupant les deux oreillettes et la veine cave inférieure puis perfusé par l'artère pulmonaire avec 60cc de solution II (SGGS (NaCl 154mM, glucose 5,55mM, gentamycine 10mg/L), KCl 5,3mM, HEPES 10mM, tampon (Na)PO<sub>4</sub> pH 7.4 2,65mM, CaCl<sub>2</sub> 1,9mM, MgSO<sub>4</sub> 1,3mM). Le bloc coeur-poumon fut retiré en coupant la trachée et l'aorte thoracique. Les poumons furent lavés à 10 reprises avec 8 cc de la solution I (SGGS (NaCl 154mM, glucose 5,55mM, gentamycine 10mg/L), KCl 5,3mM, HEPES 10mM, tampon (Na)PO<sub>4</sub> pH 7.4 2,65mM) pour se débarrasser du surnageant et des macrophages alvéolaires.

### 2.6.2 Traitement des poumons et purification des cellules

Les poumons furent ensuite incubés à 37°C en présence d'élastase pour 1 minute et 3X 10 minutes (160 unités/rat). Les poumons ont ensuite été coupés pendant 4 minutes avec des ciseaux en présence de 5mL de DNase I (250µg/mL). Par la suite, 5 mL de sérum fœtal bovin (FBS) a été ajouté pour inhiber l'activité enzymatique de l'élastase. Après une période d'agitation de 4 minutes en présence de FBS, la préparation a été filtrée sur des membranes successives : 2 épaisseurs de gauze, 1 filtre de 150µM et 1

filtre de 30 $\mu$ M. Le filtrat a été centrifugé puis le culot suspendu dans 7,5mL de MEM {Minimal essential medium} contenant les ajouts suivants : gentamycine 0,08mg/mL, NaHCO<sub>3</sub> 0,15% et L-glutamine 2mM. Cette suspension a été purifiée par adhérence différentielle sur des IgG afin d'obtenir une majorité de cellules alvéolaires de type II. L'incubation s'est faite à 37°C avec 5%CO<sub>2</sub> pour 30-60 minutes. Suite à cette incubation, les cellules alvéolaires de type II ont été récoltées dans les pétris et les macrophages alvéolaires sont restés adhérents aux IgG. Les cellules furent centrifugées pour une deuxième fois, puis le filtrat suspendu dans 10 mL de MEM+FBS 10%+Septra 96mg/mL [triméthoprim 16mg/mL+ sulfaméthoxazole 80mg/mL]. Les cellules ont été comptées avec un hémacytètre en présence de 0,5% de bleu de Trypan pour déterminer la viabilité cellulaire. Le calcul pour le dénombrement des cellules est le suivant :

$$\text{Nombre de cellules/mL} = \text{compte total} \times 5 \times 10^4 \times \text{dilution}$$

### 2.6.3 Mise en culture des cellules

Pour les mesures de courant en chambre de Ussing, les cellules ont été mises en culture dans le milieu MEM+FBS 10%+Septra sur des filtres Costar à une densité de 4X10<sup>6</sup>cellules/filtre. La quantité de milieu en basolatéral était de 2,5mL et de 1,5 mL en apical. Pour les mesures d'AMPc intracellulaire, les cellules ont été mises en culture dans le milieu MEM+FBS 10%+Septra à une densité de 2X10<sup>5</sup> cellules/puit sur une plaque de 96 puits dans un volume total de 200 $\mu$ L. Le milieu fut changé au jour 3 pour du MEM+ 10% FBS sans septra. Les expériences de Ussing et de mesure de l'AMPc intracellulaire se sont fait au jour 4.

## 2.7 Mesure de cAMP intracellulaire par EIA

Afin de vérifier si les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont toujours fonctionnels suite à une exposition au TNF $\alpha$ , l'accumulation d'AMPc intracellulaire suite à une stimulation à la terbutaline et à la forskoline a

été mesurée. L'accumulation d'AMPC intracellulaire fut détectée par un kit EIA (RPN225, Amersham Biosciences) dans le lysat cellulaire des cellules contrôles ou traitées au TNF $\alpha$  pour 24 heures.

### 2.7.1 Traitement et stimulation des cellules

Les cellules ont été mises en présence de TNF $\alpha$  de souris en apicale et en basolatérale à 100 ng/mL au jour 3 pour 24 heures. Les cellules ont été stimulées avec de la terbutaline  $10^{-4}$ M ou de la forskoline  $10^{-5}$ M pour 1, 5, 15, 30 ou 60 minutes, puis le surnageant fut aspiré. Ensuite les cellules ont été lysées avec la solution prévue à cet effet dans le kit. Le reste de l'expérience s'est déroulé tel que mentionné dans le protocole, et le produit de la réaction colorimétrique a été lu au spectrophotomètre à 450nm suite à l'addition de 100 $\mu$ L/puit d'acide sulfurique 1M afin de stopper la réaction.

## 2.8 Mesure du courant de court-circuit des cellules de type II

La mesure du courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) est effectuée dans une chambre de Ussing. On définit le  $I_{sc}$  comme le flot de charge par unité de temps. Pour effectuer la mesure de  $I_{sc}$ , une différence de potentiel transépithélial ( $V_{te}$ ) de 0 mV est appliquée sur un épithélium. Ainsi, avec un amplificateur, il est possible d'injecter un courant qui permet de garder  $V_{te}$  à 0 mV. La quantité de courant requise pour l'obtention d'une  $V_{te}$  de 0 mV est constamment ajustée et mesurée. De manière intermittente, le voltage est clampé à 1 mV afin de permettre un estimé de la résistance de l'épithélium ( $R_{te}$ ). Ainsi, le calcul du  $I_{sc}$  est fait par l'équation suivante qui découle de la loi de Ohm<sup>78</sup> :

$$I_{sc} = V_{te} / R_{te}$$

Les expériences en chambre de Ussing ont été faites dans du MEM à 37°C bullé avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le but était de comparer l'impact sur la stimulation du transport du sodium d'un agent  $\beta_2$ -adrénergique, la terbutaline, en absence et en présence de TNF $\alpha$ . Le TNF $\alpha$  a été choisie puisqu'il a été démontré qu'elle jouait un rôle prépondérant dans la lésion d'ischémie-reperfusion post-transplantation pulmonaire.<sup>74,74,87</sup>

Par ailleurs, notre laboratoire a démontré une chute importante de l'expression de ENaC en post-transplantation pulmonaire lorsque la clairance liquidienne des poumons est compromise.<sup>125</sup> D'autres résultats montrent par ailleurs que le TNF $\alpha$  diminue significativement l'expression de ENaC *in vitro*.<sup>35</sup>

### 2.8.1 Traitement et stimulation des cellules

Les cellules ont été traitées en apicale et en basolatéral au TNF $\alpha$  de rat 100 ng/mL au jour 3 pour 24 heures. Le milieu des cellules fut lavé délicatement avant de mettre les cellules dans la chambre de Ussing. La stimulation à la terbutaline, un agoniste  $\beta_2$ -adrénergique, s'est fait à la concentration  $2 \times 10^{-6}$  M en basolatéral seulement.<sup>98</sup> La terbutaline a été ajoutée au montage seulement après l'obtention d'un courant de base stable.

### 2.8.2 Mesure du courant amiloride-sensible

La mesure du courant sensible à l'amiloride donne une idée du courant généré par les canaux sodiques de type ENaC. Cette mesure a été possible suite à l'ajout de  $10^{-6}$  M d'amiloride dans le bain du côté apical. Il a aussi été possible de mesurer la portion du courant sodique total en ajoutant  $10^{-3}$  M d'amiloride dans le bain du côté apical.

## 2.9 Statistiques

Les résultats de cette étude sont exprimés sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne (SE). Les statistiques ont été faites à l'aide du programme SigmaStat version 3.1. Le test statistique qui a été utilisé pour la comparaison des ratios poids mouillé/poids sec et des courants amiloride-sensible est une analyse de variance à deux niveaux. Pour la comparaison du nombre et de l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, le test de t pour données appariées a été utilisé. Pour ce qui de la comparaison des résultats du suivi hémodynamique, de l'accumulation d'AMPc intracellulaire et de l'ALC, un ANOVA

pour mesures répétées a été utilisé. Pour la comparaison des résultats de Northern blot, le test de Mann-

Whitney a été utilisé, puisque les données ne suivaient pas une distribution normale. Une différence est dite significative lorsque le  $p < 0,05$ .

### 3 Résultats

#### 3.1 Suivi hémodynamique des chiens avant et après la transplantation pulmonaire

Le suivi hémodynamique des chiens pendant l'expérience est essentiel afin de s'assurer de la stabilité de leur état et d'ainsi pouvoir comparer nos deux groupes. En effet, si les paramètres hémodynamiques sont semblables, il est possible d'écarter cette variable comme étant la cause probable d'une différence observée, le cas échéant. Les paramètres de pression artérielle moyenne, de pression moyenne dans l'artère pulmonaire et de pH artériel ont été pris avant la greffe, immédiatement après puis chaque heure pendant 8 heures post-reperfusion. La ventilation des chiens était ajustée en fonction des résultats de gaz artériels de manière à ce que le pH, la  $pO_2$  et la  $pCO_2$  soit à un niveau physiologique.

Aucune différence significative n'a été observée au niveau du pH artériel, de la MAP et de la MPAP entre les groupes de chiens transplantés non traités et traités au dbcAMP +aminophylline pendant la durée de l'expérience. Il est important de noter que la pression artérielle moyenne des chiens de chacun des groupes chute en fonction du temps. Cette chute de pression peut être attribuée à la perte de sang pendant la transplantation pulmonaire et à la période prolongée pendant laquelle les chiens sont maintenus sous anesthésie. En effet, l'administration d'isoflurane et de propofol pour le maintien de l'anesthésie sur une période prolongée peut causer une chute de la MAP puisque ces agents sont reconnus comme hypotenseurs.<sup>33,99</sup> Par ailleurs, pour ce qui est de la MPAP, si on regarde les résultats à partir de la 4<sup>e</sup> heure, on ne peut exclure hors de tout doute qu'il ne se passe rien. Or, dans l'ensemble, le test statistique ne permet pas de trouver une différence significative entre les deux groupes. (**Tableau 3**) Pour ce qui est de l'oxygénation des chiens, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traité et non traité avant la chirurgie et pendant la période post-reperfusion. (**Figure 9**) Il est intéressant de noter une baisse progressive du ratio  $PiO_2/FiO_2$  suite à la greffe. Cette détérioration de l'oxygénation des chiens

peut s'expliquer en grande partie par l'accumulation d'œdème au niveau du poumon transplanté, tel que montré par les résultats de poids mouillé/poids sec. On remarque que cette détérioration est accentuée à la 4<sup>ème</sup> heure post-reperfusion lors de l'instillation de liquide dans le lobe inférieur gauche. Il y a donc une perte de la capacité ventilatoire de ce lobe pulmonaire, contribuant ainsi à la chute du ratio  $PiO_2/FiO_2$ .

### **3.2 Effet de la transplantation pulmonaire sur le nombre de récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans les poumons**

L'absence de réponse des poumons transplantés à la terbutaline pourrait s'expliquer par une diminution du nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La quantification de ces récepteurs a été faite par études de liaison en faisant des courbes de compétition. Pour ce faire, un antagoniste possédant une affinité comparable pour les deux sous-type de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, le ICYP<sup>125</sup>, et deux antagonistes spécifiques pour chacun des deux sous-types de récepteurs ont été utilisés. L'ICI 118 551 est un antagoniste hautement spécifique pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et le CGP 20712A est un antagoniste hautement spécifique des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. Nous avons incubé 10 $\mu$ g de protéines membranaires avec ~20 000 cpm de ICYP<sup>125</sup>. 16 différentes concentrations d'antagonistes spécifiques allant de 10<sup>-12</sup> à 10<sup>-3</sup>M ont été ajoutées ce qui a permis de tracer des courbes dont l'analyse a été faite à l'aide du programme Allfit. **(Figure 10)**

Aucune différence significative n'a été observée entre le poumon natif et le poumon transplanté des chiens non traités au niveau du nombre de récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (150 $\pm$ 29 fmol/mg protéine vs 127 $\pm$ 39 fmol/mg protéine) et  $\beta_2$ -adrénergiques (1172 $\pm$ 157 fmol/mg protéine vs 1031 $\pm$ 123 fmol/mg protéine). Il appert donc que la transplantation pulmonaire n'affecte pas le nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents dans les poumons. **(Figure 11)**

### 3.3 Effet de la transplantation pulmonaire sur l'affinité des récepteurs $\beta$ -adrénergiques pour l'ICI 118 551

La constante d'inhibition,  $K_i$ , se définit comme la concentration d'antagoniste nécessaire pour déplacer 50% de la liaison maximale du ligand radiomarqué. Plus le  $K_i$  d'un antagoniste est faible, plus cet antagoniste possède d'affinité pour un type de récepteur donné. Afin de voir si la transplantation pulmonaire modifie l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, nous avons comparé les constantes d'inhibition de l'ICI 118 551 dans le poumon natif et transplanté. La courbe de l'ICI 118 551 a été utilisée étant donné que la courbe du CGP 20712A était beaucoup plus variable. Étant donné que les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques sont une composante mineure (moins de 20%), il est plus difficile de tracer une courbe précise avec un ligand spécifique à ce sous-type en particulier.<sup>71</sup> Il est important de noter que la  $K_{iH}$  représente la constante d'inhibition à haute affinité de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, alors que la  $K_{iL}$  représente la constante d'inhibition à faible affinité de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. En effet, comme dit plus tôt, l'ICI 118 551 est un antagoniste sélectif des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques qui possède une certaine affinité pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques à plus fortes concentrations.

Aucune différence significative au niveau de l'affinité de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ( $K_{iH}$ ) n'a été observée entre le poumon natif et transplanté ( $1,6 \pm 0,2$  nM vs  $1,9 \pm 0,4$  nM). Pour ce qui est de l'affinité de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques ( $K_{iL}$ ), aucune différence significative n'a été observée entre le poumon natif et transplanté ( $1603,0 \pm 601,5$  nM vs  $1963,7 \pm 782,3$  nM). La transplantation pulmonaire ne semble donc pas modifier l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. (**Figure 12**)

### 3.4 Effet d'un traitement combiné de dbcAMP+aminophylline sur la clairance alvéolaire suite à une transplantation pulmonaire

Le modèle de transplantation unipulmonaire canin permet d'étudier les lésions pulmonaires induites par les phénomènes d'ischémie-reperfusion et causant un œdème pulmonaire. En clinique, la présence plus ou moins importante d'œdème pulmonaire peut compromettre la survie des patients, d'où l'importance de trouver des moyens permettant de stimuler la réabsorption de cet oedème. La mesure de la clairance alvéolaire est un indicateur de la capacité de transport de l'épithélium pulmonaire et donc de la vitesse de résorption de l'œdème. Lors de l'instillation d'une solution protéique isosmotique dans un lobe pulmonaire normal non lésé, on s'aperçoit que la concentration de protéine dans l'instillat est augmentée étant donné la fonction de réabsorption de l'épithélium alvéolaire. L'eau étant réabsorbée, les protéines se concentrent dans le liquide instillé. En échantillonnant cet instillat, il est possible de déterminer la clairance alvéolaire d'un poumon. Ainsi, nous avons instillé à 4 heures post-reperfusion une solution de BSA 5% dans le lobe inférieur gauche (poumon transplanté) des chiens pour mesurer la clairance alvéolaire. Le traitement de dbcAMP+aminophylline a été choisie parce qu'il a été démontré que ce traitement combiné permettait de stimuler la clairance alvéolaire *in vivo* chez des moutons sains sous anesthésie.<sup>13</sup> Nous avons donc voulu voir si ce traitement causant une augmentation directe de l'AMPc intracellulaire permettait de stimuler l'ALC de nos chiens transplantés. En effet, nous savions que les poumons transplantés ne répondaient pas à la terbutaline<sup>125</sup>, un agent  $\beta_2$ -adrénergique permettant d'augmenter l'AMPc. La terbutaline exerce son action via les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Nous pensions donc qu'en contournant le récepteur potentiellement diminué en nombre ou dysfonctionnel, il serait possible de stimuler l'AFC.

La courbe contrôle de la figure 13 a été faite avec les résultats publiés précédemment chez le chien ayant subi seulement une thoracotomie.<sup>125</sup> Sur cette figue, il est possible de voir qu'un poumon non-lésé est

capable de résorber un liquide que l'on instille au niveau pulmonaire. Dans le groupe de chiens transplantés non-traités, une diminution significative de la clairance alvéolaire en fonction du temps est observée. Dans le groupe de chiens transplantés et traités au dbcAMP+aminophylline, cette diminution significative de la clairance alvéolaire en fonction du temps est aussi observée. Par ailleurs, les chiens traités ont une clairance significativement plus basse que les chiens non-traités aux temps 120, 180 et 240 minutes. Le traitement combiné n'a donc pas stimulé l'ALC. (Figure 13)

### **3.5 Effet de la transplantation pulmonaire et du traitement combiné dbcAMP+ aminophylline sur le ratio poids mouillé/poids sec des poumons**

La transplantation pulmonaire induit une lésion tissulaire entraînant un œdème pulmonaire. À l'aide de la méthode gravimétrique, il est possible d'évaluer la sévérité d'une lésion pulmonaire en calculant le ratio poids mouillé/poids sec des poumons. Ainsi, il est possible d'avoir une idée de la quantité d'eau contenue dans le tissu et de comparer les lésions induites dans chacun des groupes. En effet, une lésion tissulaire plus importante pourrait potentiellement expliquer des différences au niveau de la clairance alvéolaire. Il est important de noter que le ratio poids mouillé/poids sec a été fait sur le lobe médian du poumon natif et sur la lingula du poumon transplanté, contrairement aux mesures d'ALC qui ont été faites dans le lobe inférieur du poumon transplanté.

Dans le groupe de chiens non traités, une augmentation significative du ratio poids mouillé/poids sec dans le poumon transplanté par rapport au poumon natif est observée ( $7,10 \pm 0,62$  vs  $4,69 \pm 0,17$ ,  $p < 0,05$ ). Dans le groupe de chiens traités au dbcAMP+aminophylline, une augmentation significative du ratio poids mouillé/poids sec dans le poumon transplanté par rapport au poumon natif est aussi observée ( $8,09 \pm 1,11$  vs  $4,99 \pm 0,32$ ,  $p < 0,05$ ). Par contre, aucune différence n'est observée au niveau de la sévérité de la lésion induite dans le poumon transplanté entre les groupes non traité et traité ( $7,10 \pm 0,62$  vs  $8,09 \pm$

1,11). Il semble donc que la sévérité de la lésion pulmonaire induite par la transplantation soit équivalente dans les deux groupes. (Figure 14)

### **3.6 Effet de la transplantation pulmonaire sur l'expression de CFTR et d' $\alpha$ -ENaC**

Il a été publié précédemment qu'une chute de 75% des messagers et de la protéine d' $\alpha$ ENaC est présente dans le modèle de transplantation unipulmonaire canin suite à une période de reperfusion.<sup>125</sup> Or, l'importance de ce canal sodique a été clairement établie par le passé, notamment par les expériences faites sur des souris knock-out pour ce gène.<sup>40,59</sup> Nous voulions valider par des expériences de Northern blot si cette chute était aussi présente chez nos animaux.

Les résultats démontrent une chute significative de l'ordre d'environ 50% des messagers d' $\alpha$ ENaC dans les poumons transplantés par rapport aux poumons natifs. En effet, les poumons transplantés ont une expression d' $\alpha$ ENaC de  $53,6 \pm 9,3\%$  par rapport aux poumons natifs. Ces résultats viennent donc confirmer l'impact négatif de la transplantation sur l'expression d' $\alpha$ ENaC. (Figure 15)

Pour ce qui est de CFTR, il a été impossible de le quantifier dans les poumons de chiens. En effet, aucune bande n'a pu être détectée. La faible expression de CFTR dans les alvéoles pulmonaires pourrait être la cause de cette difficulté de détection. En effet, il est connu que l'expression de CFTR diminue plus on descend dans les voies respiratoires.<sup>20</sup> Aussi, l'ADNc utilisé provenait de CFTR de rat ; il est donc possible que la différence d'espèce ait aussi pu jouer un rôle. Il appert qu'une quantification par RT-PCR pourrait permettre de contrecarrer ces problèmes potentiels ; cette dernière technique étant plus sensible et plus spécifique.

### 3.7 Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ 100ng/mL sur la stimulation des cellules ATII par la terbutaline et par la forskoline

Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire de première importance impliquée dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion en période péri-opératoire<sup>74,87,121</sup>. Lorsque le TNF $\alpha$  est injecté chez le cochon d'Inde, il cause une augmentation de la perméabilité et un œdème pulmonaire.<sup>124</sup> Outre les effets bien connus du TNF $\alpha$  sur l'endothélium, il a été démontré qu'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$  100ng/mL induit une baisse de courant dans des cellules épithéliales alvéolaires et une chute de l'expression du canal épithélial sodique (ENaC).<sup>35</sup> La forskoline et les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques comme la terbutaline provoquent une augmentation de l'AMPc intracellulaire responsable de la stimulation de la réabsorption de sodium et de chlore dans les cellules alvéolaires via une augmentation d'AMPc intracellulaire. Nous avons donc voulu voir si le TNF $\alpha$  pouvait moduler la réponse aux agents  $\beta_2$ -adrénergiques, tel qu'observé dans notre modèle *in vivo* de lésion pulmonaire, en causant un dysfonctionnement potentiel de ces récepteurs.

Nous avons observé que l'accumulation maximale d'AMPc intracellulaire suite à une stimulation avec la terbutaline et la forskoline est rapide et survient entre 1 et 5 minutes de stimulation. Nous avons observé une différence significative dans l'accumulation d'AMPc secondaire à une stimulation à la terbutaline entre les cellules contrôles et traitées au TNF $\alpha$  pour 24 heures aux temps 1, 5, et 15 minutes. Pour ce qui est de l'accumulation d'AMPc secondaire à une stimulation à la forskoline, aucune différence significative n'a été observée. Le TNF $\alpha$  semble donc affecter la réponse à la terbutaline des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques en diminuant l'accumulation d'AMPc intracellulaire aux temps 1, 5 et 15 minutes. (Figure 16 et 17)

### 3.8 Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ 100ng/mL sur le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline en chambre de Ussing

Il est bien connu qu'une stimulation à la terbutaline en chambre de Ussing provoque une augmentation du courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) d'une monocouche de cellules alvéolaires. Plusieurs concentrations différentes de terbutaline ont été utilisées par différents groupes de recherche par le passé. Certains utilisent la dose  $10^{-5}M$ <sup>34</sup>,  $2 \times 10^{-5}M$ <sup>72</sup>,  $10^{-4}M$ <sup>28,111</sup> et d'autres  $2 \times 10^{-6}M$ <sup>102</sup>. Nous avons choisi les doses  $2 \times 10^{-6}M$  et  $10^{-4}M$  afin de comparer les effets de ces deux doses sur la stimulation du courant amiloride-sensible en condition contrôle et suite à un traitement au TNF $\alpha$ .

Dans les cellules contrôles, l'ajout de terbutaline induit une baisse subie du  $I_{sc}$ , contrairement aux cellules traitées au TNF $\alpha$  dans lesquelles on observe l'effet opposé. (**Figure 18**) Aussi, la portion de courant sensible à l'amiloride est significativement plus grande dans les cellules contrôle ( $58 \pm 7\%$ ) par rapport aux cellules traitées ( $29 \pm 2\%$ ) suite à une stimulation à la terbutaline  $2 \times 10^{-6}M$ . Lors d'une stimulation à  $10^{-4}M$  de terbutaline, on observe le même phénomène. En effet, la portion amiloride-sensible du  $I_{sc}$  est diminuée dans les cellules traitées ( $19 \pm 6\%$ ) par rapport aux cellules contrôles ( $41 \pm 5\%$ ). Par ailleurs, il semble y avoir une tendance, bien que non significative, vers une portion de  $I_{sc}$  amiloride-sensible plus grande lorsqu'on stimule à de plus faible dose de terbutaline. (**Figure 19**)

**Tableau 3**

**Suivi hémodynamique des chiens avant  
et après la transplantation unipulmonaire gauche**

Paramètres	Groupe	Avant chx	Immédiatement après chx	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H	8H
pH artériel	Non-traité	7,37± 0,03	7,40± 0,06	7,44± 0,02	7,35± 0,03	7,33± 0,02	7,29± 0,04	7,35± 0,04	7,38± 0,01	7,40± 0,03	7,35± 0,02
	Traité	7,40±0,03	7,49±0,04	7,38± 0,05	7,39± 0,07	7,41± 0,04	7,40± 0,04	7,36± 0,04	7,41± 0,07	7,39± 0,06	7,32± 0,01
MAP (mmHg)	Non-traité	91± 13	72± 9	73± 8	63± 2	61± 2	68± 4	68± 5	68± 6	66± 6	64± 4
	Traité	86± 4	87± 10	77± 9	69± 5	72± 6	65± 4	69± 6	65± 4	65± 5	65± 3
MPAP (mmHg)	Non-traité	14± 2	18± 3	20± 2	18± 3	18± 2	18± 2	20± 3	19± 2	19± 2	17± 2
	Traité	16±5	14± 2	18± 2	17± 2	16± 2	15± 2	14± 2	12± 2	11± 2	12± 2

MAP : pression artérielle moyenne MPAP : pression moyenne de l'artère pulmonaire

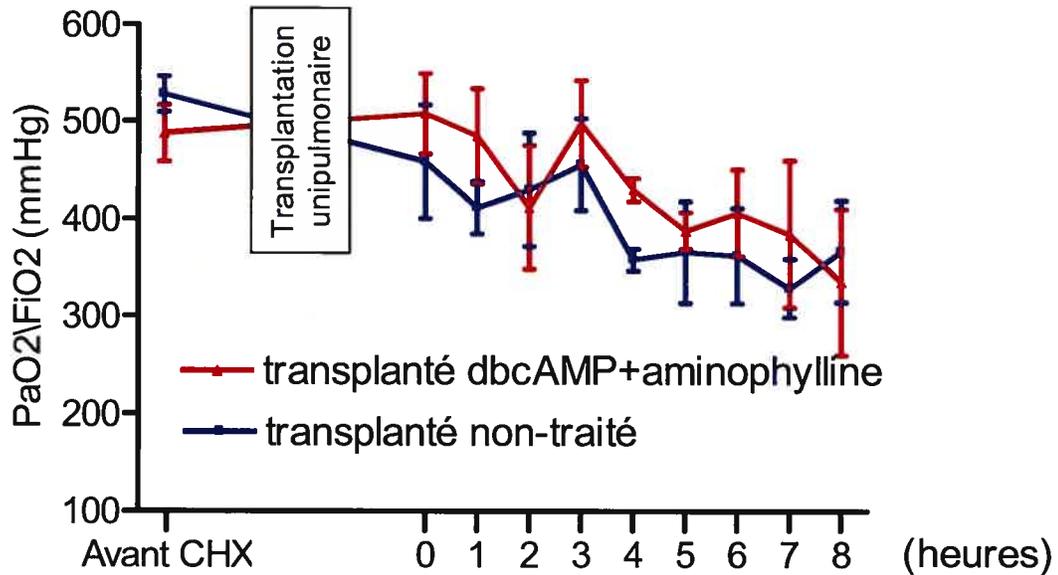
**Tableau 3:** Suivi hémodynamique des chiens avant et après la transplantation. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes au niveau de pH, de la MAP et de la MPAP avant la chirurgie et pendant la période de monitoring post-reperfusion.

Chiens non traités n=5

Chiens traités au dbcAMP+ Aminophylline n=4

**Figure 9**

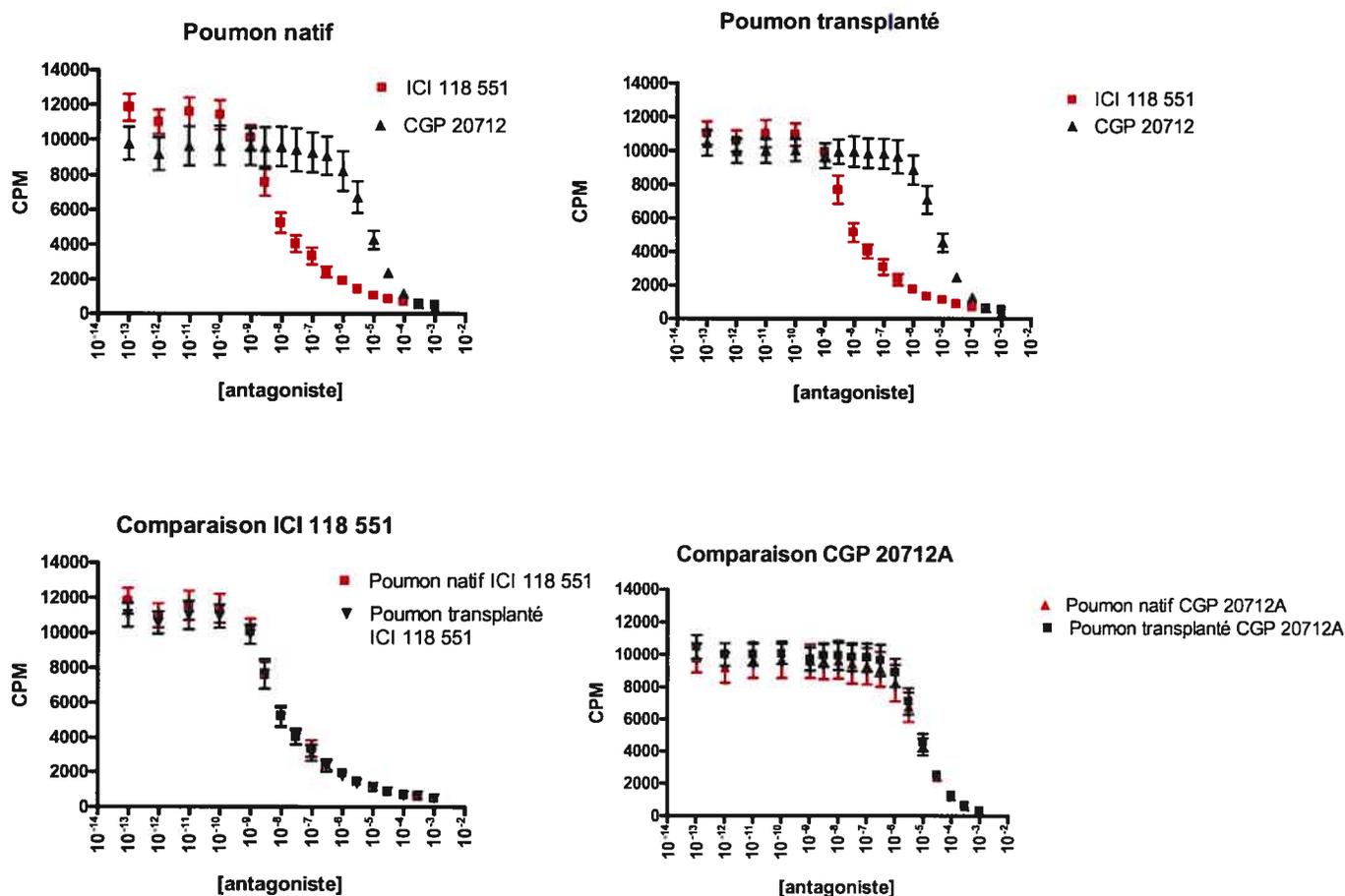
## Oxygénation des chiens pendant l'expérience



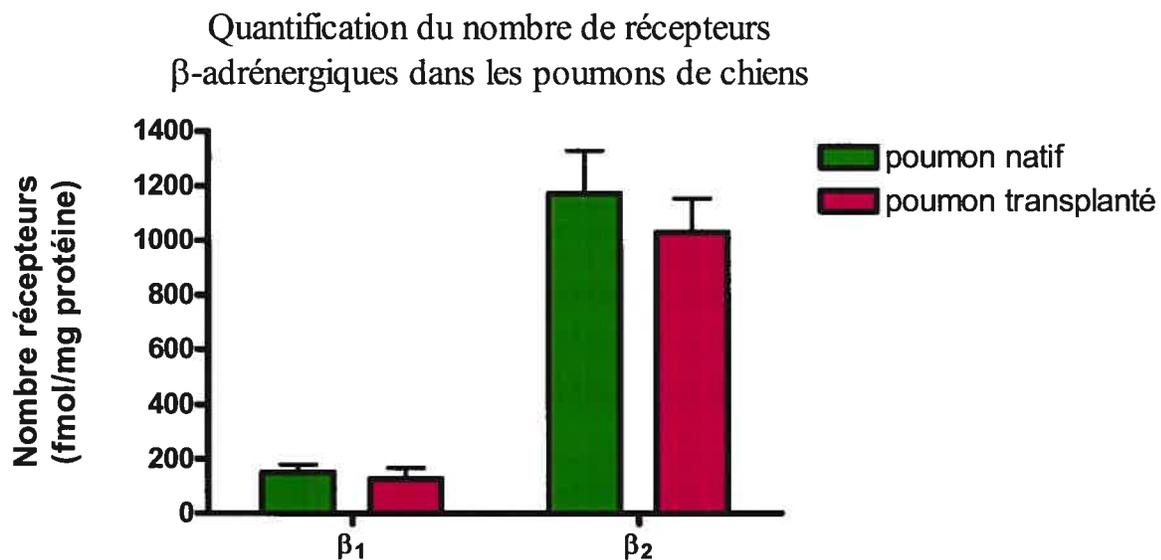
**Figure 9** : Changement du ratio  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  avant la chirurgie et pendant la période de monitoring post-reperfusion. Aucune différence significative n'est observée au niveau de l'oxygénation des chiens transplantés entre les groupes traités et non traités.

Chiens non traités n=5

Chiens traités au dbcAMP+aminophylline n=4

**Figure 10**

**Figure 10 :** Compilation des résultats des études de liaison faites par compétition entre le ICYP I<sup>125</sup> et différentes concentrations d'antagonistes spécifiques aux sous-types de récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques. Le ICI 118 551 est spécifique aux récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et le CGP 20712A est spécifique aux récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. Les courbes de compétitions sont effectuées avec 10  $\mu$ g de protéines, ~20 000 cpm et 16 concentrations d'antagonistes variant de  $10^{-12}$  à  $10^{-3}$ M. L'incubation se fait à température pièce pendant 2 heures.

**Figure 11**

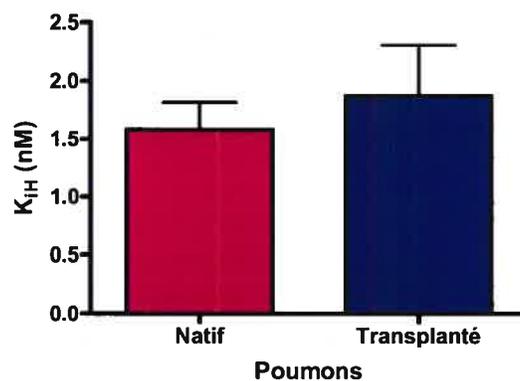
**Figure 11 :** Quantification des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques par études de liaisons dans des poumons natifs et transplantés de chiens. Aucune différence significative n'est observée entre les poumons natifs et transplantés au niveau de la quantité de récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques.

Poumons natifs n=6

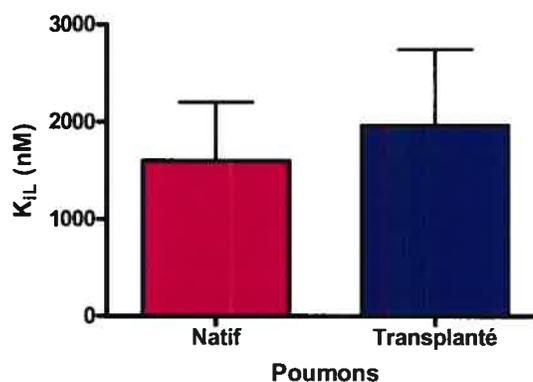
Poumons transplantés n=6

## Figure 12

- A) Comparaison des constantes d'inhibition de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans les poumons natifs et transplantés



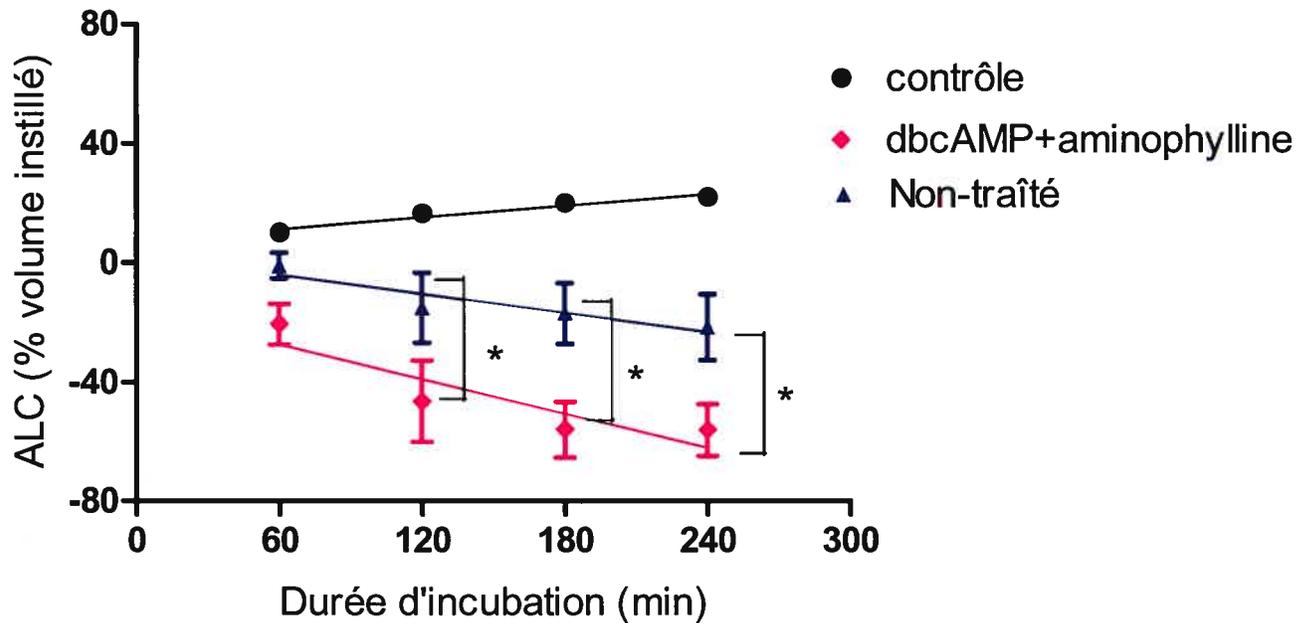
- B) Comparaison des constantes d'inhibition de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques dans les poumons natifs et transplantés



**Figure 12 :** Comparaison des constantes d'affinité du ICI 118 551 entre le poumon natif et transplanté. A)  $K_{iH}$  représente la constante à haute affinité du ICI 118 551 pour le sous-type de récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. B)  $K_{iL}$  représente la constante de basse affinité pour le sous-type de récepteur  $\beta_1$ -adrénergique. Aucune différence significative n'a été observée entre le poumon natif et le poumon transplanté aux niveaux des constantes d'affinité  $K_{iH}$  et  $K_{iL}$ .

Poumons natifs n=6

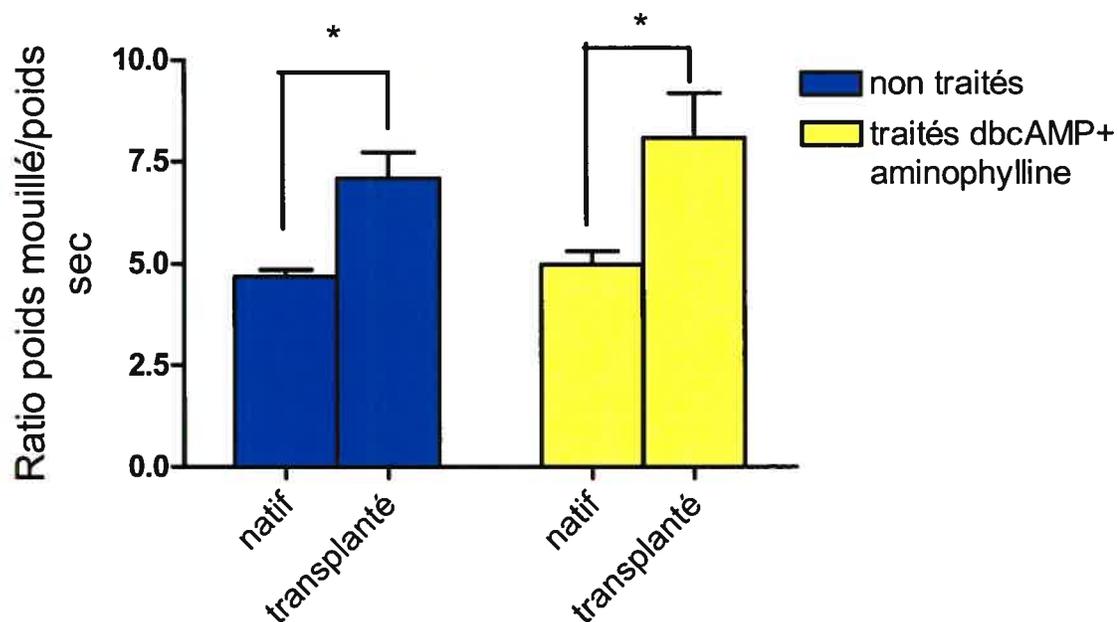
Poumons transplantés n=5

**Figure 13****Clairance alvéolaire dans le poumon transplanté**

**Figure 13** : La clairance alvéolaire (ALC) est déterminée *in vivo* entre la 4<sup>e</sup> et la 8<sup>e</sup> heure post-reperfusion grâce à l'infusion d'une solution protéique dans le lobe inférieur gauche (poumon transplanté). Il est important de noter qu'une valeur d'ALC négative représente l'accumulation d'œdème dans le poumon, alors qu'une valeur d'ALC positive représente une résorption du liquide d'œdème vers l'interstitium. Les données contrôles proviennent de résultats précédemment publiés.<sup>125</sup> Dans le graphique, on remarque que l'ALC diminue en fonction du temps chez les animaux transplantés non-traités contrairement aux animaux contrôles. Cette baisse de l'ALC est aussi présente chez les animaux transplantés et traités au dbcAMP+aminophylline. Par ailleurs une diminution significative de l'ALC à 120, 180 et 240 minutes est observée chez le groupe traité par rapport au groupe non traité. \*( $p < 0.05$ )

Chiens non-traités n=5

Chiens traités au dbcAMP+aminophylline n=4

**Figure 14****Mesures gravimétriques des poumons natifs et transplantés**

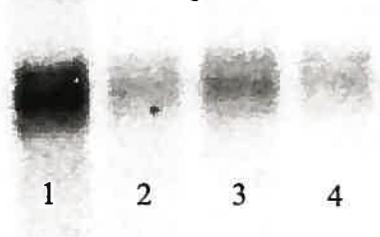
**Figure 14 :** Résultats du ratio poids mouillé/poids sec après 8 hres post-reperfusion dans les poumons natifs et transplantés. Une différence significative du ratio poids mouillé/poids sec est observée entre le poumon natif et transplanté dans le groupe non traité et traité. Par contre, aucune différence n'est observée entre les groupes pour le poumon transplantés. \* $p < 0.05$

Chiens traités dbcAMP+aminophylline n=4

Chiens non-traités n=5

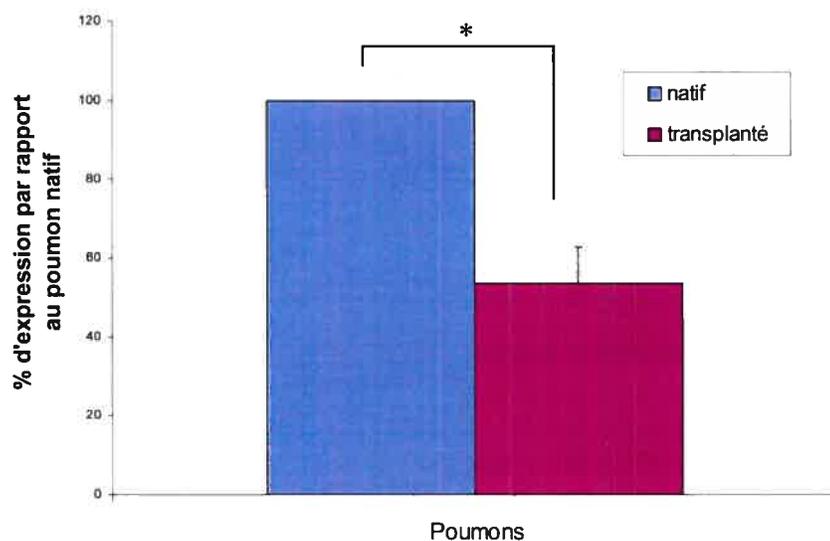
## Figure 15

A)

Northern blot pour  $\alpha$ ENaC

B)

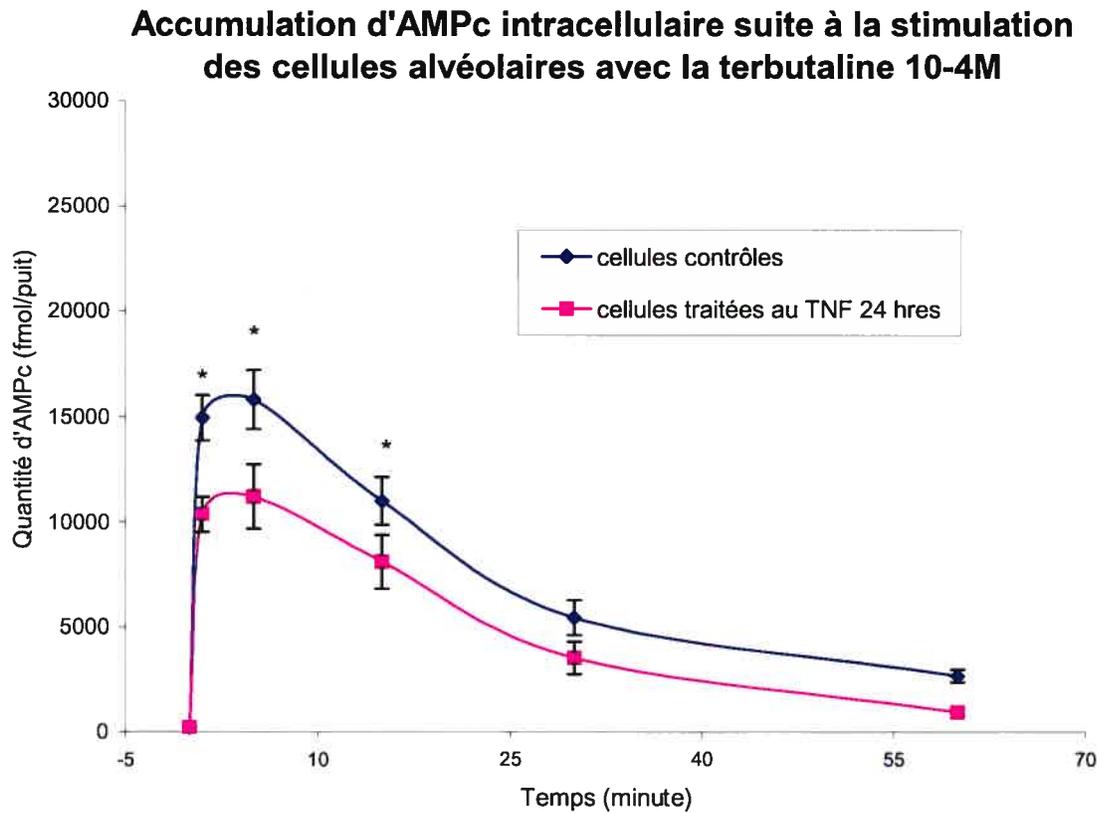
Modulation de l'expression des messagers de  $\alpha$ ENaC par la transplantation pulmonaire



**Figure 15 :** Résultats du Northern blot pour  $\alpha$ ENaC. En A), les bandes 1 et 3 représentent des ARNm provenant de poumons natifs, alors que les bandes 2 et 4 proviennent de poumons transplantés. En B), on voit la compilation des résultats de l'expression d' $\alpha$ ENaC entre les poumons natif et transplantés. Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage d'expression dans le poumon natif. Une diminution significative de l'expression des messagers de  $\alpha$ ENaC est observée dans les poumons transplantés par rapport aux poumons natifs. \*( $p < 0,05$ )

Poumons natifs  $n = 5$

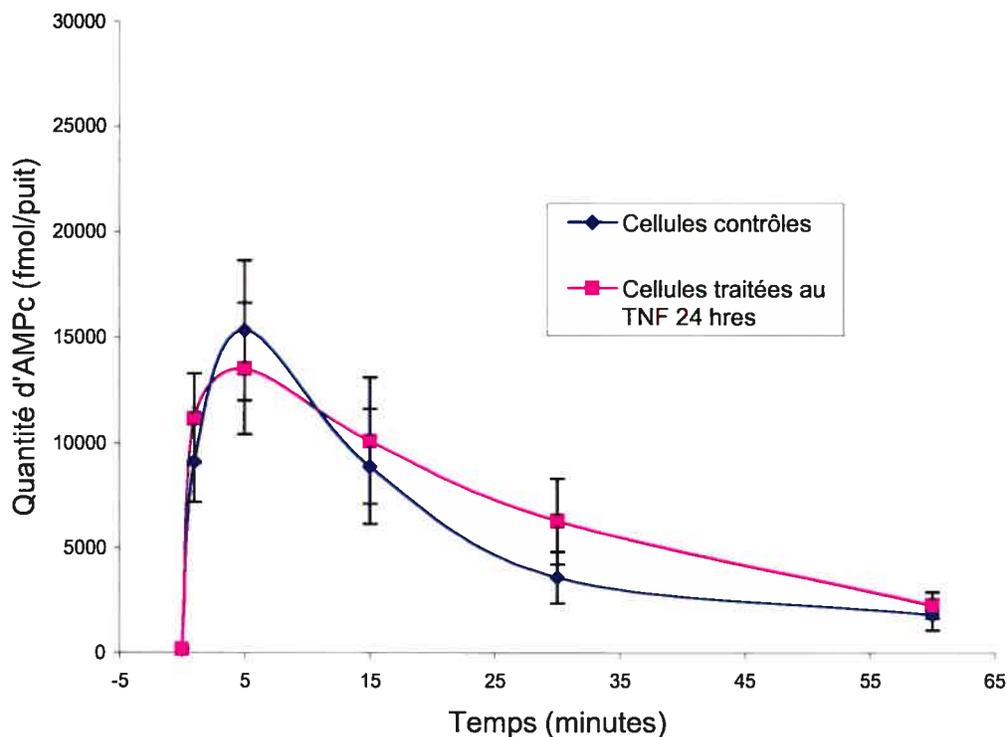
Poumons transplantés  $n = 5$

**Figure 16**

**Figure 16:** Effet d'une stimulation de durée variable avec  $10^{-4}M$  de terbutaline sur des cellules alvéolaires de type II contrôles et traitées au  $TNF\alpha$  pour 24 hres. Une diminution significative de l'accumulation d'AMPc intracellulaire est observée dans les cellules traitées au  $TNF\alpha$  par rapport aux cellules contrôles aux temps 1, 5 et 15 minutes. \* $p < 0.05$

Cellules contrôles n=12

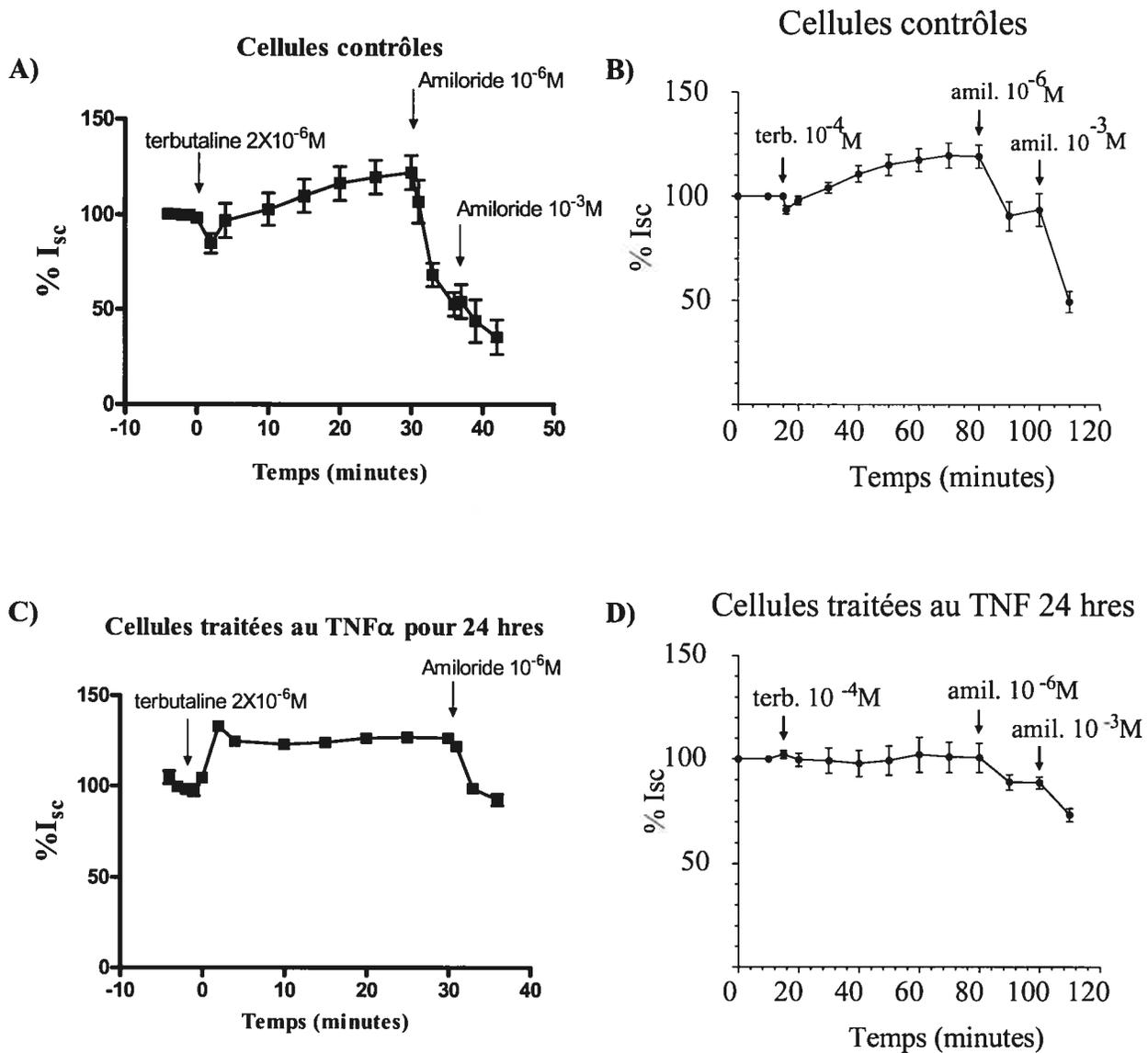
Cellules traitées au  $TNF\alpha$  pour 24 hres n=12

**Figure 17****Accumulation d'AMPc intracellulaire suite à la stimulation des cellules alvéolaires par la forskoline 10-5M**

**Figure 17 :** Effet d'une stimulation de durée variable avec  $10^{-5}$ M de forskoline sur des cellules alvéolaires de type II contrôles et traitées au  $\text{TNF}\alpha$  pour 24 hres. Aucune diminution significative de l'accumulation d'AMPc intracellulaire n'est observée dans les cellules traitées au  $\text{TNF}\alpha$  par rapport aux cellules contrôles.

Cellules contrôles n=8

Cellules traitées au  $\text{TNF}\alpha$  pour 24 hres n=8

**Figure 18**

**Figure 18** : Résultats préliminaires de l'effet d'un traitement au TNF $\alpha$  100ng/mL pendant 24 hres sur le courant généré par une monocouche de cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline. Une cinétique de réponse différente est observée entre les cellules contrôles et les cellules ayant subies un traitement au TNF $\alpha$  et ce avec les deux concentrations différentes de terbutaline. Notez que les expériences en C) et D) ont été conduites par Chantale Massé dans notre laboratoire.

A) n=4

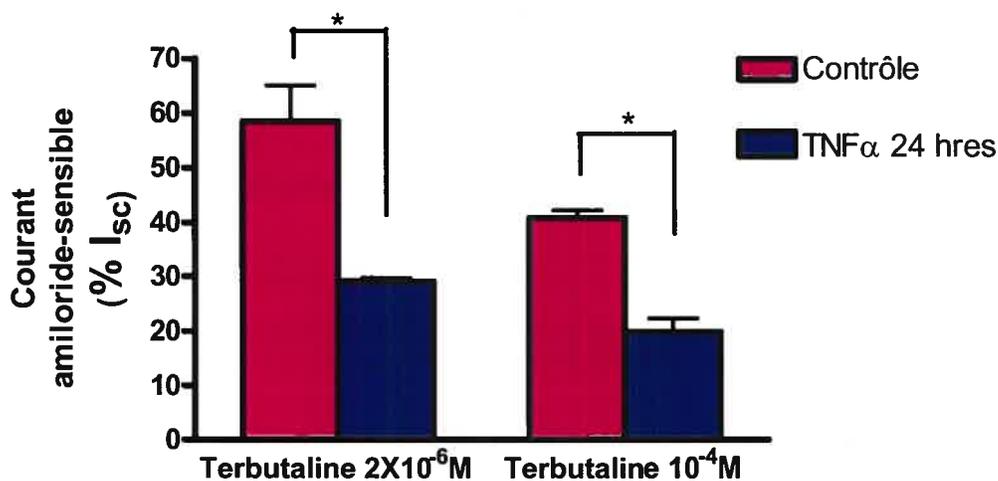
B) n=12

C) n=2

D) n=6

## Figure 19

### Effet d'un traitement au TNF $\alpha$ sur le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline



**Figure 19 :** Résultats préliminaires de l'effet du TNF $\alpha$  100ng/mL pendant 24 hres sur le courant amiloride-sensible ( $I_{\text{amil-sens}}$ ) des cellules alvéolaires suite à une stimulation à la terbutaline. Une diminution significative du  $I_{\text{amil-sens}}$  est observée dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  par rapport aux cellules contrôles lors d'une stimulation à la terbutaline 2X10<sup>-6</sup>M et 10<sup>-4</sup>M. \* p<0.05

## 4 Discussion

En post-transplantation pulmonaire, on observe un phénomène appelé lésion d'ischémie-reperfusion. Cette lésion entraîne un œdème de reperfusion d'importance variable qui peut compromettre la survie des patients. En effet, la dysfonction primaire du greffon, une forme sévère de LIRI, est la principale cause de décès en post-transplantation pulmonaire.<sup>129</sup> Par ailleurs, même lorsque la LIRI est moins sévère, elle contribue à prolonger le temps de ventilation mécanique et le séjour aux soins intensifs.<sup>132</sup> On sait que la LIRI est principalement causée par un dommage à l'endothélium pulmonaire entraînant subséquemment un œdème de perméabilité.<sup>41</sup> Or, il est généralement admis maintenant que la sévérité de la lésion et sa guérison semblent étroitement reliées à la fonction de l'épithélium pulmonaire. En 1999, Ware et coll. ont démontré pour la première fois que l'œdème observé en post-transplantation pulmonaire est bel et bien causé par un problème de perméabilité et que les patients ayant conservés une clairance alvéolaire avaient une meilleure oxygénation et une lésion tissulaire moins sévère.<sup>132</sup> Ces résultats venaient donc confirmer l'importance de l'épithélium pulmonaire pour la résorption de l'œdème de reperfusion observé en post-transplantation pulmonaire. Il semble donc logique de penser que toutes stratégies ayant pour cible l'épithélium pulmonaire pourraient potentiellement être utiles afin d'accélérer la résorption de l'œdème et d'ainsi permettre un rétablissement plus rapide et une diminution de la mortalité des patients souffrant de LIRI.

Compte tenu des résultats publiés précédemment dans le même modèle<sup>125</sup>, le but de cette étude était d'expliquer la non-réponse des poumons transplantés à la terbutaline, un agent bien connu pour stimuler la clairance alvéolaire. Dans un premier temps, nous avons démontré que la non-réponse du poumon transplanté à la terbutaline ne pouvait s'expliquer par une diminution du nombre ou de l'affinité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Nous avons aussi démontré que l'utilisation d'un traitement combiné de dbcAMP+aminophylline, permettant de contrecarrer la cascade des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, n'avait

pas d'effet positif sur la fonction de clairance alvéolaire d'un poumon transplanté. Nos résultats sur la chute des messagers d' $\alpha$ ENaC dans le poumon transplanté viennent aussi confirmer ceux publiés précédemment dans le même modèle<sup>125</sup>. Les expériences faites *in vitro* sur des cellules alvéolaires traitées au TNF $\alpha$  démontrent que l'inflammation semble causer une perte d'efficacité de la cascade  $\beta_2$ -adrénergique. Par ailleurs, les expériences préliminaires faites en chambre de Ussing confirment l'effet du TNF $\alpha$  sur la baisse de courant amiloride-sensible dans les cellules alvéolaires suite à un traitement de 24 heures. Nous avons aussi observé que le TNF $\alpha$  semblait altérer la cinétique de réponse des cellules alvéolaires à la terbutaline. Or, la perte d'efficacité du système  $\beta_2$ -adrénergique observée plus tôt semble insuffisante pour expliquer la baisse des courants amiloride-sensibles observée dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et stimulées à la terbutaline. Finalement, les résultats *in vivo* et *in vitro* suggèrent que la diminution d'ENaC, plutôt que la modulation de la cascade  $\beta_2$ -adrénergique, soit l'élément pouvant expliquer d'une part, la baisse du courant amiloride-sensible dans les cellules alvéolaires traitées au TNF $\alpha$  et d'autre part, l'absence de réponse des poumons transplantés à la terbutaline.

#### **4.1 Absence de stimulation de la clairance alvéolaire par l'AMPC en post-transplantation pulmonaire**

On sait qu'il est possible de stimuler l'ALC à l'aide d'agonistes  $\beta$ -adrénergiques dans plusieurs modèles de poumons lésés. Par contre, des expériences précédentes faites par notre laboratoire, ont démontré que le poumon transplanté était insensible à une telle stimulation. Nous nous sommes donc demandé si les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques pouvaient être diminués ou dysfonctionnels dans une telle situation.

#### 4.1.1 Absence de modulation du nombre de récepteurs $\beta$ -adrénergiques en post-transplantation pulmonaire

Les résultats obtenus par liaison compétitive en comparant des poumons transplantés et natifs de chiens démontrent que la transplantation ne module ni le nombre, ni l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents dans le poumon. En effet, le nombre de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans le poumon natif était de  $1172 \pm 157$  fmol/mg protéine, alors qu'il était de  $1031 \pm 123$  fmol/mg protéine dans le poumon transplanté. (**Figure 10 et 11**) Dans la littérature, les résultats obtenus diffèrent de ceux présentés dans ce mémoire. En effet, le nombre de sites de liaison obtenus dans nos études sont supérieurs à ceux publiés précédemment par d'autres groupes. En effet, en 1980, Barnes et coll.<sup>10</sup> ont mesuré le nombre de sites de liaison pour des agonistes  $\beta$ -adrénergiques dans le poumon périphérique de chien. La concentration obtenue était de  $532 \pm 48$  fmol/mg protéine. Ce nombre représente le nombre de sites de liaison totale peu importe qu'il soit  $\beta_1$  ou  $\beta_2$ -adrénergiques. En 1996, Emala et coll.<sup>41</sup> ont quant à eux démontré dans le parenchyme pulmonaire de chiens, la présence de  $370 \pm 54$  fmol/mg protéine de sites de liaison pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Une autre étude, celle-ci faite dans le poumon de cheval, a démontré la présence de  $428,2 \pm 19,0$  fmol/mg protéine de sites de liaison  $\beta$ -adrénergique totale.<sup>2</sup> Cette différence dans la quantification du nombre de récepteurs peut s'expliquer en partie par le fait que le radioligand utilisé pour les courbes de compétition n'est pas le même. En effet, dans le papier de Barnes et coll., le radioligand utilisé est le [<sup>3</sup>H]DHA.<sup>10</sup> La différence d'espèce peut aussi être en partie responsable de cette différence observée (résultats faits chez le cheval).<sup>2</sup> Par ailleurs, on sait que le nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques croît de manière importante à mesure que l'on descend dans l'arbre trachéo-bronchique. Il est connu que les alvéoles pulmonaires possèdent la plus grande densité de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Donc, dépendamment de l'endroit où l'échantillon de poumon périphérique a été prélevé, on peut avoir une grande variation du nombre de récepteurs. La technique de préparation des membranes qui diffère légèrement entre les précédents papiers et la nôtre peut aussi potentiellement expliquer cette différence (il en sera question plus loin).

L'affinité de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ( $K_{iH}$ ) était de  $1,6 \pm 0,2$  nM dans le poumon contrôle et de  $1,9 \pm 0,4$  nM dans le poumon transplanté. Le  $K_{iL}$  du ICI 118 551, quant à lui, était de  $1603,0 \pm 601,5$  nM dans le poumon contrôle et de  $1963,7 \pm 782,3$  nM dans le poumon transplanté. L'équipe de Abraham et coll., dans les poumons de chevaux, ont obtenu une affinité de l'ICI 118 551 pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ( $K_{iH}$ ) de  $3,7 \pm 0,5$  nM et pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques ( $K_{iL}$ ) de  $187 \pm 71$  nM.<sup>2</sup> La différence, encore une fois, peut s'expliquer par le mode de préparation des membranes. En effet, la manière dont les poumons sont préparés semble différente. Premièrement, contrairement à cette équipe, nous n'avons pas disséqué la vasculature pulmonaire avant d'isoler nos membranes. Il est probable que la présence de vaisseaux viennent influencer nos résultats. Deuxièmement, nous avons extrait nos membranes à l'aide d'un pulvérisateur à tissu avant de faire l'homogénéisation au polytron, alors que les autres n'ont fait que couper avant d'homogénéiser. Ainsi, il est logique de penser que notre homogénéisation est meilleure et plus efficace, entraînant ainsi une augmentation du nombre de récepteurs trouvés. Par ailleurs, encore une fois, la différence obtenue peut s'expliquer par la différence entre les espèces. Cette même équipe a aussi trouvé que la  $K_{iH}$  de l'ICI 118 551 sur des lignées cellulaires humaines était de  $2,07 \pm 0,51$  nM pour les Calu-3 et de  $1,34 \pm 0,36$  nM pour les 16HBE.<sup>1</sup> La  $K_{iL}$ , quant à elle, était de  $2760,50 \pm 314,50$  nM pour les Calu-3 et de  $1431,67 \pm 185,30$  nM pour les 16HBE. Par contre, comme ces derniers résultats proviennent de lignées cellulaires, la comparaison n'est pas très fiable.

#### 4.1.2 Incapacité d'un traitement combiné de dbcAMP+aminophylline à stimuler la clairance alvéolaire dans un poumon transplanté

L'instillation du traitement combiné de dbcAMP+aminophylline dans le lobe inférieur transplanté n'a pas permis de stimuler la clairance alvéolaire, tel qu'espéré. Il est à noter qu'une détérioration significative de l'ALC a même été observée dans le groupe traité. Ces résultats sont en accord avec les observations faits dans le même modèle et publiées par notre laboratoire, où le poumon transplanté ne répondait pas à la terbutaline.<sup>2</sup> Dans ces expériences, on pouvait même observer cette tendance, bien que non

significative, à la détérioration de la clairance alvéolaire avec la terbutaline dans le poumon transplanté par rapport à la clairance de base. Il est important de noter que la détérioration de l'ALC observée dans le groupe traité ne semble pas due à une différence dans l'état des animaux ou à une modification des paramètres hémodynamiques, tel que démontré dans le Tableau 3. La détérioration ne semble pas non plus causée par une lésion tissulaire plus importante dans le groupe traité, tel que démontré par les résultats de poids mouillé/poids sec (Figure 14). Il est important de comprendre que les expériences de mesure de l'ALC et du poids mouillé/ poids sec n'ont pas été faits sur le même lobe pulmonaire. En effet, le traitement combiné de dbcAMP+aminophylline était administré localement au niveau du lobe inférieur gauche, alors que les ratios poids mouillé/poids sec étaient faits sur la lingula et le lobe moyen droit. Cela explique pourquoi on voit une accumulation d'œdème avec le traitement combiné lors des expériences de mesures d'ALC, mais que cette accumulation n'est pas observée dans les ratios de poids mouillé/ poids sec qui eux sont comparables entre les deux groupes. Ainsi, les ratios de poids mouillé/ poids sec ont été fait afin de comparer la sévérité de la lésion induite dans chacun des groupes.

L'inhibition de la stimulation de l'ALC par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques est non seulement présente dans le modèle de transplantation unipulmonaire canin<sup>125</sup>, mais aussi dans un modèle de choc hémorragique. En effet, l'équipe de Pittet a démontré que des mécanismes oxydatifs, ayant pour origine les neutrophiles, pouvaient causer cette inhibition.<sup>94</sup> Par contre, la même équipe a aussi démontré, dans un modèle de rat ventilé avec des gros volumes de remplissage, que cette inhibition était renversée par l'administration de dbcAMP. Leur conclusion était donc que des phénomènes oxydatifs pouvaient affecter le couplage du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique avec l'adénylate cyclase.<sup>50</sup> Bien que l'on sache qu'une importante quantité d'oxydants est aussi relarguée dans notre modèle de lésion d'ischémie-reperfusion, l'administration d'un traitement de dbcAMP+aminophylline, contrairement à l'équipe de Pittet<sup>50</sup>, semble insuffisante pour restaurer la clairance alvéolaire dépendante de l'AMPc. Il semble donc peu probable que l'incapacité du

poumon transplanté à répondre à la terbutaline se situe au niveau d'une dysfonction de la cascade ou d'une diminution du nombre de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques.

Pour ce qui est de la détérioration de la clairance alvéolaire par le traitement dbcAMP+aminophylline, il est important d'être critique dans notre manière d'interpréter de tels résultats. En effet, l'échantillon étant petit, la puissance statistique n'est pas très forte. On peut donc se demander si la détérioration observée avec l'utilisation du traitement est réelle ou constitue une erreur de première espèce. Il est possible que l'on observe une différence, mais que dans les faits il n'y en ait pas. D'une manière ou d'une autre, le message important à retenir de ces expériences est l'absence évidente de stimulation de l'ALC avec le traitement. Nous avons émis l'hypothèse que la détérioration de la clairance alvéolaire par le traitement pouvait s'expliquer par la propriété vasodilatatrice des agonistes  $\beta$ -adrénergiques. Berthiaume et coll. ont démontré, en 1987, que l'instillation de sérum contenant un agoniste  $\beta$ -adrénergique au niveau pulmonaire permettait une augmentation du flot sanguin pulmonaire par rapport à l'instillation d'un sérum seul, qui lui provoquait une diminution importante du flot sanguin causée par une vasoconstriction locale.<sup>15</sup> On peut supposer qu'une augmentation de la vasodilatation de vaisseaux sanguins, que l'on sait déjà très endommagés dans notre modèle, pourrait favoriser l'accumulation de liquide au niveau du poumon. On peut donc imaginer que l'administration d'un traitement de dbcAMP+aminophylline pourrait provoquer une augmentation importante de la perméabilité paracellulaire, entraînant ainsi une accumulation de liquide au niveau pulmonaire, provoquant ainsi l'effet contraire à l'effet souhaité. Par ailleurs, comme notre lésion pulmonaire est sévère, il est aussi possible que les dommages induits à l'épithélium alvéolaire soit trop importants et que celui-ci soit incapable de réabsorber le liquide. En effet, si la grande majorité des cellules épithéliales alvéolaires est endommagée, il en résulte une incapacité à transporter les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , et donc une absence de réabsorption de fluide. Par contre, bien que nous n'ayons pas examiné l'état de l'épithélium alvéolaire de nos chiens, les expériences faites dans le même modèle démontraient que l'épithélium alvéolaire du poumon transplanté semblait en bon

état après huit heures de reperfusion.<sup>125</sup> Il semble donc peut probable que des changements morphologiques affectant l'épithélium pulmonaire pourrait expliquer cette détérioration de la clairance alvéolaire observée avec le traitement.

Les résultats précédents semblent contredire l'hypothèse de départ, à savoir que la transplantation pulmonaire pouvait causer une diminution ou une dysfonction de la cascade des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques.

#### **4.2 Impact de la transplantation pulmonaire sur l'expression des protéines impliquées dans le transport du sodium**

Il avait été démontré précédemment que l'expression du messager et de la protéine de  $\alpha$ ENaC étaient diminués d'environ 75% par rapport au poumon natif.<sup>125</sup> Ces expériences avaient donc pour but de valider si cette chute était aussi présente dans les poumons transplantés de nos animaux et aussi de comparer l'expression des messagers de CFTR, canal suspecté d'être impliqué dans la stimulation de l'ALC dépendante de l'AMPC.<sup>45,96</sup> Seuls les messagers ont été étudiés, étant donné que ces expériences avaient déjà été faites par le passé et qu'il ne s'agissait que d'une validation.

##### **4.2.1 Modulation de l'expression d' $\alpha$ ENaC**

Il a été démontré par Northern blot et Western blot que la transplantation pulmonaire modulait à la baisse les ARNm et les protéines du canal épithélial sodique  $\alpha$ ENaC. Cette chute se situait dans les environs de 75%.<sup>125</sup> Nos résultats, quant à eux, démontrent une chute d'environ 50% des messagers d' $\alpha$ ENaC. La différence entre les résultats obtenus peut s'expliquer par le manque de sensibilité de la technique utilisée. Par ailleurs, comme les "n" sont petits, il est difficile d'avoir une idée très précise de la réalité. Par contre, il est important de noter que la chute des messagers d' $\alpha$ ENaC dans le poumon transplanté par

rapport au poumon natif était présente chez tous les animaux. Malgré cette différence au niveau de la chute des messagers d' $\alpha$ ENaC, nos résultats viennent confirmer que la transplantation pulmonaire affecte le canal ENaC de façon importante. Le rôle majeur d'ENaC dans la clairance alvéolaire a été très bien démontré *in vivo* chez le mouton, le lapin, le cochon d'Inde, la souris et le poumon humain. En effet, l'utilisation d'amiloride, un inhibiteur des canaux sodiques à la membrane apicale, inhibait de 40 à 70% de la clairance alvéolaire de base.<sup>89</sup> On peut donc penser que cette chute de l'expression de l'effecteur, ENaC, puisse être la cause de cette non-réponse des poumons transplantés à une hausse d'AMPc intracellulaire dans notre modèle, puisque le système  $\beta$ -adrénergique en lui-même ne semble pas déficient. L'importance d'ENaC pour la clairance liquidienne a aussi été démontrée dans des souris knock-out pour  $\alpha$ ENaC qui décédaient peu après leurs naissances, étant incapables de résorber le liquide pulmonaire.<sup>59</sup> Par contre, si on provoquait une expression transgénique d' $\alpha$ ENaC dans ces mêmes souris, on observait qu'elles survivaient à leur phénotype létal mais que le transport du sodium n'était que partiellement recouvré. Par ailleurs, ces souris  $\alpha$ ENaC(-/-)Tg+ avaient une ALC de moitié inférieure à celle des souris contrôles en présence de lésions pulmonaires.<sup>40</sup>

Dernièrement, l'équipe de Folkesson a publié une étude *in vivo* faite chez le rat. Ils ont utilisé des siRNA afin d'abaisser l'expression de  $\alpha$ ENaC et tenté de stimuler la clairance alvéolaire avec de la terbutaline. L'utilisation de siRNA contre  $\alpha$ ENaC causait une chute d'environ 75% de l'expression de cette protéine, n'affectait pas la clairance de base, mais rendait les poumons incapables de répondre à une stimulation avec la terbutaline.<sup>79</sup> Ces résultats pourraient donc potentiellement expliquer la non-réponse des poumons transplantés à une stimulation  $\beta$ -adrénergique et viennent donc appuyer le fait qu'un transport de sodium inadéquat peut faciliter l'accumulation d'œdème pulmonaire dans des poumons ayant subis une lésion inflammatoire sévère.

#### 4.2.2 Absence de détection de CFTR

Étant donné que les évidences expérimentales semblent de plus en plus démontrer une interdépendance entre ENaC et CFTR dans le contexte d'une stimulation du courant amiloride-sensible, nous étions curieux de savoir comment se comportaient les messagers de CFTR en post-transplantation pulmonaire. En 1991, Kim et coll. ont démontré qu'une stimulation par un agent  $\beta$ -adrénergique induisait un transport actif de sodium et de chlore à travers un épithélium de cellules alvéolaires.<sup>72</sup> En 1998, les expériences de Jiang et coll. ont démontré que la stimulation du transport du sodium dans les cellules alvéolaires par la terbutaline était causée par l'activation des canaux chlore situés en apical.<sup>65</sup> Par ailleurs, Mutlu et coll. ont publié récemment des résultats démontrant l'interdépendance du canal CFTR et des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques afin de stimuler le transport du sodium.<sup>96</sup> Des expériences très intéressantes de mesures de clairance ont aussi été faites sur des souris contrôles et  $\Delta F508$ . Les souris  $\Delta F508$  avaient une expression déficiente de CFTR à la membrane. Leurs résultats démontrent qu'il n'y avait pas de différence entre la clairance de base de ces deux groupes de souris, mais que les souris  $\Delta F508$  étaient incapables de stimuler leur clairance alvéolaire en réponse à l'isoprotérénol.<sup>45</sup> Ces résultats venaient donc soutenir l'interdépendance d'ENaC, de CFTR et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

Les résultats obtenus ne permettent pas de comparer l'expression de CFTR en post-transplantation pulmonaire avec l'expression dans les poumons normaux. Il est donc impossible d'exclure une modulation potentielle de CFTR dans les poumons transplantés. Étant donné les évidences expérimentales en faveur d'un rôle important de cette protéine dans la stimulation de la clairance alvéolaire par le système  $\beta$ -adrénergique, nous pensons qu'il est important de tenter de nouvelles expériences pour comparer les messagers de CFTR. En effet, la technique de RT-PCR serait plus appropriée pour faire cette comparaison, étant plus sensible et spécifique. Par le passé, d'autres investigateurs ont tenté la détection de CFTR dans les cellules alvéolaires. On retrouve à ce sujet des résultats divergents ; en effet, certains y sont parvenus et d'autres non. Dans notre laboratoire, CFTR a

pu être détecté dans des cellules alvéolaires de rats justement par la technique de RT-PCR.<sup>19</sup> À ce stade-ci, nous ne pouvons donc pas exclure un rôle potentiel de CFTR dans le phénomène de non-réponse des poumons transplantés à la terbutaline.

#### **4.3 Impact de l'inflammation sur la réponse aux agents $\beta$ -adrénergiques *in vitro***

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'inhibition de la stimulation de l'ALC par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques, nous avons décidé de travailler dans un modèle cellulaire. Comme les cellules alvéolaires sont les cellules impliquées dans le phénomène de clairance alvéolaire, les expériences ont été faites sur des cellules alvéolaires de rat.

Le développement de la lésion d'ischémie-reperfusion *in vivo* est soutenu par une multitude de cytokines et de molécules. Il aurait certes été intéressant d'effectuer des mesures de cytokines dans les tissus transplantés versus natif afin de cibler les cytokines produites en grande quantité. Or, il est reconnu que le TNF $\alpha$  est une des premières cytokines à être relâchées *in vivo*.<sup>90,97</sup> Par ailleurs, il a été démontré qu'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$  affecte de manière importante les messagers d'ENaC dans des cellules alvéolaires de rat et ce dans une proportion semblable à la chute observée dans notre modèle de transplantation unipulmonaire canin.<sup>35</sup> Il est reconnu que l'IL-1 $\beta$ , une autre cytokine pro-inflammatoire, possède un effet comparable au TNF $\alpha$  sur l'expression d' $\alpha$ EnaC dans des cellules alvéolaires de rat.<sup>113</sup> Notre choix d'utiliser le TNF $\alpha$  était basé sur la connaissance acquise par le laboratoire au cours des dernières années.

#### 4.3.1 Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ sur la cascade des récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans des cellules alvéolaires

Il a été démontré dans des cardiomyocytes que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  étaient capables d'empêcher le couplage du récepteur  $\beta$ -adrénergiques avec l'adénylate cyclase, entraînant ainsi une chute subséquente de l'accumulation d'AMPc.<sup>55</sup> Aussi, l'équipe de Zhang et coll. a démontré, il y a quelques années, la capacité du TNF $\alpha$  a diminué le courant transépithélial généré par une monocouche de cellules ATII de rat en culture.<sup>137</sup> Il y avait donc des évidences expérimentales nous permettant de croire que le TNF $\alpha$  était capable d'altérer le transport du sodium en agissant possiblement sur la cascade  $\beta$ -adrénergiques. Nous avons donc voulu voir si cette hypothèse était vraie dans les cellules alvéolaires de rat en culture. Nos résultats nous ont permis d'observer qu'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$  diminue de façon significative l'accumulation d'AMPc intracellulaire dans les cellules alvéolaires suite à une stimulation avec la terbutaline, contrairement à une stimulation à la forskoline. Ces résultats laissent suggérer que le TNF $\alpha$  puisse potentiellement affecter la cascade des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. On peut par contre se questionner sur l'impact biologique d'un tel résultat. En effet, on a observé dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et stimulées avec la terbutaline, une accumulation d'AMPc équivalente au 2/3 environ de celle des cellules contrôles. Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques paraissent donc moins efficaces, mais toujours fonctionnels. Il semblait donc peut probable que l'effet de l'inflammation *in vitro* sur la cascade  $\beta_2$ -adrénergique pourrait expliquer l'absence totale de réponse des poumons transplantés à la terbutaline. Par ailleurs, on sait que le TNF $\alpha$  est capable d'induire des signaux de mort cellulaire dans certains systèmes cellulaires (apoptose).<sup>69,131</sup> Comme l'évaluation de la quantité d'AMPc intracellulaire relâchée suite à une stimulation adrénergique est notée en fmol/puit, il est possible que nous ayons sous-estimé certains résultats. En effet, si le TNF $\alpha$  induit l'apoptose des cellules alvéolaires, il est possible que la baisse significative d'accumulation de l'AMPc intracellulaire observée suite à la stimulation avec la terbutaline soit causée parce qu'il y a en fait moins de cellules. La façon de contourner ce problème aurait été de compter le nombre absolu de cellules dans chaque puits afin de voir

si le TNF $\alpha$  induit l'apoptose. Or, notre laboratoire a déjà testé la capacité d'un traitement de 24 hres à 100ng/mL de TNF $\alpha$  à induire la mort cellulaire. Les mesures effectuées avec le kit *Cell Death Detection ELISApplus* démontraient qu'une concentration de 100ng/mL de TNF $\alpha$  pendant 24 hres n'induit ni l'apoptose, ni la nécrose des cellules alvéolaires de rat (résultats non publiés).

#### 4.3.2 Effet d'un traitement de 24 heures au TNF $\alpha$ sur le courant amiloride-sensible des cellules alvéolaires stimulées à la terbutaline en chambre de Ussing

De nombreuses expériences faites par différents groupes de recherche démontrent une chute momentanée suivie d'une augmentation progressive de l' $I_{sc}$  d'une monocouche de cellules alvéolaires lors d'une stimulation avec un agoniste  $\beta_2$ -adrénergique comme la terbutaline en chambre de Ussing.<sup>28,34,39</sup> Nos expériences faites sur des cellules alvéolaires contrôles démontrent aussi cette cinétique de réponse. Par contre, les cellules traitées au TNF $\alpha$  100ng/mL pour 24 heures présentent, quant à elles, une cinétique de réponse différente. En effet, la chute subite de courant observée en condition normale suite à l'addition de terbutaline n'est pas présente dans ces cellules. Une des hypothèses pouvant expliquer cette cinétique de réponse différente provient des résultats de Jiang & coll. qui ont fait des expériences en chambre de Ussing afin d'élucider le mécanisme de stimulation de l' $I_{sc}$  suite à l'addition de terbutaline. Leurs expériences semblent démontrer le rôle prépondérant de l'ion Cl $^-$  pour la stimulation subséquente de l'absorption de Na $^+$  par un agoniste  $\beta$ -adrénergique. En effet, lors de la substitution du Cl $^-$  par le méthanesulfonate dans la chambre de Ussing, on n'observait aucun changement de l' $I_{sc}$  ou du courant amiloride-sensible après l'addition de terbutaline.<sup>65</sup> On peut donc penser que l'altération de la cinétique de réponse à la terbutaline de nos cellules alvéolaires peut être causée par une diminution de la présence des canaux chlore, tel que le CFTR, puisque qu'ils ont été démontrés comme essentiels pour la stimulation adrénergique de la réabsorption de sodium. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait bien sûr faire des expériences de RT-PCR et de Western blot afin de comparer l'expression en ARNm et en protéines de CFTR.

On sait par ailleurs que les cellules alvéolaires traitées au  $\text{TNF}\alpha$  possèdent un niveau d'expression diminué d'ENaC. Cette différence de réponse pourrait donc aussi être due en partie à des taux d'ENaC plus faible, canaux responsables de l'entrée de sodium en apicale. La cinétique de réponse des cellules alvéolaires traitées au  $\text{TNF}\alpha$  et stimulées à la terbutaline est non-seulement différente, mais la proportion de courant amiloride-sensible par rapport au courant  $I_{sc}$  de base l'est aussi. En effet, l'utilisation des deux doses différentes de terbutaline ont permis de démontrer que la portion amiloride-sensible du courant était diminuée d'environ 50% dans les cellules traitées au  $\text{TNF}\alpha$ . En effet, le courant amiloride-sensible des cellules ATII suite à une stimulation avec la terbutaline  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  représente  $58,5 \pm 6,5\%$  du courant total pour les cellules contrôles et  $29,1 \pm 0,6\%$  pour les cellules traitées au  $\text{TNF}\alpha$ . Le même phénomène est observé dans les cellules stimulées avec la terbutaline  $10^{-4} \text{M}$ ; le courant amiloride-sensible représente  $40,9 \pm 1,4\%$  du courant total pour les cellules contrôles et  $19,9 \pm 2,4\%$  pour les cellules traitées. Cela peut s'expliquer par le fait que, comme dit précédemment, un traitement de 24 heures au  $\text{TNF}\alpha$  diminue d'environ 75% les messagers d'ENaC, canal générant justement le courant amiloride-sensible. Le canal étant moins présent, s'en suit une contribution plus faible de ce type de canaux pour la génération du courant total. Il est intéressant d'observer que la portion amiloride-sensible du courant générée par une stimulation de  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  est semblable à celle obtenue par le groupe de Jiang et coll. avec la même dose. L'addition de  $20 \mu\text{M}$  d'amiloride causait une chute d'environ 60%; ce qui est fort semblable à ce que l'on observe avec une dose de  $1 \mu\text{M}$  d'amiloride ( $58,5 \pm 6,5\%$ ).

On remarque par ailleurs dans nos résultats que la dose de  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  de terbutaline induit une proportion plus importante de courant amiloride-sensible que la dose de  $10^{-4} \text{M}$ . Cette différence n'est pas significative, mais pourrait s'expliquer de différentes manières. En effet, il est bien connu qu'une stimulation à grandes doses avec un agoniste  $\beta$ -adrénergique peut induire une désensibilisation des récepteurs. Ainsi, la stimulation devient moins efficace. Certains pensent même qu'une dose élevée de

terbutaline, capable d'activer aussi la cascade  $\beta_1$ -adrénergique, pourrait inhiber en partie la réponse  $\beta_2$ -adrénergique.<sup>117</sup> En somme, il appert que la dose de  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  de terbutaline serait plus efficace pour le recrutement et l'activation des canaux et échangeurs ioniques impliqués dans la stimulation AMPc-dépendante du transport de sodium.

Un traitement chronique au TNF $\alpha$  modifie la réponse à la terbutaline des cellules alvéolaires en chambre de Ussing. Les modifications semblent complexes et touchent potentiellement plusieurs protéines et canaux impliqués dans la stimulation du transport du sodium. Par ailleurs, on ne peut exclure que la perte d'efficacité du système  $\beta_2$ -adrénergique observée plus tôt lors d'un traitement de 24 hres au TNF $\alpha$  n'ait un rôle à jouer dans la baisse du courant amiloride-sensible observée ici.

Par ailleurs, il semble y avoir une certaine divergence entre les résultats *in vivo* et *in vitro*. En effet, Bien que l'on retrouve une chute d' $\alpha\text{ENaC}$  dans les deux modèles, il ne semble pas y avoir de modulation de la voie  $\beta_2$ -adrénergique dans les poumons transplantés, contrairement aux cellules alvéolaires de type II traitées au TNF $\alpha$ . Or, il est important de comprendre que les expériences de clairance faites *in vivo* ne permettent pas d'évaluer le fonctionnement de la cascade  $\beta_2$ -adrénergique, mais plutôt son effet final, c'est-à-dire son impact sur la stimulation du transport du sodium, et donc sur la clairance alvéolaire. Les résultats obtenus *in vivo* permettent de voir que la baisse de l'effecteur, ENaC, est probablement la cause de la non-réponse des poumons transplantés à la terbutaline, puisque même en augmentant directement l'AMPc, on n'observe aucune stimulation de la clairance. Il est important, par ailleurs, de ne pas sous-estimé l'effet de la hausse de perméabilité que pourrait potentiellement causer le traitement de dBcAMP+aminophylline. En effet, cela pourrait camoufler une augmentation réelle de clairance alvéolaire, car contrebalancer par une vasodilatation locale contribuant à annuler l'effet positif d'une clairance accrue. En effet, les tests de clairance permettent de voir un effet global et non d'évaluer ce qui se passe exactement au niveau de l'épithélium alvéolaire.

## 5 Conclusion

Les expériences effectuées ont permis de mieux comprendre l'impact des lésions pulmonaires, tel que la lésion d'ischémie-reperfusion, sur la modulation de la clairance alvéolaire en post-transplantation pulmonaire. Dans un premier temps, il a été démontré que la transplantation pulmonaire n'affecte ni la quantité ni l'affinité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents dans le poumon. Dans un deuxième temps, l'utilisation d'un traitement combiné de dbcAMP+aminophylline, permettant de contourner les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, n'a pas permis de stimuler la clairance alvéolaire des poumons transplantés. Il est intéressant de noter que le traitement a même détérioré la clairance, indiquant un effet plus complexe que celui escompté au départ. Dans un troisième temps, des résultats faits précédemment par notre laboratoire, à savoir que la transplantation pulmonaire affecte de manière importante l'expression de  $\alpha$ ENaC, ont été confirmés.

Dans un quatrième temps, les expériences faites *in vitro* sur des cellules alvéolaires de rat ont permis de constater qu'un traitement chronique avec du TNF $\alpha$  diminue l'efficacité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques à augmenter l'AMPc intracellulaire en réponse à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. Par ailleurs, les expériences préliminaires faites en chambre de Ussing avec des cellules traitées au TNF $\alpha$ , démontrent qu'elles possèdent une cinétique de réponse différente à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. Dans ces mêmes cellules, la portion de courant amiloride-sensible (généralisé par ENaC) est aussi significativement diminuée.

L'hypothèse de départ était que l'inflammation, présente en post-transplantation pulmonaire, pouvait diminuer le nombre de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ou les rendre potentiellement dysfonctionnels. Les résultats de cette étude démontrent que le système  $\beta$ -adrénergique ne semble pas être modulé en post-transplantation pulmonaire. Il apparaît donc que la non-réponse des poumons transplantés aux agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques dans un contexte de lésion inflammatoire sévère soit davantage causée par la chute

d' $\alpha$ ENaC. En effet, l'ensemble de ces résultats et ceux des publications faites sur le sujet nous permettent de penser que les poumons transplantés et les cellules traitées 24 hres au TNF $\alpha$ , de par l'impact négatif sur la protéine ENaC présent dans les 2 modèles, sont incapables d'être stimulés afin d'augmenter leur transport transépithélial de sodium. Bien que les expériences de clairance et celles faites en chambre de Ussing ne nous permettent pas d'exclure hors de tout doute un rôle éventuel d'une dysfonction de la cascade  $\beta_2$ -adrénergique, il semble que la diminution importante d' $\alpha$ ENaC serait la cause, du moins en partie, des phénomènes observés dans les deux modèles. Par contre, il est impossible à l'heure actuelle d'exclure un rôle potentiel de CFTR.

Les résultats de ce mémoire nous permettent de penser que la non-réponse aux agents  $\beta_2$ -adrénergiques observée dans un contexte de lésion inflammatoire sévère semble davantage causée par la chute de la présence d'ENaC que par une dysfonction du système  $\beta$ -adrénergique en lui-même.

Ces observations et les expériences futures pourront nous permettre de mieux comprendre les mécanismes permettant de stimuler le transport de sodium et de chlore afin d'aider à la résorption des oedèmes lors de lésions pulmonaires associées à la transplantation pulmonaire.

## Bibliographie

1. Abraham,G., Kneuer,C., Ehrhardt,C., Honscha,W. & Ungemach,F.R. Expression of functional beta2-adrenergic receptors in the lung epithelial cell lines 16HBE14o(-), Calu-3 and A549. *Biochim. Biophys. Acta* **1691**, 169-179 (2004).
2. Abraham,G., Kottke,C., Dhein,S. & Ungemach,F.R. Pharmacological and biochemical characterization of the beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1067-1081 (2003).
3. Adamson,I.Y. & Bowden,D.H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* **30**, 35-42 (1974).
4. Adamson,I.Y. & Bowden,D.H. Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab Invest* **32**, 736-745 (1975).
5. Allison,R.C. *et al.* Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl. Physiol* **69**, 597-603 (1990).
6. Anaya-Prado,R., Toledo-Pereyra,L.H., Lentsch,A.B. & Ward,P.A. Ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* **105**, 248-258 (2002).
7. Anderson,M.P., Rich,D.P., Gregory,R.J., Smith,A.E. & Welsh,M.J. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* **251**, 679-682 (1991).
8. Azzam,Z.S. *et al.* Na,K-ATPase overexpression improves alveolar fluid clearance in a rat model of elevated left atrial pressure. *Circulation* **105**, 497-501 (2002).
9. Azzam,Z.S. *et al.* Catecholamines increase lung edema clearance in rats with increased left atrial pressure. *J Appl. Physiol* **90**, 1088-1094 (2001).
10. Barnes,P.J., Nadel,J.A., Skoogh,B.E. & Roberts,J.M. Characterization of beta adrenoceptor subtypes in canine airway smooth muscle by radioligand binding and physiological responses. *J Pharmacol Exp. Ther.* **225**, 456-461 (1983).
11. Barquin,N., Ciccolella,D.E., Ridge,K.M. & Sznajder,J.I. Dexamethasone upregulates the Na-K-ATPase in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **273**, L825-L830 (1997).
12. Beltowski,J. & Wojcicka,G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med. Sci Monit.* **8**, RA39-RA52 (2002).
13. Berthiaume,Y. Effect of exogenous cAMP and aminophylline on alveolar and lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J. Appl. Physiol* **70**, 2490-2497 (1991).
14. Berthiaume,Y., Folkesson,H.G. & Matthay,M.A. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. *J Appl. Physiol* **93**, 2207-2213 (2002).
15. Berthiaume,Y., Staub,N.C. & Matthay,M.A. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J. Clin. Invest* **79**, 335-343 (1987).

16. Bertorello, A.M. *et al.* Analysis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase motion and incorporation into the plasma membrane in response to G protein-coupled receptor signals in living cells. *Mol. Biol Cell* **14**, 1149-1157 (2003).
17. Bertorello, A.M., Ridge, K.M., Chibalin, A.V., Katz, A.I. & Sznajder, J.I. Isoproterenol increases Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by membrane insertion of alpha-subunits in lung alveolar cells. *Am J Physiol* **276**, L20-L27 (1999).
18. Borok, Z. *et al.* Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **282**, L599-L608 (2002).
19. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
20. Brochiero, E., Dagenais, A., Prive, A., Berthiaume, Y. & Grygorczyk, R. Evidence of a functional CFTR Cl<sup>-</sup> channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**, L382-L392 (2004).
21. Canessa, C.M., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361**, 467-470 (1993).
22. Canessa, C.M. *et al.* Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463-467 (1994).
23. Carlton, D.P., Cummings, J.J., Chapman, D.L., Poulain, F.R. & Bland, R.D. Ion transport regulation of lung liquid secretion in foetal lambs. *J Dev. Physiol* **17**, 99-107 (1992).
24. Carstairs, J.R., Nimmo, A.J. & Barnes, P.J. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am Rev Respir. Dis.* **132**, 541-547 (1985).
25. Cassin, S., Gause, G. & Perks, A.M. The effects of bumetanide and furosemide on lung liquid secretion in fetal sheep. *Proc Soc. Exp. Biol Med.* **181**, 427-431 (1986).
26. Chalaka, S., Ingbar, D.H., Sharma, R., Zhou, Z. & Wendt, C.H. Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase gene regulation by glucocorticoids in a fetal lung epithelial cell line. *Am J Physiol* **277**, L197-L203 (1999).
27. Charron, P.D., Fawley, J.P. & Maron, M.B. Effect of epinephrine on alveolar liquid clearance in the rat. *J Appl. Physiol* **87**, 611-618 (1999).
28. Cheek, J.M., Kim, K.J. & Crandall, E.D. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am. J. Physiol* **256**, C688-C693 (1989).
29. Chinet, T. [Physiopathology of cystic fibrosis lung disease]. *Rev. Mal Respir.* **16**, 339-345 (1999).
30. Christie, J.D. *et al.* Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* **114**, 51-60 (1998).
31. Christie, J.D. *et al.* Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation. *Chest* **124**, 1232-1241 (2003).
32. Chung, M.K., Gulick, T.S., Rotondo, R.E., Schreiner, G.F. & Lange, L.G. Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. *Circ. Res* **67**, 753-763 (1990).

33. Claeys, M.A., Gepts, E. & Camu, F. Haemodynamic changes during anaesthesia induced and maintained with propofol. *Br J Anaesth.* **60**, 3-9 (1988).
34. Cott, G.R., Sugahara, K. & Mason, R.J. Stimulation of net active ion transport across alveolar type II cell monolayers. *Am J Physiol* **250**, C222-C227 (1986).
35. Dagenais, A. *et al.* Downregulation of ENaC Activity and Expression by TNF{alpha} In Alveolar Epithelial Cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* (2003).
36. Diamond, J.M. Osmotic water flow in leaky epithelia. *J Membr. Biol* **51**, 195-216 (1979).
37. Dumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T., Jr. & Schaffer, R. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clin Chem.* **27**, 1642-1650 (1981).
38. Doyle, R.L., Szaflarski, N., Modin, G.W., Wiener-Kronish, J.P. & Matthay, M.A. Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir. Crit Care Med.* **152**, 1818-1824 (1995).
39. Eaton, D.C., Chen, J., Ramosevac, S., Matalon, S. & Jain, L. Regulation of Na<sup>+</sup> channels in lung alveolar type II epithelial cells. *Proc Am Thorac. Soc.* **1**, 10-16 (2004).
40. Egli, M. *et al.* Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol* **560**, 857-865 (2004).
41. Emala, C.W., Aryana, A. & Hirshman, C.A. Impaired activation of adenylyl cyclase in lung of the Basenji-greyhound model of airway hyperresponsiveness: decreased numbers of high affinity beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* **118**, 2009-2016 (1996).
42. Eppinger, M.J., Deeb, G.M., Bolling, S.F. & Ward, P.A. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* **150**, 1773-1784 (1997).
43. Factor, P., Dumasius, V., Saldias, F., Brown, L.A. & Sznajder, J.I. Adenovirus-mediated transfer of an Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beta1 subunit gene improves alveolar fluid clearance and survival in hyperoxic rats. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2231-2242 (2000).
44. Factor, P. *et al.* Augmentation of lung liquid clearance via adenovirus-mediated transfer of a Na, K-ATPase beta1 subunit gene. *J Clin Invest* **102**, 1421-1430 (1998).
45. Fang, X. *et al.* Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen. Physiol* **119**, 199-207 (2002).
46. Farman, N. *et al.* Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na<sup>+</sup> channel along rat respiratory tract. *Am J Physiol* **272**, C131-C141 (1997).
47. Feng, Z.P., Clark, R.B. & Berthiaume, Y. Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **9**, 248-254 (1993).
48. Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A.M., Rossier, B.C. & Schild, L. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* **17**, 344-352 (1998).

49. Folkesson,H.G., Matthay,M.A., Hasegawa,H., Kheradmand,F. & Verkman,A.S. Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-sensitive water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4970-4974 (1994).
50. Frank,J.A., Pittet,J.F., Lee,H., Godzich,M. & Matthay,M.A. High tidal volume ventilation induces NOS2 and impairs cAMP- dependent air space fluid clearance. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **284**, L791-L798 (2003).
51. Frank,J.A., Wang,Y., Osorio,O. & Matthay,M.A. Beta-adrenergic agonist therapy accelerates the resolution of hydrostatic pulmonary edema in sheep and rats. *J Appl. Physiol* **89**, 1255-1265 (2000).
52. Gartner,L.P. & Hiatt,J.L. Atlas d'Histologie. DeBoeck-Wesmael. 2e. 1992. Belgique.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
53. Goodman,B.E., Brown,S.E. & Crandall,E.D. Regulation of transport across pulmonary alveolar epithelial cell monolayers. *J Appl. Physiol* **57**, 703-710 (1984).
54. Goodman,B.E. & Crandall,E.D. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **243**, C96-100 (1982).
55. Gulick,T., Chung,M.K., Pieper,S.J., Lange,L.G. & Schreiner,G.F. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6753-6757 (1989).
56. Guyton,A.C. & Hall,J.E. Textbook of Medical Physiology. W.B.Saunders Compagny. 10e. 2000. USA.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
57. Hamid,Q., Shannon,J. & Martin,J. Physiologic Basis of Respiratory Disease. (2005).
58. Hanrahan,J.W. & Wioland,M.A. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac. Soc.* **1**, 17-21 (2004).
59. Hummler,E. *et al.* Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* **12**, 325-328 (1996).
60. Ishiyama,T. *et al.* Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* **130**, 194-201 (2005).
61. Jain,L., Chen,X.J., Brown,L.A. & Eaton,D.C. Nitric oxide inhibits lung sodium transport through a cGMP-mediated inhibition of epithelial cation channels. *Am J Physiol* **274**, L475-L484 (1998).
62. Jain,L., Chen,X.J., Malik,B., Al Khalili,O. & Eaton,D.C. Antisense oligonucleotides against the alpha-subunit of ENaC decrease lung epithelial cation-channel activity. *Am J Physiol* **276**, L1046-L1051 (1999).
63. Jain,L., Chen,X.J., Ramosevac,S., Brown,L.A. & Eaton,D.C. Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **280**, L646-L658 (2001).

64. Jaunin,P. *et al.* Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of beta subunits in subunit assembly, intracellular transport, and functional expression of Na,K-pumps. *J Cell Biol* **123**, 1751-1759 (1993).
65. Jiang,X., Ingbar,D.H. & O'Grady,S.M. Adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup> transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl<sup>-</sup> channels. *Am. J. Physiol* **275**, C1610-C1620 (1998).
66. Jiang,X., Ingbar,D.H. & O'Grady,S.M. Selectivity properties of a Na-dependent amino acid cotransport system in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **279**, L911-L915 (2000).
67. Johnson,M.D., Widdicombe,J.H., Allen,L., Barbry,P. & Dobbs,L.G. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1966-1971 (2002).
68. Jones,L.G., Gray,M.E., Wood,A.J. & LeQuire,V.S. Beta-adrenergic receptor properties of a pulmonary alveolar type II cell preparation from the adult rat. *Lung* **165**, 201-211 (1987).
69. Kampf,C., Relova,A.J., Sandler,S. & Roomans,G.M. Effects of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-beta on normal human bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J* **14**, 84-91 (1999).
70. Katzung,B.G. & . *Basic & Clinical Pharmacology*. Edition Lange/McGraw & Hill. 8e. 2001. USA.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
71. Kent,R.S., De Lean,A. & Lefkowitz,R.J. A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol. Pharmacol* **17**, 14-23 (1980).
72. Kim,K.J., Cheek,J.M. & Crandall,E.D. Contribution of active Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> fluxes to net ion transport by alveolar epithelium. *Respir. Physiol* **85**, 245-256 (1991).
73. Kim,K.J. & Crandall,E.D. Effects of exposure to acid on alveolar epithelial water and solute transport. *J Appl. Physiol* **52**, 902-909 (1982).
74. Krishnadasan,B. *et al.* The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **125**, 261-272 (2003).
75. Kunert-Keil,C., Bisping,F., Kruger,J. & Brinkmeier,H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC. Genomics* **7**, 159 (2006).
76. Lee,S.Y., Maniak,P.J., Ingbar,D.H. & O'Grady,S.M. Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K<sup>+</sup> channels that are located in apical membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1614-C1624 (2003).
77. Leroy,C., Dagenais,A., Berthiaume,Y. & Brochiero,E. Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **286**, L1027-L1037 (2004).

78. Li,H., Sheppard,D.N. & Hug,M.J. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst. Fibros.* **3 Suppl 2**, 123-126 (2004).
79. Li,T. & Folkesson,H.G. RNA interference for  $\alpha$ -ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **290**, L649-L660 (2006).
80. Liang,W. & Mills,S.E. Quantitative analysis of beta-adrenergic receptor subtypes in pig tissues. *J Anim Sci* **80**, 963-970 (2002).
81. Liebler,J.M. *et al.* Alveolar epithelial type I cells express beta2-adrenergic receptors and G-protein receptor kinase 2. *J Histochem. Cytochem.* **52**, 759-767 (2004).
82. Lingrel,J.B. & Kuntzweiler,T. Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Biol Chem.* **269**, 19659-19662 (1994).
83. Lubman,R.L., Chao,D.C. & Crandall,E.D. Basolateral localization of Na<sup>(+)</sup>-. *Respir. Physiol* **100**, 15-24 (1995).
84. Lubman,R.L. & Crandall,E.D. Polarized distribution of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> antiport activity in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **266**, L138-L147 (1994).
85. Luhr,O.R. *et al.* Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir. Crit Care Med.* **159**, 1849-1861 (1999).
86. Machado-Aranda,D. *et al.* Gene transfer of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase beta1 subunit using electroporation increases lung liquid clearance. *Am J Respir. Crit Care Med.* **171**, 204-211 (2005).
87. Mal,H. *et al.* Early release of proinflammatory cytokines after lung transplantation. *Chest* **113**, 645-651 (1998).
88. Marieb,E.N. Anatomie et Physiologie Humaines. DeBoeck Université. 4e. 1999. Canada. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
89. Matthay,M.A., Folkesson,H.G. & Clerici,C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* **82**, 569-600 (2002).
90. Maxey,T.S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha from resident lung cells is a key initiating factor in pulmonary ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **127**, 541-547 (2004).
91. McAuley,D.F., Frank,J.A., Fang,X. & Matthay,M.A. Clinically relevant concentrations of beta2-adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. *Crit Care Med.* **32**, 1470-1476 (2004).
92. McDonough,A.A., Geering,K. & Farley,R.A. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J* **4**, 1598-1605 (1990).
93. Minakata,Y., Suzuki,S., Grygorczyk,C., Dagenais,A. & Berthiaume,Y. Impact of beta-adrenergic agonist on Na<sup>+</sup> channel and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol* **275**, L414-L422 (1998).

94. Modelska, K. *et al.* Inhibition of beta-adrenergic-dependent alveolar epithelial clearance by oxidant mechanisms after hemorrhagic shock. *Am J Physiol* **276**, L844-L857 (1999).
95. Monchi, M. *et al.* Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir. Crit Care Med.* **158**, 1076-1081 (1998).
96. Mutlu, G.M. *et al.* Interdependency of {beta}-Adrenergic Receptors and CFTR in Regulation of Alveolar Active Na<sup>+</sup> Transport. *Circ. Res.* (2005).
97. Naidu, B.V. *et al.* Early tumor necrosis factor-alpha release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **127**, 1502-1508 (2004).
98. Nambi, P., Sibley, D.R., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Photoaffinity labeling of beta-adrenergic receptors in mammalian tissues. *Biochem. Pharmacol* **33**, 3813-3822 (1984).
99. Newberg, L.A., Milde, J.H. & Michenfelder, J.D. Systemic and cerebral effects of isoflurane-induced hypotension in dogs. *Anesthesiology* **60**, 541-546 (1984).
100. Norlin, A., Finley, N., Abedinpour, P. & Folkesson, H.G. Alveolar liquid clearance in the anesthetized ventilated guinea pig. *Am J Physiol* **274**, L235-L243 (1998).
101. O'Brodovich, H., Hannam, V., Seear, M. & Mullen, J.B. Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *J Appl. Physiol* **68**, 1758-1762 (1990).
102. O'Grady, S.M., Jiang, X. & Ingbar, D.H. Cl-channel activation is necessary for stimulation of Na transport in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **278**, L239-L244 (2000).
103. O'Grady, S.M. & Lee, S.Y. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **284**, L689-L700 (2003).
104. Oelberg, D.G., Xu, F. & Shabarek, F. Sodium-coupled transport of glucose by plasma membranes of type II pneumocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1194**, 92-98 (1994).
105. Olivera, W.G. *et al.* Aldosterone regulates Na,K-ATPase and increases lung edema clearance in rats. *Am J Respir. Crit Care Med.* **161**, 567-573 (2000).
106. Olver, R.E. & Strang, L.B. Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. *J Physiol* **241**, 327-357 (1974).
107. Orłowski, J. & Lingrel, J.B. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *J Biol Chem.* **263**, 10436-10442 (1988).
108. Piantadosi, C.A. & Schwartz, D.A. The acute respiratory distress syndrome. *Ann. Intern. Med.* **141**, 460-470 (2004).
109. Pittet, J.F., Wiener-Kronish, J.P., McElroy, M.C., Folkesson, H.G. & Matthay, M.A. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* **94**, 663-671 (1994).
110. Pittet, J.F., Wiener-Kronish, J.P., Serikov, V. & Matthay, M.A. Resistance of the alveolar epithelium to injury from septic shock in sheep. *Am J Respir. Crit Care Med.* **151**, 1093-1100 (1995).

111. Planes,C. *et al.* Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 47318-47324 (2002).
112. Riordan,J.R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073 (1989).
113. Roux,J. *et al.* Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* **280**, 18579-18589 (2005).
114. Ruddy,M.K. *et al.* Modulation of aquaporin 4 and the amiloride-inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells. *Am J Physiol* **274**, L1066-L1072 (1998).
115. Russell,J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* **80**, 211-276 (2000).
116. Sakuma,T. *et al.* Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Am J Respir. Crit Care Med.* **150**, 305-310 (1994).
117. Sakuma,T. *et al.* Beta1-adrenoceptor stimulation by high-dose terbutaline downregulates terbutaline-stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo rat lung. *Exp. Lung Res.* **27**, 453-468 (2001).
118. Sakuma,T. *et al.* Denopamine, a beta(1)-adrenergic agonist, increases alveolar fluid clearance in ex vivo rat and guinea pig lungs. *J. Appl. Physiol* **90**, 10-16 (2001).
119. Sano,M., Yoshimasa,T., Yagura,T. & Yamamoto,I. Non-homogeneous distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in various human tissues. *Life Sci* **52**, 1063-1070 (1993).
120. Schwiebert,L.M. Cystic fibrosis, gene therapy, and lung inflammation: for better or worse? *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **286**, L715-L716 (2004).
121. Serrick,C., Adoumie,R., Giaid,A. & Shennib,H. The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *Transplantation* **58**, 1158-1162 (1994).
122. Serrick,C., La Franchesca,S., Giaid,A. & Shennib,H. Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model. *Am J Respir. Crit Care Med.* **152**, 277-282 (1995).
123. Steagall,W.K., Kelley,T.J., Marsick,R.J. & Drumm,M.L. Type II protein kinase A regulates CFTR in airway, pancreatic, and intestinal cells. *Am J Physiol* **274**, C819-C826 (1998).
124. Stephens,K.E., Ishizaka,A., Larrick,J.W. & Raffin,T.A. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir. Dis.* **137**, 1364-1370 (1988).
125. Sugita,M. *et al.* Alveolar liquid clearance and sodium channel expression are decreased in transplanted canine lungs. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **167**, 1440-1450 (2003).
126. Tharaux,P.L., Dussaule,J.C., Couette,S. & Clerici,C. Evidence for functional ANP receptors in cultured alveolar type II cells. *Am J Physiol* **274**, L244-L251 (1998).

127. Thom,J. & Perks,A.M. The effects of furosemide and bumetanide on lung liquid production by in vitro lungs from fetal guinea pigs. *Can. J Physiol Pharmacol* **68**, 1131-1135 (1990).
128. Tibayan,F.A., Chesnutt,A.N., Folkesson,H.G., Eandi,J. & Matthay,M.A. Dobutamine increases alveolar liquid clearance in ventilated rats by beta-2 receptor stimulation. *Am J Respir. Crit Care Med.* **156**, 438-444 (1997).
129. Trulock,E.P. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004. *J. Heart Lung Transplant.* **23**, 804-815 (2004).
130. Vivona,M.L., Matthay,M., Chabaud,M.B., Friedlander,G. & Clerici,C. Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **25**, 554-561 (2001).
131. Wang,R. *et al.* Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF-alpha requires angiotensin II generation de novo. *J Cell Physiol* **185**, 253-259 (2000).
132. Ware,L.B., Golden,J.A., Finkbeiner,W.E. & Matthay,M.A. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir. Crit Care Med.* **159**, 980-988 (1999).
133. Ware,L.B. & Matthay,M.A. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir. Crit Care Med.* **163**, 1376-1383 (2001).
134. West,J.B. *La Physiologie Respiratoire*. EDISEM. 6e. 2003.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
135. Wine,J.J. & Joo,N.S. Submucosal glands and airway defense. *Proc Am Thorac. Soc.* **1**, 47-53 (2004).
136. Yagawa,Y., Kawakami,K. & Nagano,K. Cloning and analysis of the 5'-flanking region of rat Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha 1 subunit gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1049**, 286-292 (1990).
137. Zhang,M. *et al.* Effects of Mycobacterium tuberculosis on the bioelectric properties of the alveolar epithelium. *Infect. Immun.* **65**, 692-698 (1997).
138. Zilberberg,M.D. & Epstein,S.K. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir. Crit Care Med.* **157**, 1159-1164 (1998).