

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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.

Université de Montréal

**Impact du stress oxydant sur les mécanismes de clairance
alvéolaire et de réparation épithéliale pulmonaires**

par
Cécile CHUPIN

Département de Médecine, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales

Avril 2008

© Chupin Cécile, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Impact du stress oxydant sur les mécanismes de clairance
alvéolaire et de réparation épithéliale pulmonaires**

présenté par :
Cécile CHUPIN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Céline Bergeron	Président-rapporteur
Dr Yves Berthiaume	Directeur de recherche
Dre Emmanuelle Brochiero	Codirectrice
Dr André Cantin	Membre du jury

Mémoire accepté le :

Résumé

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est notamment caractérisé par un œdème pulmonaire à haute perméabilité et un stress oxydant omniprésent. Celui-ci influencerait les mécanismes de transports ioniques participant à la clairance des fluides et la réparation épithéliale, deux processus essentiels à la résolution de l'œdème.

Le principal objectif de ce mémoire était d'étudier l'impact du stress oxydant, induit par la bléomycine, sur ces processus.

Pour cela, nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant moins le canal ENaC, qui est essentiel à la clairance des fluides pulmonaires. De façon surprenante, nos résultats démontrent que ces souris sont plus résistantes aux lésions induites par la bléomycine.

In vitro, la bléomycine n'influence pas le transport sodique, par contre celle-ci inhibe le processus de réparation de l'épithélium alvéolaire.

Ces résultats suggèrent que le stress oxydant aurait principalement un impact sur les mécanismes de réparation épithéliale, et non sur ceux de réabsorption ionique.

Mots clefs :

SDRA, stress oxydant, bléomycine, souris transgéniques, ENaC, réparation, cellules alvéolaires de type II (AT II)

Abstract

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by a high permeability lung oedema with the omnipresence of oxidative stress. This stress influence ion transport mechanisms taking part in fluid clearance and in epithelial repair, two essential processes for oedema resolution.

The main objective of this master thesis was to study the impact of bleomycin induced oxidative stress on these processes.

For this purpose, transgenic mice expressing a lesser amount of ENaC channel, an essential component for lung fluid clearance, were used. Our results demonstrate in a surprising way, that these mice were more resistant to bleomycin injury than the wild type mice.

In vitro, bleomycin did not influence sodium transport, on the other hand, it inhibited the alveolar epithelium repair process.

These results suggest that bleomycin induced oxidative stress have an impact mainly on the epithelial repair mechanisms, but do not affect ion absorption.

Keywords :

ARDS, oxidative stress, bleomycin, transgenic mice, ENaC, repair, alveolar type II cells (AT II)

Table des Matières

Résumé	p iii
Abstract	p iv
Liste des figures	p ix
Liste des sigles et abréviations	p xii
Liste des unités de mesure	p xvi
Remerciements	p xvii
Introduction	p 1
A Le système respiratoire	p 2
1 Structure générale	p 2
1.1 Les voies respiratoires extra-pulmonaires	p 3
1.2 Les poumons	p 3
1.2.1 Les voies respiratoires intra-pulmonaires	p 4
1.2.2 Le parenchyme respiratoire	p 4
2 L'épithélium respiratoire	p 6
2.1 Dans les voies respiratoires extra-pulmonaires	p 6
2.1.1 Les glandes sous-muqueuses	p 7
2.1.2 Le mucus	p 7
2.2 Dans les voies respiratoires intra-pulmonaires	p 8
2.3 Dans le parenchyme respiratoire	p 9
2.3.1 Le surfactant et l'hypophase	p 10
B Les rôles fonctionnels du système respiratoire	p 13
1 L'appareil respiratoire	p 13
2 L'épithélium respiratoire	p 13
2.1 Le maintien de l'intégrité physique de l'épithélium respiratoire	p 14
2.2 La protection immunitaire liée à l'épithélium respiratoire	p 15
2.3 l'homéostasie liquidienne de l'épithélium respiratoire	p 17

2.3.1	Au niveau des voies respiratoires extra- et intra-pulmonaires	p 17
2.3.2	Au niveau du parenchyme respiratoire	p 19
2.3.2.1	Les canaux et transporteurs ioniques	p 19
2.3.2.2	Le canal épithélial sodium amiloride-sensible ENaC	p 22
C Une pathologie : le syndrome de détresse respiratoire aiguë		p 31
1	Définition	p 31
2	Historique	p 32
3	Statistiques épidémiologiques	p 33
4	La pathophysiologie	p 33
5	Les traitements en essai	p 34
6	Le SDRA et les lésions épithéliales	p 35
7	Le SDRA et le stress oxydant	p 39
8	Le SDRA et la clairance alvéolaire	p 40
D. Hypothèses et objectifs		p 42
Méthodologie		p 45
A. In vivo		p 46
1	Le modèle animal	p 46
2	Les modèles oxydants	p 46
2.1	Le modèle bléomycine	p 46
2.2	Le modèle <i>thiourea</i>	p 47
3	Le modèle dexaméthasone	p 48
4	Procédures générales, suivant les traitements aux animaux	p 48
4.1	Euthanasie et nécropsie	p 48
4.2	Wet to Dry ou Mesure poids mouillé/poids sec	p 49
4.3	Mesure du poids	p 49
4.4	Histologie	p 49

B. In vitro	p 49
1 Le modèle cellulaire	p 49
1.1 La chirurgie	p 49
1.2 Isolation des cellules AT II	p 50
2 Les modèles oxydants	p 51
2.1 Le modèle bléomycine	p 51
2.2 Le modèle DMNQ	p 51
3 Le modèle dexaméthasone	p 52
4 Procédures générales des travaux cellulaires	p 52
4.1 Mesure des courants impliqués dans la résorption oedémateuse (Ussing)	p 52
4.2 Mesure des processus de réparation épithéliale	p 53
4.2.1 Mesure de la réparation des plaies	p 53
4.2.2 Mesure de la migration	p 53
4.2.3 Mesure de la prolifération	p 54
C. Statistiques	p 54
Résultats	p 55
A. Évaluation de l'importance du canal ENaC lors de l'évolution des lésions épithéliales et de l'œdème pulmonaire, suite à un stress oxydant, <i>in vivo</i>	p 56
1. Réponse à la bléomycine	p 58
2. Réponse au <i>thiourea</i>	p 63
3. Réponse à la dexaméthasone	p 63
B. Évaluation de l'importance du canal ENaC dans les transports ioniques dont dépend la clairance des fluides, suite à un stress oxydant, <i>in vitro</i>	p 65
1 Réponse à la bléomycine	p 65
2. Réponse au DMNQ	p 68
3. Réponse à la dexaméthasone	p 68

C. Évaluation de l'influence du stress oxydant sur les processus de réparation épithéliale, <i>in vitro</i>	p 71
1. Réponse à la bléomycine	p 71
2. Réponse au DMNQ	p 75
3. Le modèle dexaméthasone	p 78
Discussion	p 80
A. Évaluation de l'importance du canal ENaC lors de l'évolution des lésions épithéliales et de l'œdème pulmonaire, suite à un stress oxydant, <i>in vivo</i>	p 82
Rôle du canal ENaC lors d'un stress oxydant	p 83
B. Évaluation de l'importance du canal ENaC dans les transports ioniques dont dépend la clairance des fluides, suite à un stress oxydant, <i>in vitro</i>	p 89
Implication de ENaC dans les courants sodiques lors d'un stress oxydant	p 89
C. Déterminer l'influence du stress oxydant sur les processus de réparation épithéliale, <i>in vitro</i>	p 92
Impact du stress oxydant sur les processus de réparation	p 92
D. Sommaire	p 95
E. Conclusion – Perspectives	p 97
Annexe	p xviii
Bibliographie	p xix

Liste des figures

Figure 1 :	Le système respiratoire avec les voies respiratoires extra-pulmonaires, intra-pulmonaires et le parenchyme respiratoire	p 2
Figure 2 :	L'acinus pulmonaire	p 5
Figure 3 :	La barrière alvéolo-capillaire	p 5
Figure 4 :	Les épithéliums respiratoires	p 6
Figure 5 :	L'épithélium des voies respiratoires extra-pulmonaires	p 7
Figure 6 :	L'épithélium bronchiolaire	p 8
Figure 7 :	L'épithélium alvéolaire	p 9
Figure 8 :	Le surfactant et l'hypophase	p 11
Figure 9 :	Les canaux et transporteurs au niveau des cellules AT I et II	p 21
Figure 10 :	Arbre phylogénique du gène ENaC	p 23
Figure 11 :	Schéma du canal ENaC avec les sous-unités α ou δ , et β , et γ	p 23
Figure 12 :	Historique des définitions du SDRA	p 32
Figure 13 :	Schéma de réparation d'un épithélium lésé d'après le Dr Uhal	p 36
Figure 14 :	Les différentes phases du processus de réparation des cellules alvéolaires	p 37
Figure 15 :	La formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)	p 39

Figure 16 :		
Tableau de croisements des souris ENaC +/- Tg+		p 57
Figure 17 :		
Effet de la bléomycine sur la mortalité des souris WT et ENaC -/- Tg+		p 60
Figure 18 :		
Effet de la bléomycine sur la variation de poids chez les souris WT et ENaC -/- Tg+		p 60
Figure 19 :		
Effet de la bléomycine sur le développement de l'œdème chez les souris WT et ENaC -/- Tg+		p 61
Figure 20 :		
Effet de la bléomycine sur l'histologie chez les souris WT		p 62
Figure 21 :		
Effet du <i>thiourea</i> sur le développement de l'œdème chez les souris WT et ENaC -/- Tg+		p 64
Figure 22 :		
Effet du dexaméthasone sur le développement de l'œdème, en présence ou non de bléomycine, chez les souris WT et ENaC -/- Tg+, à 7j		p 64
Figure 23 i :		
Exemple de courant sodium transépithélial en condition contrôle et bléomycine (50mU/ml)		p 66
Figure 23 ii :		
Exemple de courant sodium apical en condition contrôle et bléomycine (50mU/ml)		p 66
Figure 24 :		
Effet de la bléomycine sur (A) les courants transépithélial et apical totaux, et sur (B) la variation des courants transépithélial et apical amiloride-sensibles, chez les AT II		p 67
Figure 25 :		
Effet du DMNQ sur (A) les courants transépithélial et apical totaux, et sur (B) la variation des courants transépithélial et apical amiloride-sensibles, chez les AT II		p 69
Figure 26 :		
Effet du dexaméthasone sur (A) les courants transépithélial et apical totaux et sur (B) la variation des courants transépithélial et apical		

amiloride-sensibles, en présence ou non de bléomycine, chez les AT II	p 70
Figure 27 : Mise en place du modèle de fermeture de plaies sur une monocouche de AT II, en condition contrôle, aux temps 30min, 24h et 48h	p 72
Figure 28 : Fermeture de plaies en condition contrôle sur les AT II	p 72
Figure 29 A : Effet de la bléomycine sur la fermeture de plaies, sur des AT II	p 73
Figure 29 B : Effet de doses croissantes de bléomycine sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II	p 73
Figure 30 : Effet de la bléomycine sur la migration des AT II à 24 et 48h	p 74
Figure 31 : Effet de la bléomycine sur la prolifération des AT II	p 74
Figure 32 : Effet de doses croissantes de DMNQ sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II	p 76
Figure 33 : Effet du DMNQ sur la migration des AT II à 24 et 48h	p 77
Figure 34 : Effet du DMNQ sur la prolifération des AT II	p 77
Figure 35 : Effet de la bléomycine et du dexaméthasone sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II	p 79
Figure 36 : Effet de la bléomycine et du dexaméthasone sur la prolifération des AT II	p 79
Figure 37 : Représentation schématique du concept de la bio-activation du <i>thiourea</i> , par le FMO (flavin-containing monooxygenases) et par la détection du potentiel alkylant des métabolites de ces composés	p 84

Sigles et abréviations

4E-BP	eIF4E-binding protein
5' (région)	région 5' non-traduite ou 5'UTR
5'UTR	5' untranslated region
ACTH	adreno-cortico-trophic hormone hypophysaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ALI	acute lung injury
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	activating protein 1
AQP	aquaporine
ARNm	acide ribonucléique messenger
AT I	alveolar type I cell ou pneumocyte de type I
AT II	alveolar type II cell ou pneumocyte de type II
BAY	Rivaroxaban ou BAY 59-7939, est un anticoagulant qui inhibe le facteur Xa
C2	domaine situé en N-terminal de Nedd4-2
CaCC	Ca ²⁺ -activated Cl ⁻ channel
CAP1	channel activating protease 1
CC10	Clara cell protein 10
CC16	Clara cell protein 16
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
CCSP	Clara cell secretory protein
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator channel
Cl ⁻	chlore
Cl/HCO ₃	échangeur chlore - bicarbonate
c-met	cellular-mesenchymal epithelial transition factor = récepteur du HGF
CMV	cytomegalovirus
CNG (canal)	cyclic nucleotide-gated channel
CO ₂	dioxyde de carbone
-COOH	terminaison carboxyle
C-terminal	carboxyl (COO ⁻) terminal
Cu ²⁺	cuivre
Cu-SOD	cuivre superoxide dismutase
DMNQ	2,3-dimethoxy-1,4-naphtoquinone
DNAse	desoribonuclease
DPPC	dipalmitoyl phosphatidylcholine
EGF	epithelial growth factor
eIF ₄ E	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF ₄ G	eukaryotic translation initiation factor 4G
EIPA	ethyl isopropyl amiloride
ENaC	epithelial amiloride-sensitive sodium channel
erb (récepteur)	EGF receptor family
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FBS	foetal bovine serum
Fe ³⁺	fer
FiO ₂	fraction en oxygène
FMO	flavin-containing monooxygenases

GEL (phase)	couche visqueuse constituée par le mucus, qui piège les particules exogènes
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
GRE	glucocorticoïd response element
GSH	glutathion
GSH-PX	glutathione peroxidase
GSSH	oxidised glutathione
H ou H ⁺	hydrogène
³ H	tritium (marquage radioactif)
H ₂ O	eau
H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène
HAI	hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1
HGF	hepatocyte growth factor
HKATPase (pompe)	pompe hydrogène-potassium adénosinetriphosphatase
HOCl	hypochloride
HSC	canaux hautement sélectifs au sodium
H-type (channel)	canal apical sodium ayant une haute affinité pour l'amiloride
I (125 ou 131)	iode
I	courant
IBMX	3-isobutyl-1-méthyl-xanthine
IC ₅₀	concentration d'un composé inhibant 50 % de l'effet observé.
ICU	unité de soins intensifs
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
Isc	courant de court-circuit
K ⁺	potassium
K _{ATP}	canal potassium ATP-dépendant
K _{Ca}	canal potassium activé par le Ca ²⁺
KCl	échangeur potassium - chlore
KGF	keratinocyte growth factor
KIAA0439	ADNc partiel nommé KIAA0439.
K _{IR}	canal rectifiant entrant dont Kir2.1
Kir2.1	voir K _{IR}
KO	knock-out
K _V	canaux potassium voltage-dépendant
KvLQT1	canal potassium voltage-dépendant
L-type (channel)	canal apical sodium ayant une basse affinité pour l'amiloride
MEK	map-erk kinase
MEM	Minimum Essential Medium
Mn-SOD	manganese superoxide dismutase
mTOR	mammalian target of Rapamycin
N4WBP5A (Ndfip2)	ADNc humain nommé N4WBP5A, appartenant à la famille des protéines liant Nedd4
Na ⁺	sodium
Na ⁺ /acide aminé	co-transporteur sodium - acide aminé
Na ⁺ /glucose	co-transporteur sodium - glucose
Na ⁺ /H ⁺	antiporteur sodium - proton
Na ⁺ /phosphate	co-transporteur sodium - phosphate
NaCh	sodium channel

NaCl	co-transporteur sodium - chlore
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaK2Cl	co-transporteur sodium - potassium - 2 chlore
NaKATPase	pompe sodium-potassium adénosinetriphosphatase
NaOH	soude ou hydroxyde de sodium
Nedd4-2	neural precursor expressed, developmentally down-regulated protein 4-2
NFκB	nuclear factor kappa B
N-glycane	polysaccharides formés par des résidus monosaccharidiques liés par des liaisons O-glycosidiques
N-glycosylation	les oses sont fixés à l'azote du groupement amide de l'acide aminé asparagine (Asn ; N)
NH ₂ -	terminaison amine
NMRI	Naval Medical Research Institute
NO	monoxide d'azote
NSC	canaux non sélectifs au sodium
N-terminal	amino (NH ₃ ⁺) terminal
O ₂	oxygène
O ₂ ⁻	radical anionique superoxide
OCT	optimal cutting temperature
OH [·]	radical hydroxyl
ONOO-	peroxinitrite
ORCC	outwardly rectifying chloride channel
P ₂ X	récepteurs purinergiques P2
p38 MAPK	protéine membranaire de 38 kilo-dalton appartenant à la famille des mitogen-activated protein kinase
P ₄₅₀ (cytochrome)	pigment ayant une longueur d'onde de 450 nm
PaO ₂	pression artérielle en oxygène
pH	potentiel hydrogène
PHA1	pseudo-hypoaldostéronisme de type 1
PI ₃ K	phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase
PKA	phosphokinase A
Po	probabilité d'ouverture
PPxY ou PY (domaine)	P = proline, x = acide aminé quelconque, Y = tyrosine
R	résistance
RANTES	aussi appelée CCL5, Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
Rap1	protéine appartenant à la famille des petites guanosine triphosphatases (GTPase)
RAS	renin-angiotensin system
RE	reticulum endoplasmique
ROS	reactive oxygen species
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aiguë
SGGS	sodium glucose gentamycine septr
SGK	serum and glucocorticoid-inducible kinase
SNAP-23	synaptosome-associated protein of 23 kilo-dalton
SNAREs	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors

SOL (phase)	couche fluide enrobant la partie inférieure des cils et facilitant le battement ciliaire
SP	surfactant protein
Src	gène appartenant à la famille des tyrosine-kinases proto-oncogène
SVF	sérum de veau fœtal
TCA	trichloroacetic acid
Tg	transgène
TGF β	transforming growth factor beta
t-SNAREs	target membrane proteins - SNAREs
vCE	une sous-population des cellules de Clara résistante aux polluants, exprimant le CCSP
WT	wild type
WW (domaine)	est une courte région conservée comportant 2 résidus tryptophan (Trp ou W) et 1 résidu proline (Pro ou P).
X	chromosome sexuel X
Y	chromosome sexuel

Unités de mesure

%	pourcent
~	environ
§	paragraphe
°C	degré Celsius
μ	micro
A	ampère
Ci	curie
cm	centimètre
cm ²	centimètre carré
cpm	coups par minute
G	gauge
g	gramme
h	heure
Hg	mercure
J	jour
kb	kilobase
kg	kilogramme
L	litre
m	mètre
M	molaire
m ²	mètre carré
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mm ²	millimètre carré
n	nano
<i>n</i>	nombre d'expériences identiques
p	percentil
p	pico
rpm	rotation par minute
S	siemens
U	unité
V	volt
x	fois (multiplier)
Δ	delta ou variation
Ω	ohm

Remerciements

Il y a toujours un commencement.

Si je suis devenue Cécile, c'est à ma famille, à mes amis, à quelques professeurs et mentors, que je le dois. Je salue en particulier Josiane Grosgeorges et Dr Patrick Gaudray. À tous et chacun, merci.

Si je suis venue ici, c'est parce que mon chemin a croisé celui de Nicole Boyer. C'est toi qui m'as ouvert la porte de l'IPMC, c'est toi qui m'y as soutenue. À toi qui n'est plus, merci d'avoir ... été.

Merci au Dr Pascal Barbry de m'avoir accueilli dans son équipe pour le DEA, et de m'avoir permis de rencontrer et travailler avec le Dr Yves Berthiaume.

Dr Berthiaume vous avez cru en moi, m'avez encouragée à travailler à vos côtés depuis plusieurs années, et m'avez constamment soutenue. Ça a été une joie et un honneur, que vous me permettez de renouveler avec bonheur.

Une présence vitalisante fût personnalisée par le Dre Emmanuelle Brochiero. Chaque discussion ouvrait des horizons nouveaux et limpides! Je n'y serai pas arrivée sans toi, merci.

Je ne dois pas oublier toutes les personnes de mes deux laboratoires, dont Marie-Ève, André, Anik, Émilie, qui ont guidé des premiers pas, merci.

Si aujourd'hui je choisis de poursuivre cette aventure c'est un peu par ta faute Dre Émilie Boncoeur, merci!

Je me dois de remercier les personnes qui vont lire et corriger ce manuscrit, ainsi que les organismes qui m'ont subventionnés, directement et indirectement, mais aussi toutes les personnes qui ont fait et font que ce programme existe, merci.

Je reviens, pour terminer, aux miens.

Merci à Nathalie qui secoue. Merci à Monique la douce. Merci à Magali la remueméninges. Merci à Zazou la pétulante. Merci à Chloé la juste.

Merci à mes parents qui m'ont juste dit : « va, vis, et deviens ».

CHAPITRE 1

INTRODUCTION



Les poumons et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

Le système respiratoire est, comme chaque système de l'organisme, un élément indispensable. Il permet l'apport de l'oxygène, matière nécessaire à la fonction cellulaire, et il élimine le dioxyde de carbone, déchet produit par les cellules. Ces échanges sont très finement régulés, car leur altération entraîne une toxicité pulmonaire, mais aussi corporelle. Les poumons distaux sont le site de cet échange gazeux avec le sang. Ils sont aussi le site d'altérations génétiques, biologiques, physiques ou chimiques qui peuvent causer une détresse respiratoire. Celle que nous allons étudier est nommée : syndrome de détresse respiratoire aiguë ou SDRA (« acute respiratory distress syndrome » ou ARDS).

A Le système respiratoire

1 Structure générale

Le système respiratoire a été décomposé de plusieurs façon, nous utiliserons le modèle suivant : voies respiratoires extra-pulmonaires, puis voies respiratoires intra-pulmonaires et enfin parenchyme respiratoire [Figure 1].

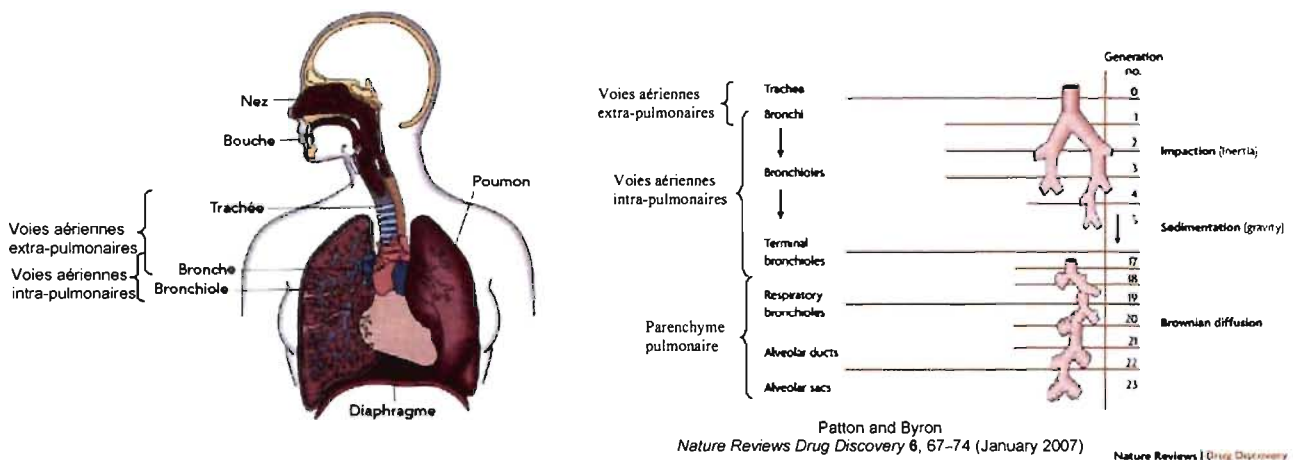


Figure 1 : Le système respiratoire avec les voies respiratoires extra-pulmonaires, intra-pulmonaires et le parenchyme respiratoire

1.1 Les voies respiratoires extra-pulmonaires

L'air (21% oxygène, 78% diazote, 1% autre) circule le long des voies respiratoires extra-pulmonaires. Il entre habituellement par le nez, passe par le naso-pharynx, le larynx et la trachée puis arrive à la naissance des deux bronches souches (situées au niveau du hile du poumon), et poursuit sa route dans les voies respiratoires intra-pulmonaires.

Plus précisément, l'air pénètre par les fosses nasales. Il est immédiatement purifié par les vibrisses qui arrêtent les gros éléments, tandis que le mucus (voir § A.2.1.2) prend en charge les éléments d'1µm ou plus. Le mucus recouvre la surface de l'épithélium pseudostratifié. Dans le même temps, l'air est humidifié par la présence de ce même mucus et réchauffé grâce à la circulation capillaire. L'air est ensuite dirigé vers le pharynx, qui est divisé en deux parties par le voile du palais. La partie supérieure, ou nasopharynx, est recouverte d'un épithélium pseudostratifié. Le pharynx a d'autre part un rôle immunitaire, en effet il comprend de nombreuses formations lymphoïdes, dont les amygdales qui jouent un rôle de barrière de protection des voies aériennes sous-jacentes. L'air poursuit son chemin dans le larynx. Situé en avant de l'œsophage, il est lui aussi tapissé par un épithélium pseudostratifié, sauf au niveau des cordes vocales. L'air entre ensuite dans la trachée qui se divise bientôt en deux branches, les bronches souches. La paroi trachéale est formée de trois couches : -1- une muqueuse, -2- une tunique fibrocartilagineuse et -3- une adventice. C'est dans la muqueuse de type respiratoire que se trouve l'épithélium pseudostratifié que nous suivons depuis les fosses nasales. Il est formé de 5 types cellulaires principaux (voir ci-dessous § A.2.1).

1.2 Les poumons

Le mammifère possède deux poumons, chez l'humain le gauche est composé de deux lobes, tandis que le droit possède trois lobes. Ils sont protégés par le diaphragme et la cage thoracique, par contre ils dépassent de la première côte. Lors de la respiration, les poumons suivent les mouvements des muscles intercostaux de la cage thoracique et du diaphragme *via* le jeu des plèvres. Les plèvres sont des feuillets qui relient les poumons aux côtes de la cage thoracique. Les deux plèvres, pariétale et viscérale, délimitent la cavité pleurale qui contient un film liquidien permettant le glissement des deux feuillets l'un contre l'autre lors de la respiration.

Chaque poumon ressemble à un arbre la tête en bas dont les divisions successives formeraient les voies respiratoires intra-pulmonaires puis le parenchyme respiratoire [Figure 1]. Cela permet le routage de l'air des bronches souches, aux bronchioles terminales puis aux millions d'alvéoles pulmonaires qui assurent l'hématose.

1.2.1 Les voies respiratoires intra-pulmonaires

L'arbre bronchique est une dénomination courante pour les voies respiratoires intra-pulmonaires. Ainsi la trachée se divise en deux bronches souches (droite et gauche), qui pénètrent dans chaque poumon au niveau du hile. Puis chaque bronche souche donne naissance à 16 générations de ramifications, de diamètre décroissant, jusqu'aux bronchioles (Phalen and Oldham 1983). Les bronches lobaires se rendent dans chaque lobe du poumon, puis elles se ramifient en bronches tertiaires qui donnent naissance à des bronches de moins en moins grosses jusqu'aux bronches sus-lobulaires. Lors de sa pénétration dans le lobule, la bronche sus-lobulaire devient la bronchiole intra-lobulaire. Les bronchioles terminales sont les derniers "rameaux" (voir Figure 1).

Tout au long de ce trajet l'air continue d'être purifié et humidifié par le mucus (voir § A.2.1.2) produit par l'épithélium pseudostratifié. Il est important de remarquer que la constitution cellulaire de cet épithélium dit respiratoire, change le long de l'arbre bronchique (voir ci-dessous §A.2).

1.2.2 Le parenchyme respiratoire

L'arbre bronchique se termine par le parenchyme respiratoire. Comme chaque feuille d'un rameau, l'acinus pulmonaire est l'unité morpho-fonctionnelle du parenchyme respiratoire [Figure 2]. Le pétiole de notre feuille est ici, une bronchiole respiratoire qui se divise en canaux alvéolaires, où chaque canal alvéolaire comporte 2 ou 3 sacs alvéolaires qui recèlent de multiples alvéoles.

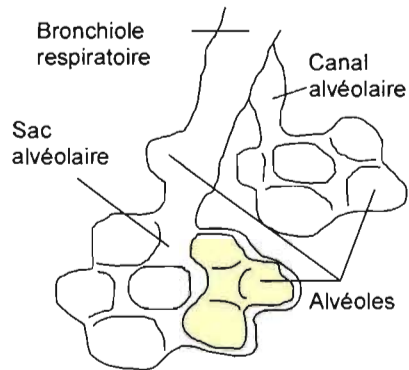
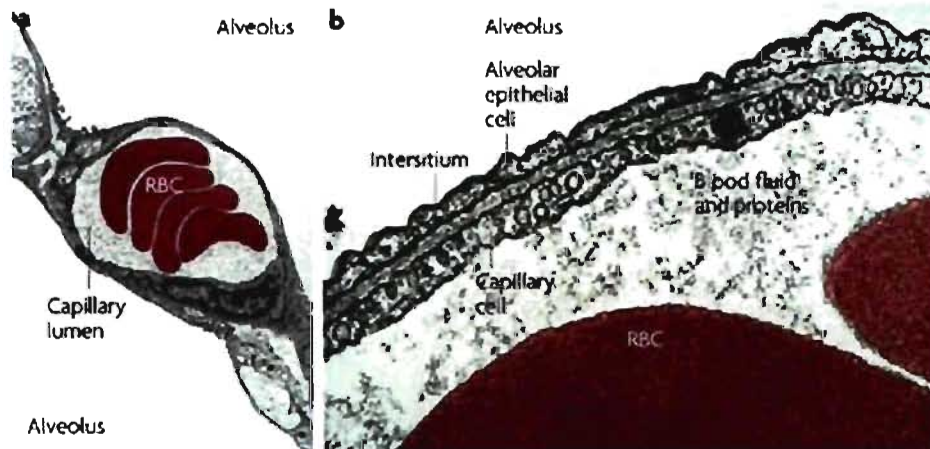


Figure 2 : L'acinus pulmonaire

Les bronchioles respiratoires possèdent le même épithélium cubique que les bronchioles terminales, elles sont donc impliquées dans la conduction de l'air, sa purification, mais aussi dans les échanges gazeux de part la présence d'alvéoles s'ouvrant dans leur paroi.

Le poumon humain comprend environ 300000 alvéoles. Elles totalisent une surface d'environ 100-150 m² dont 60 à 80 où s'effectuent véritablement les échanges gazeux (Maina and West 2005). Ces 60-80 m² forment la barrière alvéolo-capillaire [Figure 3]. Elle est constituée du surfactant et de l'hypophase sécrétés par les pneumocytes II, des pneumocytes I, de la membrane basale unique résultant de la fusion des membranes basales du pneumocytes I et de la cellule endothéliale située en vis-à-vis, et des cellules endothéliales. La membrane basale est constituée majoritairement de collagène de type IV, de laminine, d'entactine/nidogen, d'héparane sulfate protéoglycane, de tenascine et d'intégrines (Maina and West 2005).



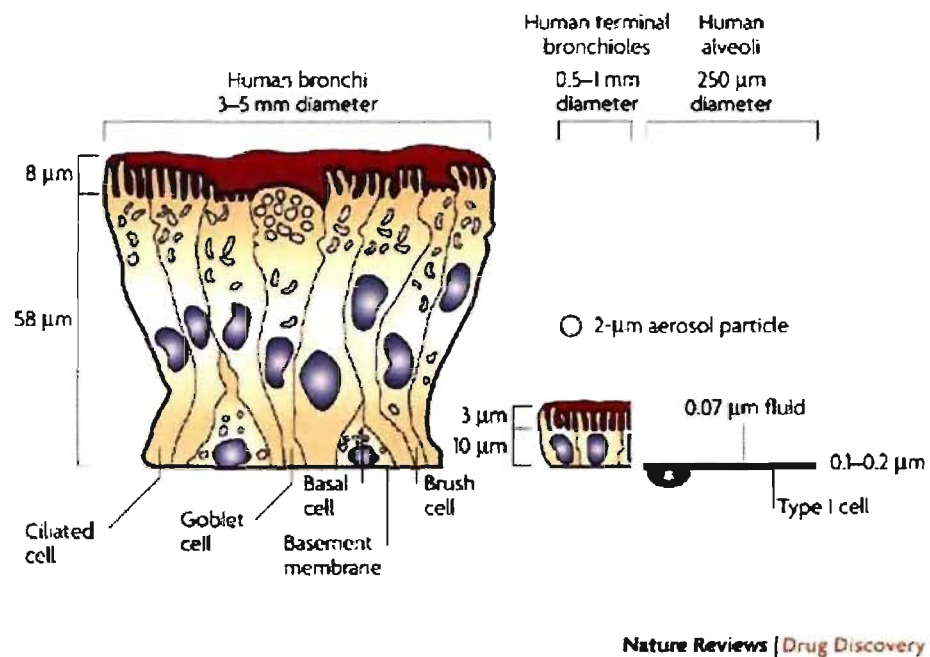
Nature Reviews | Drug Discovery

Patton and Byron *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 67–74 (January 2007)

Figure 3 : La barrière alvéolo-capillaire

L'épithélium respiratoire qui tapisse les alvéoles pulmonaires, est constitué par les pneumocytes de type I et II (voir ci-dessous §A.2.3).

2 L'épithélium respiratoire



Patton and Byron *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 67-74 (January 2007)

Figure 4 : Les épithéliums respiratoires

2.1 Dans les voies respiratoires extra-pulmonaires

L'épithélium respiratoire des fosses nasales est pseudo-stratifié. Il est caractérisé par plusieurs types cellulaires :

- 1- Les cellules ciliées sont les plus abondantes. Elles jouent un rôle fondamental dans l'épuration pulmonaire et persistent jusqu'aux bronchioles terminales.
- 2- Les cellules caliciformes (1 pour environ 5 cellules ciliées) ont une vacuole contenant du mucigène qui participe, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses, à la formation du mucus (voir § A.2.1.2).
- 3- Les cellules basales sont situées contre la membrane basale. Ce sont des cellules dites progénitrices, puisqu'elles sont aptes à remplacer n'importe quel autre type de cellule bronchique et sont donc indispensables au renouvellement cellulaire.

-4- Les cellules à bordures en brosse ne sont visibles qu'en microscopie électronique, immatures elles sont impliquées dans la régénération de l'épithélium.

-5- Les cellules endocrines sont peu nombreuses. Elles se regroupent pour former des corps neuro-épithéliaux. Ce sont des chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O₂ ou CO₂ de l'air.

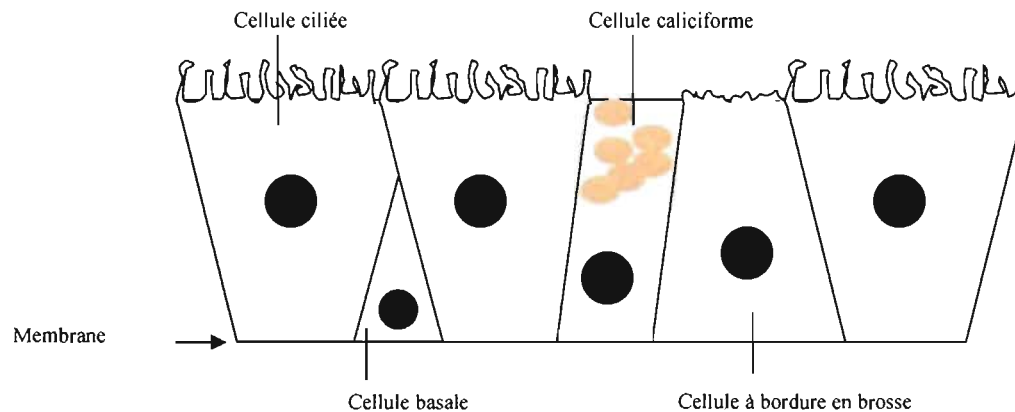


Figure 5 : L'épithélium des voies respiratoires extra-pulmonaires

L'épithélium pseudo-stratifié est présent jusque dans les bronchioles terminales. À ce stade, l'abondance de certaines cellules est modifiée, et d'autres types cellulaires apparaissent. Ainsi le rhynopharynx, le larynx, la trachée et les bronches souches possèdent l'épithélium pseudo-stratifié décrit ci-dessus [Figure 5].

2.1.1 Les glandes sous-muqueuses

Présentes au niveau du derme, tout le long de l'arbre trachéo-bronchique, les glandes sous-muqueuses sont de forme tubulaire enroulée ou tubo-acineuse. Elles participent à la sécrétion du mucus, de lysozyme et des immunoglobulines A (IgA).

2.1.2 Le mucus

Le mucus est synthétisé par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses. D'une épaisseur inférieure à 50µm (Verkman 2007), il est composé des phases GEL et SOL (7-14µm (Chambers et al. 2007). La phase SOL est fluide, ce qui permet le battement ciliaire. La composition ionique de la phase sol est difficilement identifiable (37). La phase GEL est visqueuse. Elle contient 97% d'eau, 0,9% de sels et 2% de glycoprotéines (Tarran et al.

2001). Elle est très fine ($\sim 1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ d'épithélium respiratoire) (Widdicombe 1989). L'eau provient à la fois des cellules caliciformes, des glandes de la séro-muqueuse, et du transsudat plasmatique (Widdicombe 2001). Le mucus a un rôle protecteur, il permet d'absorber certains gaz, d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré, et aussi de l'humidifier. En effet, le mucus sert de réservoir liquidien régulant partiellement le niveau de la phase gel (Tarran et al. 2001). D'autre part, le volume liquidien et la capacité de transport du mucus sont dépendants du transport actif des ions Cl^- et Na^+ (Kerem et al. 1999 ; Tarran 2004).

2.2 Dans les voies respiratoires intra-pulmonaires

Au fur et à mesure des ramifications, l'épithélium des bronches s'amincit et s'appauvrit en cellules caliciformes. Au stade bronchiole, l'épithélium est dit cylindrique simple, il est dépourvu de cellules caliciformes, les cellules ciliées sont plus minces et peu nombreuses, tandis que les cellules de Clara apparaissent. Les cellules de Clara sont caractérisées par la présence de microvillosités irrégulières et de grains de sécrétion. Les grains de sécrétion contiennent des éléments participant à la formation du surfactant. Les cellules de Clara ont d'autres rôles dont -1- le transport ionique, -2- la régénération de l'épithélium bronchiolaire (Bishop 2004 ; Dierynck et al. 1996 ; Hung et al. 2004 ; Johansson et al. 2007 ; Jorens et al. 1995 ; Otto 2002), -3- la génération d'éléments pour le mucus et l'hypophase (Stripp et al. 2002), dont les apoprotéines du surfactant (Crouch et al. 1992), et -4- un rôle immunomodulateur (CC10 ou CC16 ou CCSP (Dierynck et al. 1996 ; Hung et al. 2004 ; Johansson et al. 2007 ; Jorens et al. 1995 ; Reynolds et al. 2007)). L'épithélium respiratoire devient cubique au niveau des bronchioles terminales [Figure 6]. Il ne compte plus que de rares cellules ciliées éparpillées entre les cellules de Clara.

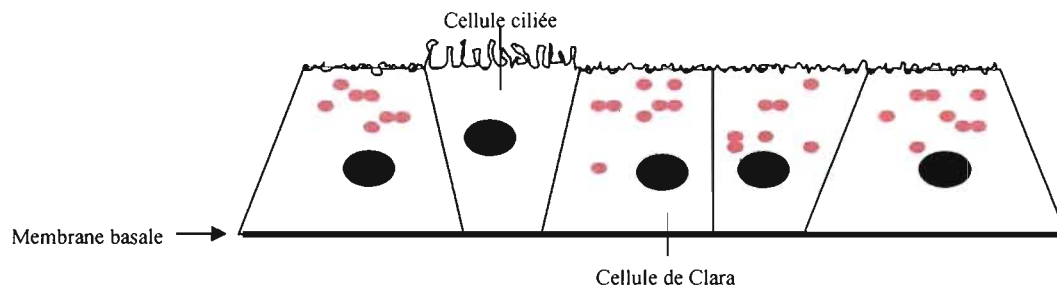


Figure 6 : L'épithélium bronchiolaire

2.3 Dans le parenchyme respiratoire

L'épithélium de la bronchiole respiratoire est le même que celui de la bronchiole terminale. En devenant distal, l'épithélium respiratoire en tant que tel disparaît, cette zone est appelée canal respiratoire.

Le revêtement épithélial [Figure 7] des alvéoles pulmonaires est une couche unicellulaire posée sur une lame basale continue, fusionnée avec la lame basale de l'endothélium des capillaires alvéolaires. L'épithélium est constitué de deux types cellulaires les pneumocytes de type I et II ou AT I et II (encore appelés cellules alvéolaires de type I et II), réunis entre eux par différentes jonctions (zonula occludens, junctions serrées, desmosomes).

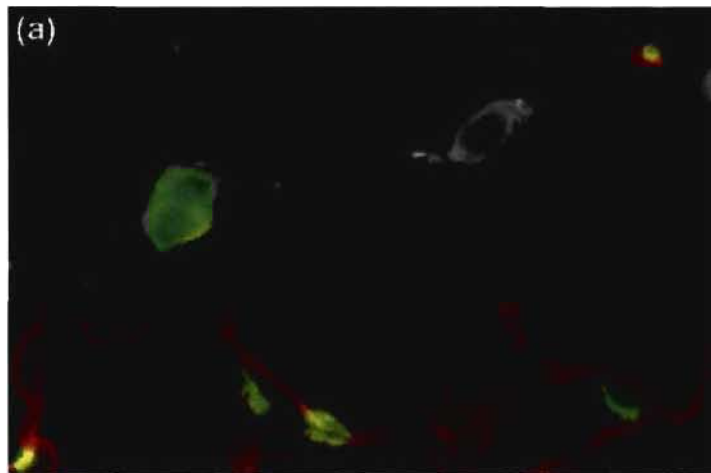


Figure 7 : L'épithélium alvéolaire (Fehrenbach 2001). Les AT II sont marquées en vert pour SP-D et les AT I avec la lectine *Lycopersicon esculentum* en rouge.

Les AT I représentent 8% des cellules pulmonaires, mais recouvrent environ 90% de la surface alvéolaire. Elles entourent les AT II dans leur voile cytoplasmique, fin et étendu. Les fonctions des AT I sont moins connues que celles des AT II à cause de difficultés d'isolation et de culture. Les AT I ont longtemps été considérées comme des cellules de structure, permettant l'échange des gaz. Suite au développement de nouvelles techniques, leur rôle dans la régulation des fluides alvéolaires a été mis en évidence (Borok et al. 2002 ; Farman et al. 1997 ; Johnson 2007). Entre autre, il existe une aquaporine spécifique des AT I, l'AQP5, qui sert d'autre part, de marqueur cellulaire (Williams 2003).

Suite au symposium « Experimental biologie meeting », en 2006, un consensus semble avoir établi que les AT I prendraient en charge les flux ioniques et aqueux en condition basale, tandis que les AT II se chargeraient des conditions stimulées (Guidot et al. 2006).

Les AT II représentent 15% des cellules pulmonaires et recouvrent 5 à 10 % de la surface alvéolaire (Fehrenbach 2001). Elles ont une forme cubique. Elles sont seules ou par groupes de deux ou trois cellules, encadrées par les AT I. Les AT II ont plusieurs rôles. Elles assument partiellement la ré-épithélialisation de l'alvéole endommagée lors d'une inflammation ou d'une infection, par leurs compétences de cellules phagocytiques et progénitrices. En effet, elles phagocytent les corps apoptotiques des AT II voisines (Fehrenbach et al. 2000). Une subdivision d'entre elles possède les capacités de différenciation suivie de multiplication, nécessaires à la naissance de nouvelles AT I (Reddy et al. 2004 ; Uhal 1997). D'autre part les AT II jouent un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie alvéolaire. La régulation du transport transépithélial des fluides contrôle incidemment le volume et la composition de l'hypophase alvéolaire (Fehrenbach 2001). Les AT II sont aussi des protagonistes de l'immuno-modulation par la métabolisation des éléments étrangers (Dimova et al. 2001), et l'interaction directe ou indirecte avec les cellules résidentes et mobiles de l'immunité (Fehrenbach 2001). Les AT II ont une implication majeure dans la synthèse, la sécrétion et le recyclage des composants du surfactant *via* les corps lamellaires, mais ne les dégradent pas ou peu (Fehrenbach 2001 ; Liley et al. 1988). Le surfactant est un film tensio-actif, qui en réduisant la tension superficielle à l'interface air- alvéoles lors de l'expiration, empêche leur collapsus.

2.3.1 Le surfactant et l'hypophase

Les docteurs J.R Wright (Wright 1997) et J.A Clements (Clements 1997) ont tous deux produit, en 1997, une revue de littérature présentant la composition et les rôles de l'hypophase et du surfactant. J'ai complété mes connaissances en utilisant la revue de littérature du Dr H. Fehrenbach, publiée en 2001 (Fehrenbach 2001).

L'hypophase est une fine couche aqueuse située à la surface du parenchyme respiratoire. L'origine de l'eau constituant l'hypophase n'est pas connue. Elle pourrait provenir de l'exsudat des vaisseaux sanguins filtré par les AT I. L'équipe du Dr Battacharya a été la première à observer que le transport ionique (ici le chlore *via* le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator channel)) conduit un efflux liquidien participant à la formation de

l'hypophase (Lindert et al. 2007). L'hypophase sert de zone de passage et de transformation pour les corps lamellaires, provenant des AT II. Les corps lamellaires seront transformés en myéline tubulaire, d'où se dissocieront les composants protéiques et lipidiques qui formeront le film tensio-actif ou surfactant à la surface de l'hypophase. La formation du surfactant est dépendante de plusieurs éléments liés à l'hypophase, tel que la concentration en électrolytes, dont principalement le calcium, et le pH. Elle résulte aussi de l'implication des protéines SP- A, B et C (voir ci-dessous) et de l'enzyme convertase.

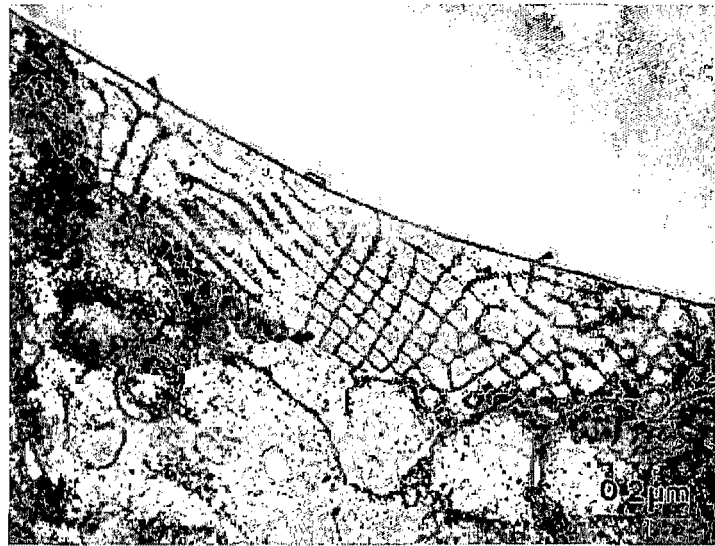


Figure 8 : Le surfactant et l'hypophase (Fehrenbach 2001). Un microscope à transmission électronique (Transmission electron micrograph) permet de voir la myéline tubulaire dans l'hypophase, le surfactant (têtes de flèches), ainsi que les vésicules de surfactant à la surface de AT II (flèches grasses), chez le rat.

Le surfactant est sécrété par plusieurs types cellulaires dont les cellules de Clara et les AT II. Cette sécrétion peut être stimulée par le biais des récepteurs β -adrénergiques et purinergiques, par des molécules comme la toxine du choléra, par l'acide arachidonique et l'histamine, ou encore par la ventilation (mécano-senseur). Les AT II sont aussi indispensables au recyclage du surfactant, qui est renouvelé toutes les 5 à 10h. Le surfactant est un film moléculaire protéo-lipidique (~90% du poids sont des lipides, ~10% sont des protéines). Le principal composant lipidique est un phospholipide à chaînes saturées, la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). Le phosphatidylglycerol ne représente, quand à lui, que 5% du poids sec du surfactant. La DPPC comporte un pôle

hydrophile vers l'hypophase et un pôle hydrophobe vers l'air, ce qui lui permet de s'étaler à la surface de l'hypophase. Seule, la DPPC formerait un film rigide à 37°C. Ce sont principalement les cholestérols et des phospholipides insaturés, avec l'aide de SP-A, B et C (voir ci-dessous), qui empêchent l'interaction rigide des phospholipides dont la DPPC. En diminuant la force d'interaction, le degré de liberté augmente, permettant les mouvements et donc la répartition des molécules en un film souple à la surface de l'hypophase.

D'autre part les quatre apoprotéines désignées SP- A, B, C et D, sont présentes en faibles quantités, mais jouent des rôles essentiels. Elles appartiennent à la famille des collectines qui contient une région N-terminal semblable à celle du collagène et une région C-terminal contenant les domaines de liaison à l'ion calcium et aux carbohydrates. Elles sont sécrétées par les AT II et les cellules de Clara sauf le SP-C qui n'est sécrété que par les AT II. Les apoprotéines SP- A et D sont de grande taille, hydrophiles, et ont des fonctions multiples. Elles ont notamment un rôle anti-microbien (liaison aux bactéries et virus par le domaine lectine) et SP-A a, en plus, un rôle immuno-modulateur. Les apo-protéines SP- A, B et C participent à la transformation des corps lamellaires, présents dans l'hypophase, en myéline tubulaire. Les apoprotéines SP- B et C sont de petite taille, très hydrophobes et étroitement associées aux phospholipides dont elles facilitent l'étalement à la surface de l'hypophase. D'autres protéines sont présentes dans le surfactant, dont l'albumine, les immunoglobulines (IgG et IgA), des lipoprotéines du sérum, des cytokines et des facteurs de croissance.

Le rôle tensio-actif du surfactant a été pour la première fois mis en évidence par le Dr Von Neergaard en 1929. En effet, l'hypophase se trouvant à la surface des alvéoles pulmonaires, possède une tension superficielle forte qui, lors de l'expiration, conduirait au collapsus des alvéoles. Le surfactant joue, en outre, un rôle dans la perméabilité alvéolaire (effet anti-œdémateux), dans l'effet chimiotactique, dans la production de radicaux libres et dans les mécanismes de défenses contre les micro-organismes (en piégeant les pathogènes, et en activant la prolifération des lymphocytes).

Il est important de savoir que dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte (SDRA), il existe un déficit en surfactant, secondaire aux lésions de l'épithélium alvéolaire (Baker et al. 1999 ; Crim and Longmore 1995 ; Gregory et al. 1991 ; Seeger et al. 1993b ; Seeger et al. 1993a).

B Les rôles fonctionnels du système respiratoire

1. L'appareil respiratoire

Le rôle principal de l'appareil respiratoire consiste en l'échange gazeux au niveau du parenchyme respiratoire (Matthay et al. 1996) qui oxygène notre sang et élimine le dioxyde de carbone. Ce transport d'air nécessite notamment sa conduction, sa purification et son humidification par l'ensemble des voies aériennes. L'appareil respiratoire assure d'autres rôles, qui ne seront pas étudiés dans ce mémoire, dont :

- 1- immunitaire : il participe à la défense de l'organisme par la présence de follicules et de tissus lymphoïdes diffus disséminés dans ses muqueuses.
- 2- neuroendocrinien : il contient des cellules endocrines sécrétant des amines et des polypeptides ayant une activité hormonale ou de neurotransmetteur (sérotonine, bombésine, calcitonine, enképhaline).
- 3- métabolique : les cellules endothéliales situées dans les poumons sont le lieu de transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, le plus puissant vasoconstricteur de l'organisme, augmentant ainsi la pression sanguine. De plus ces cellules captent et dégradent des substances contenues dans le sang comme la sérotonine et la méthadone, qui seront excrétées au niveau de la muqueuse bronchique.

2 L'épithélium respiratoire

Afin d'assumer son rôle principal, l'épithélium doit être intègre, il doit participer à l'élimination des éléments exogènes et assumer les échanges hydro-électriques qui maintiennent les liquides mucociliaire et alvéolaire. L'épithélium respiratoire a donc trois rôles, permettant en plus des échanges gazeux, le maintien de l'intégrité physique, la protection immunitaire et l'homéostasie liquidienne du poumon. Ces trois rôles se retrouvent tout au long de l'appareil respiratoire, ils sont remplis par différents types cellulaires.

2.1 Le maintien de l'intégrité physique de l'épithélium respiratoire

Les échanges gazeux dépendent de la présence et de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire (Meban 1987), ainsi que de la présence et de la qualité de l'hydropase dans laquelle vont se dissoudre les gaz (Maina and West 2005). Les gradients de pression permettent à l'oxygène d'aller d'une zone de haute pression (alvéole) vers une zone de pression plus faible (plasma). Le mécanisme est inversé pour le gaz carbonique. Cela permet l'hématose qui est un phénomène passif. C'est la faible pression sanguine intrapulmonaire qui permet la perfusion rapide et continue du sang veineux (chargé en gaz carbonique) véhiculé par les capillaires pulmonaires et le renouvellement régulier des gaz alvéolaires. Le maintien de l'intégrité physique est donc une absolue nécessité pour un échange gazeux adéquat.

Ce maintien se fait d'abord à l'aide du système mucociliaire dans les voies aériennes. Il permet une défense immunitaire passive (BANG 1961) qui nécessite la coordination des cellules caliciformes (sécrétant le mucus) et des cellules ciliées. Les éléments inhalés, d'un diamètre supérieur ou égal au micron, sont piégés par le mucus et dirigés grâce aux cils, vers l'oropharynx ou expectorés. Que ce soit dans les fosses nasales ou dans les bronches, l'efficacité de ce « tapis roulant » dépend du mouvement des cils (intégrité, nombre et motilité) (Sleigh et al. 1988) et de l'état du mucus (viscoélasticité, épaisseur de la phase SOL et qualité de la phase GEL) (King 1987).

Le maintien de l'intégrité physique nécessite aussi une cohésion épithéliale qui passe par la préservation de l'intégrité des jonctions intercellulaires et l'ancrage à la membrane basale. Au niveau du poumon distal, cette fonction est assumée en particulier par les AT I dont la cohésion limite le passage du plasma filtrant depuis les capillaires vers la lumière alvéolaire. Les AT I et II développent des jonctions serrées et communicantes, qui participent au maintien de l'intégrité de l'épithélium (Lee et al. 1997 ; Schneeberger et al. 1978). D'autre part le maintien de l'intégrité, c'est aussi la régénération et la réparation de l'épithélium suite à la création de lésions de quelque origine que ce soit. Respectivement pour l'épithélium pseudo-stratifié, l'épithélium uni-stratifié et l'épithélium alvéolaire, les cellules progénitrices sont les cellules basales, ainsi que les cellules limitant les glandes de sécrétion, puis les cellules de Clara et possiblement les cellules neuroendocrines pulmonaires, et enfin les AT II (Bishop 2004 ; Otto 2002). Plus précisément c'est une sous-population des cellules de Clara résistante aux polluants, exprimant le CCSP (Clara cell secretory protein) appelées vCE, qui est à l'origine de la reconstitution de l'épithélium

bronchiolaire (Hong et al. 2001), mais aussi d'une subdivision des AT II (Reynolds et al. 2004). Cette subdivision des AT II permet la régénération de l'épithélium alvéolaire (Adamson and Bowden 1974b ; Reddy et al. 2004 ; Uhal 1997).

Les cellules progénitrices permettent la réparation de l'épithélium par plusieurs mécanismes dont l'étalement, la migration, la prolifération et la différenciation. L'ordre exact de ces événements n'est pas connu. La différenciation semble être la phase finale de restauration de l'épithélium lésé. Plusieurs équipes cherchent à déterminer cette séquence (Berthiaume et al. 1999 ; Uhal 1997). L'ordre utilisé, en général, est la dé-différenciation ensuite les mécanismes de migration, prolifération, et enfin différenciation. Au niveau de l'épithélium alvéolaire, lorsqu'une lésion survient, les cellules progénitrices « AT II » migreraient d'abord vers le site de lésion, puis elles proliféreraient afin de recoloniser la zone lésée et enfin, pour une part d'entre elles, se différencieraient en AT I, reformant un épithélium complet (Adamson and Bowden 1974a ; Adamson and Bowden 1974b).

2.2 La protection immunitaire liée à l'épithélium respiratoire

La fonction de protection immunitaire est entre autre définie comme la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires.

Des formations tissulaires existent depuis le pharynx jusqu'aux bronches. Ce sont en particulier des formations lymphoïdes qui protègent des voies aériennes sous-jacentes. Il y a l'anneau de Waldeyer, les amygdales linguales, pharyngées, palatines et tubaires, mais aussi du tissu diffus. Les lymphocytes B et les plasmocytes présents dans les formations lymphoïdes, produisent des anticorps, spécialement des IgA, qui se retrouvent dans le mucus. Les cellules séreuses des glandes mixtes du chorion produisent du lysozyme. Il est présent dans le mucus.

D'autre part, il existe des macrophages présents dans la cloison inter-alvéolaire et dans l'hypophase, issus des monocytes sanguins circulants. Ils représentent 90% des cellules recueillies au cours d'un lavage broncho-alvéolaire. Ils séjournent un temps variable dans le parenchyme respiratoire (certains y demeurent), puis ils sont soit véhiculés par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions hilaires, soit entraînés dans les bronchioles, les bronches et la trachée. Englués dans le tapis muqueux, ils sont alors déglutis au niveau de l'oropharynx ou expectorés. D'autres leucocytes (polynucléaires, lymphocytes, plasmocytes, mastocytes) sont présents dans le tissu conjonctif inter-alvéolaire. Les

lymphocytes représentent 5 à 10% des cellules recueillies au cours d'un lavage broncho-alvéolaire. Suite à une invasion de l'alvéole par des germes infectieux, les macrophages constituent la première ligne de défense relativement spécifique puisqu'ils sont capables d'organiser une réponse inflammatoire adaptée, en recrutant les polynucléaires et en utilisant les compétences des AT II (Bowden 1984).

Parmi les compétences des AT II, il y a l'endocytose et la dégradation du surfactant, ainsi que des éléments piégés par celui-ci, permettant ainsi une détoxification (Dimova et al. 2001).

L'ensemble des cellules du système alvéolaire participe à la formation de molécules concourant à la protection immune. Les leucocytes, dont les neutrophiles (Fialkow et al 2007) et les macrophages (Iovine et al 2008), produisent et utilisent des métabolites réactifs de l'oxygène et de l'azote (ROS ou reactive oxygen species et RNS ou reactive nitrogen species), qui participent à l'élimination de l'élément phagocyté. Dans les neutrophiles, la voie des pentoses permet la création de NADPH, qui associé à l'oxygène, sera utilisé par une NADPH-oxydase pour former des ions peroxydes (O_2^-). Ils serviront à leur tour de substrat à la super oxyde dismutase, formant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ils utilisent aussi la myéloperoxydase qui se sert du peroxyde d'hydrogène, afin d'oxyder les ions chlore pour former de l'acide hypochloreux, un puissant agent anti-bactérien (Weiss 1989). Les ROS sont aussi formés durant la réduction des molécules d'oxygène en eau, lors de la respiration cellulaire dans la chaîne mitochondriale de transport des électrons, par les cyclo-oxygénases et par des enzymes comme le cytochrome P_{450} oxydase et la xanthine oxydase (Janssen et al. 1993). Les sources de ROS dans le poumon inclues les neutrophiles, éosinophiles et macrophages, mais aussi les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques et les cellules endothéliales (Holland et al. 1990 ; Kinnula et al. 1992b ; Kinnula et al. 1992a). Les cellules de l'épithélium respiratoire peuvent aussi produire des métabolites de l'acide arachidonique, des radicaux libres ou activer le système de protection antioxydant intra- et extra-cellulaire, des cytokines pro- et anti-inflammatoires (IL_3 , TGF_β , RANTES), des enzymes membranaires anti-inflammatoires (anti-neuropeptides et anti-protéase), des molécules d'adhérence, des sous-unités du complément, participant ainsi à la réponse immune.

Ces mécanismes de protection liés à l'immunité se dérèglent parfois, suite à une infection ou une anomalie génétique, par exemple. L'inflammation et le taux élevé de ROS deviennent alors délétères. Ainsi une inflammation neutrophilique produisant des oxydants

diminue la clairance alvéolaire (Modelska et al. 1999). Le taux d'anti-oxydants des AT II diminue lorsqu'elles se dé-différencient en AT I (Panus et al. 1989), et augmente lorsqu'elles sont stimulées par un stress oxydant (Freeman et al. 1986 ; Yue et al. 1995). Un stress externe va induire la production de ROS intracellulaires dans le tissu et les cellules pulmonaires. Celui-ci va conduire à la peroxydation lipidique, l'inactivation protéique, la destruction des acides nucléiques, provoquant éventuellement la mort de la cellule. Le SDRA est un syndrome lié au développement d'un infiltrat neutrophilique, augmentant potentiellement le taux de ROS, et donc le degré de lésions à l'épithélium pulmonaire (voir § C).

2.3 l'homéostasie liquidienne de l'épithélium respiratoire

L'épithélium alvéolaire régule les phases liquidiennes à la surface de l'épithélium par le contrôle du transport ionique et conséquemment, le transport des fluides. La phase GEL ou périciliaire permet le battement ciliaire et l'élimination du mucus et des éléments exogènes piégés. Le film tensio-actif du surfactant assure une respiration sans collapsus alvéolaire. L'hypophase du surfactant est indispensable à la dissolution des gaz permettant les échanges avec le sang des capillaires (Maina and West 2005).

2.3.1 Au niveau des voies respiratoires extra- et intra-pulmonaires

La phase périciliaire se trouve à la surface de l'épithélium respiratoire, depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles terminales. Cette phase liquide permet le battement ciliaire, et donc le déplacement du mucus vers l'œsophage, est contrôlée par des gradients ioniques associés à des flux aqueux. Plusieurs mécanismes de transport ioniques et aqueux (canaux, pompes et transporteurs) sont présents à la membrane de différents types cellulaires (cellules ciliées et cellules de Clara (Crouch et al. 1992)).

L'équipe du Dr Nadel, en 1975 (Davis et al. 1975), a été la première à mettre en évidence l'existence de transport actif de sodium (Na^+) (absorption) et de chlore (Cl^-) (sécrétion) à travers un épithélium trachéal, *in vitro*.

Le transport de Na^+ à la membrane basolatérale, se fait principalement par la pompe sodium-potassium adenosinetriphosphatase (NaKATPase), mise en évidence à la membrane basolatérale de l'épithélium trachéal en 1979 (Widdicombe et al. 1979). La

NaKATPase transporte les ions K^+ et Na^+ contre leurs gradients de concentration, grâce à l'hydrolyse de l'ATP. A la membrane apicale, le transport de sodium se fait par des canaux amiloride-sensible (Boucher and Gatzky 1983 ; Knowles et al. 1984 ; Ropke et al. 1996 ; Willumsen and Boucher 1991) et amiloride-insensible (Langridge-Smith 1986). Le principal canal cible de l'amiloride, epithelial amiloride-sensitive sodium channel ou ENaC, a été cloné par l'équipe du Dr Rossier, en 1993 (Canessa et al. 1993). C'est à partir de 1996 qu'a été étudié la localisation de ENaC tout au long de l'appareil respiratoire (Matsushita et al. 1996). Il est à noter que selon l'espèce, l'expression tissulaire des sous-unités d'ENaC diffère (Farman et al. 1997 ; Rochelle et al. 2000). La présence de courants sodium apicaux amiloride-insensibles a été identifiée par le docteur Langridge-Smith, en 1986, dans l'épithélium trachéal (Langridge-Smith 1986). Ce courant amiloride-insensible peut, entre autre, être conduit par le canal CNG (cyclic nucleotide-gated), non-sélectif aux cations (Schwiebert et al. 1997), et les co-transporteurs NaCl (Ropke et al. 1996), NaK2Cl (Ropke et al. 1996 ; Willumsen and Boucher 1991), et Na-glucose (Saumon et al. 1990 ; Steel et al. 1994).

Le transport de Cl^- à la membrane basolatérale, se fait principalement par le cotransporteur NaK2Cl (Ropke et al. 1996 ; Willumsen et al. 1989). A la membrane apicale, le canal chlore le plus connu est CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Le CFTR a été cloné par les Drs Riordan et al, en 1989 (Riordan et al. 1989). Sa localisation aux épithéliums respiratoires nasal, trachéal et bronchial, a été faite en 1991 (Trapnell et al. 1991). D'autres canaux chlore peuvent être impliqués dans la sécrétion, tel les canaux ORCC (Boucher 1994; Schwiebert et al. 1994), CaCC (Alton et al. 1991 ; Boucher 1994 ; MacVinish et al. 1998) et le cotransporteur NaCl (Ropke et al. 1996).

Parmi les canaux potassiques mis en évidence dans les voies respiratoires se trouvent les familles des canaux potassium voltage-dépendant (K_V) dont K_vLQT1 (Grahammer et al. 2001; Lock and Valverde 2000), Ca^{2+} -dépendant (K_{Ca}), rectifiant entrant (K_{IR}) dont Kir2.1 (Jeong et al. 2001) et ATP-dépendant (K_{ATP}). Les canaux potassiques participant à la régulation des flux ioniques et aqueux, se trouvent principalement à la membrane basolatérale (Ropke et al. 1996; Stutts et al. 1988 ; Leroy et al. 2004 et 2006).

L'équilibre ionique est régulé par l'ensemble des transports Na^+ , Cl^- et K^+ . L'influx de Na^+ et l'efflux de Cl^- formant des courants ioniques bidirectionnels, ils conduisent les flux liquidiens, ce qui permet de maintenir un volume adéquat de la phase périciliaire. La provenance de l'eau n'est pas connue, mais elle pourrait être issue des cellules caliciformes

de l'épithélium, des glandes séro-muqueuses et du transsudat plasmatique. Elle transite de façon paracellulaire (Folkesson et al. 1996) et transcellulaire *via* les aquaporines (AQP). AQP-3 est généralement exprimé à la membrane basolatérale des épithéliums respiratoires, AQP-4 peut-être exprimé aux deux membranes, tandis que AQP-5 se trouve à la membrane apicale. AQP-3 et 5 se situent à l'épithélium nasal. AQP-4 se localise à l'épithélium trachéal. AQP-3, 4 et 5 sont à l'épithélium bronchique. AQP-3 et 4 sont trouvés à l'épithélium bronchiolaire. (Folkesson et al. 1996; Kreda et al. 2001)

2.3.2 Au niveau du parenchyme respiratoire

2.3.2.1 Les canaux et transporteurs ioniques

À la surface de l'épithélium respiratoire alvéolaire se trouve l'hypophase. Cette phase liquidienne, sous-jacente au film tensio-actif du surfactant, est régulée par des gradients ioniques induisant des flux aqueux. Les deux types cellulaires formant le parenchyme respiratoire, les AT I et II, participent à la régulation des gradients ioniques, par la présence de canaux, pompes et transporteurs, à leurs membranes [Figure 9]. A la membrane plasmique de l'épithélium respiratoire alvéolaire ont été mis en évidence des transport actifs de sodium et de chlore : -1- transport actif de sodium (Na^+) *in vitro* (Mason et al. 1982), puis *in situ* (Basset et al. 1987) et enfin *in vivo* (Berthiaume et al. 1987), -2- transport actif de chlore (Cl^-) *in vitro* (Schneider et al. 1985), puis *in vivo* (Fang et al. 2002 ; Lindert et al. 2007).

Dès les années 1940, des équipes travaillant à la compréhension du développement de l'œdème pulmonaire, ont pu constater un lien entre les transports des ions potassium, calcium et de l'eau (HEBB and NIMMO-SMITH 1949). Il est reconnu que les transports Na^+ et Cl^- transcellulaires sont interdépendants, entre autre *via* le potentiel membranaire (O'Grady and Lee 2003). D'autre part, lorsque la clairance alvéolaire est stimulée par un activateur des canaux K_{ATP} , l'amiloride est capable d'inhiber cette clairance. Cela prouve une implication des canaux Na^+ amiloride-sensible et donc un lien entre les flux ioniques K^+ et Na^+ (Sakuma et al. 1998). Ces expériences nous montrent l'évidente inter-relation de régulation des différents canaux, les uns avec les autres. Les transports de sodium, chlore, et potassium sont les plus importants et les principaux étudiés, dans les cellules pulmonaires, au niveau basolatéral et apical.

À la membrane basolatérale, le sodium est transporté par la pompe NaKATPase (AT I (Johnson et al. 2006) et II (Jones et al. 1982)), par le cotransporteur NaK₂Cl (Clerici et al. 1995) et l'antiporteur Na⁺/H⁺ (Lubman and Crandall 1994 ; Saumon and Basset 1993). Le gradient sodium entrant à la membrane apicale peut être amiloride-sensible ou insensible. Parmi les canaux amiloride-sensible apicaux se trouvent principalement le canal ENaC cloné en 1993 dans les AT II (Yue et al. 1995), puis caractérisé également dans les AT I (Borok et al. 2002) (voir § B.2.3.2.2). Contrairement à ce qu'il était présumé pendant longtemps, les AT I participent aux transports ioniques et aqueux. L'idée de la participation des AT I a été émise et argumentée par les Drs Matalon, Benos et Jackson en 1996 (Matalon et al. 1996). Il a été récemment démontré que la quantité de α ENaC est plus grande chez les AT I que les AT II, induisant un influx Na⁺ amiloride-sensible deux fois et demi plus important chez les AT I que les AT II (Johnson et al. 2002). Il existe d'autres canaux amiloride-sensible dont les canaux non-sélectifs aux cations (Feng et al. 1993; Junor et al. 1999). Le transport de sodium amiloride-insensible (Norlin et al. 2001) peut se faire par le canal CNG1 (cyclic nucleotides gated channel) (Junor et al. 1999 ; Schwiebert et al. 1997), et les cotransporteurs Na⁺/glucose, Na⁺/acide aminé et Na⁺/phosphate (Saumon and Basset 1993).

Le courant chlore au niveau du parenchyme respiratoire a été moins étudié. Il existe des transporteurs chlore basolatéraux dont les échangeurs Cl/HCO₃ (Lubman et al. 1995), KCl 1 et 3 (Lee et al. 2003b) et le cotransporteur NaK₂Cl (Clerici et al. 1995 ; Lee et al. 2003b). Différentes équipes mettent en évidence la présence de canaux chlore apicaux (Kemp et al. 1993 ; Schneider et al. 1985), mais c'est seulement en 2004 qu'une présence fonctionnelle du canal CFTR a été déterminée dans les AT II (Brochiero et al. 2004) et en 2006 dans les AT I (Johnson et al. 2006). Plus récemment, plusieurs auteurs amènent l'idée que la clairance alvéolaire est menée non seulement par l'influx de Na⁺, mais aussi par l'influx Cl⁻, possiblement dépendant du canal CFTR (Berthiaume et al. 1987 ; Fang et al. 2002 ; Lee et al. 2003b ; Matthay et al. 2005).

La pompe NaKATPase produit un flux K⁺ qui est recyclé par les canaux K⁺ basolatéraux, contrôlant ainsi le potentiel de membrane. La première mise en évidence de canaux potassium voltage-dépendant dans les cellules alvéolaires date de 1988 (DeCoursey et al. 1988). Majoritairement, les canaux et autres transporteurs de K⁺, participant à la régulation des flux ioniques et aqueux, se trouvent à la membrane basolatérale. Outre la pompe NaKATPase (Basset et al. 1988), le K⁺ peut transiter par des canaux K⁺ rectifiant entrant

(Kir2.1) (Jeong et al. 2001; O'Grady and Lee 2003), des canaux K^+ ATP dépendant (K_{ATP}) (Leroy et al. 2004; Sakuma et al. 1998), des canaux K^+ voltage-dépendant K_vLQT1 (Leroy et al. 2004) et $K_v1.7$ (Bourke et al. 2005) et des canaux Ca^{2+} dépendant (maxi- K_{Ca}) (Leroy et al. 2004). A la membrane apicale se trouvent des canaux K^+ voltage-dépendant ($K_v1.1, 1.3, 1.4, 4.2, 4.3$) (Lee et al. 2003a), et possiblement la pompe HKATPase ainsi que, l'échangeur KCl (cobaye (Kemp et al. 1994)).

L'ensemble des transports ioniques régule les flux liquidiens, et ainsi la composition et le volume de l'hypophase. Bien que la provenance de l'eau ne soit pas évidente, il semble qu'une partie provienne du transsudat plasmatique (HEBB and NIMMO-SMITH 1949) et que le canal CFTR participe aux formation, maintien et/ou régénération de l'hypophase par l'induction d'un flux liquidien (Lindert et al. 2007). Les flux liquidiens transitent par les voies paracellulaire et transcellulaire en utilisant les aquaporines. AQP-1 semble exprimée à la membrane des AT II (Effros et al. 1997), avec AQP-3 (membrane basolatérale) (Kreda et al. 2001). Tandis que les AT I possèdent AQP-4 et -5, respectivement aux membranes basolatérale et apicale (Kreda et al. 2001). Il semble que les aquaporines ne soient pas indispensables à la clairance alvéolaire, mais pourraient être utiles à la régulation des volumes liquidiens (Song et al. 2000).

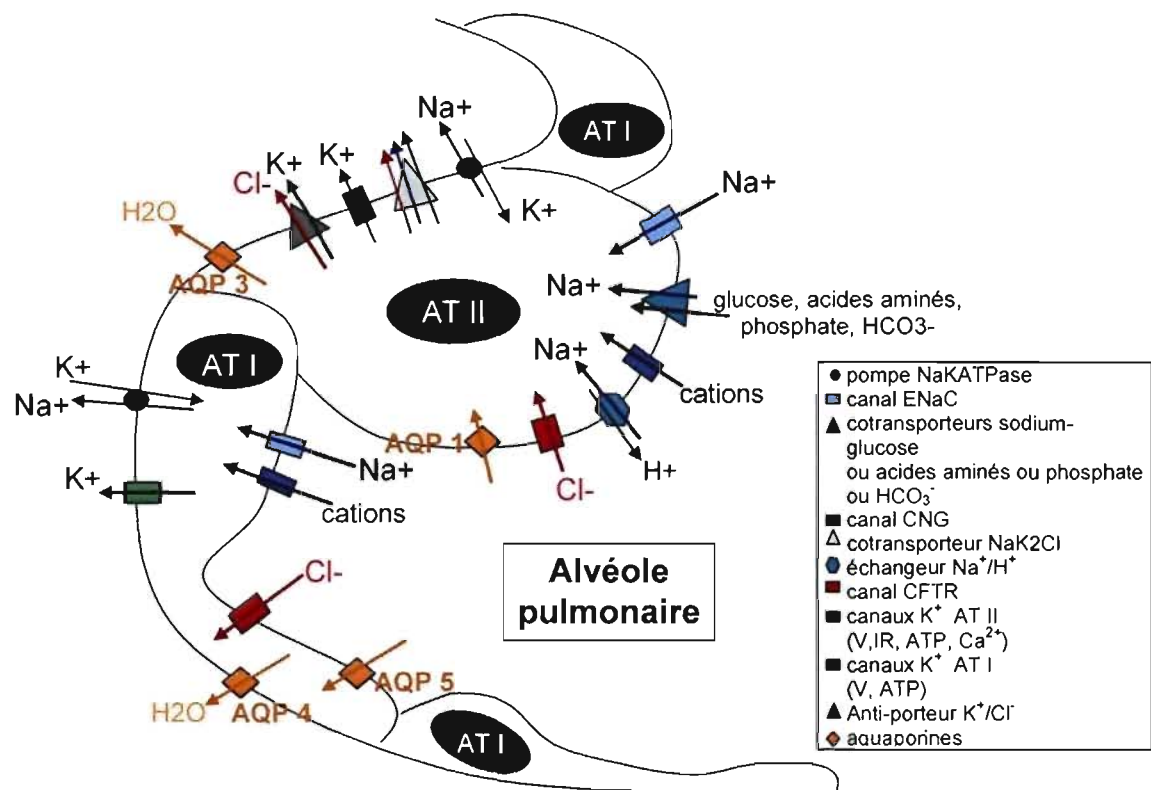


Figure 9 : Les canaux et transporteurs au niveau des cellules AT I et II

2.3.2.2 Le canal épithélial sodium amiloride-sensible ENaC

Classification

En 1992, le Dr Palmer a classé les canaux apicaux amiloride-sensibles en trois sous-groupes en fonction de leur conductance, sélectivité et sensibilité aux inhibiteurs. Na(5) possède une conductance de 4-5 pS, une haute sélectivité du sodium par rapport au potassium, de longs temps d'ouverture et de fermeture, et ils sont activés par l'hyperpolarisation de la membrane. Na(9) possède une conductance de 9 à 15pS, une sélectivité moyenne pour le sodium par rapport au potassium, des temps d'ouverture et fermeture plus faibles, d'autre part ils sont activés par la dépolarisation de la membrane. Na(28) possède une conductance faible (3pS) ou élevée (20pS) et est non-sélectif aux cations.

Ces canaux ont aussi été classés en high (H-type) et low (L-type)- affinity channels. Le H-type possède une haute affinité pour l'amiloride (phenamil, benzamil>amiloride>>>EIPA) associée à une haute résistance transépithéliale. L-type possède une faible affinité pour l'amiloride (amiloride<ou=EIPA).

En 1994, un canal ayant les caractéristiques du H-type a été cloné et caractérisé en tant que NaCh (sodium channel), qui sera ensuite nommé ENaC (epithelial amiloride-sensitive sodium channel), dans les AT II (Voilley et al. 1994).

Identité moléculaire et localisation

Le premier clonage de la sous-unité alpha de ENaC (3,7kb) a été réalisé en 1993 à partir du colon de rat (Canessa et al. 1993). La séquence de lecture possède 2094 nucléotides, menant à la formation d'une protéine de 698 acides aminés, ayant une masse moléculaire d'environ 79kDa. Le gène α ENaC humain possède 13 exons et 12 introns (Chow et al. 1999), il est situé sur le chromosome 12p13 (Kellenberger and Schild 2002 ; Voilley et al. 1994). Par homologie de séquence, ENaC a été déterminé comme appartenant à la famille des dégénérines. Des variantes d' α ENaC, apparaissant lors de la transcription génique ont été identifiées (Thomas et al. 1998 ; Voilley et al. 1994). Les sous-unités β (2,2kb ; 72kDa) et γ (3,2kb ; 75kDa) (Canessa et al. 1994) sont localisées sur le chromosome 16p

(Kellenberger and Schild 2002). D'autres sous-unités ont été découvertes dont δ , présente sur le chromosome 1 (Kellenberger and Schild 2002), elle est faiblement exprimée dans le poumon (Waldmann et al. 1995).

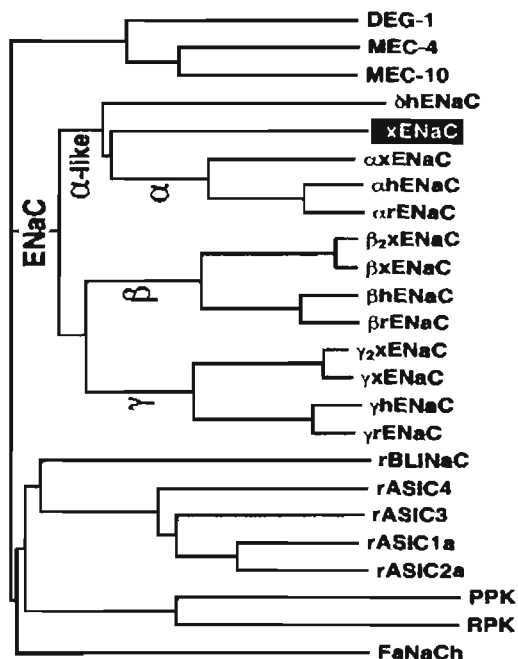


Figure 10 : Arbre phylogénique du gène ENaC

Chaque sous-unité possède deux domaines transmembranaires, une grande boucle hydrophile portant des sites de N-glycosylation et de courtes terminaisons NH_2 - et $-\text{COOH}$ hydrophiles.

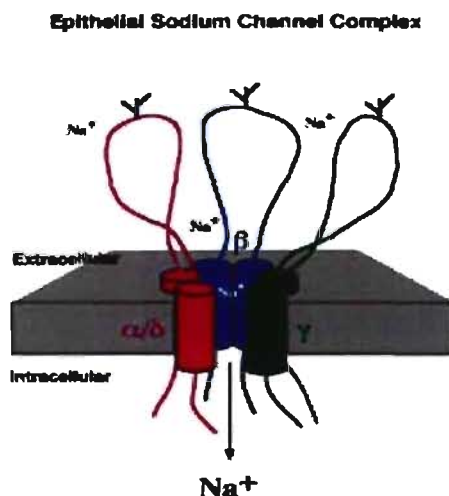


Figure 11 : Schéma du canal ENaC avec les sous-unités α ou δ , et β , et γ

(<http://phsl.otago.ac.nz/staff/mcdonald.html>)

Les sous-unités sont synthétisées et glycosylées dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'ajout de complexes N-glycane. Elles transitent ensuite par l'appareil de Golgi, où elles se complexifient, avant d'être amenées à la membrane cytoplasmique (Hughey et al. 2003 ; Snyder 2002). Les sous-unités pourront ensuite être la cible d'un clivage protéolytique, menant à la maturation du complexe protéique canal ENaC (Hughey et al. 2003 ; Snyder 2002). D'autre part, les sous-unités semblent aussi pouvoir être synthétisées et transportées individuellement (Snyder 2002). La maturation à la membrane cytoplasmique, qui conduit à l'activation du canal (Caldwell et al. 2004 ; Hughey et al. 2004a), est due au déséquilibre entre les sérine-protéases (dont CAP1 et prostasin) et les inhibiteurs de sérine-protéases (dont HAI ou BAY), qui penche en faveur des sérine-protéases ((Myerburg et al. 2006) et voir § -2). Les canaux non-matures formeraient un pool rapidement activable en cas de besoin (membranaire (Caldwell et al. 2004 ; Hughey et al. 2004b) et sous-membranaire (Kleyman et al. 1991)).

Le nombre de sous-unités formant le canal est sujet à controverse. La stœchiométrie comportant 4 sous-unités : $\alpha_2\beta\gamma$ est la plus couramment nommée (Firsov et al. 1998), mais certaines études suggèrent la version à 9 sous-unités : $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ (Snyder et al. 1998). La sous-unité α , seule, peut former un canal non-sélectif aux cations (NSC). La présence des trois sous-unités permet la formation d'un canal ayant les caractéristiques de la protéine native comme une haute sélectivité au sodium par rapport au potassium (20:1). Plusieurs études montrent qu'il existe une famille de canaux amiloride-sensible, de sélectivité variable. L'hypothèse en cours, serait qu'en fonction du type et du nombre de sous-unités formant le canal, il serait obtenu un canal « ENaC » aux caractéristiques différentes (Eaton et al. 2004). Dans le même ordre d'idée, il est important de savoir que chacune des sous-unités α , β et γ participe à la sélectivité des ions (Fyfe and Canessa 1998 ; McNicholas and Canessa 1997) et à l'affinité pour les inhibiteurs (Ji et al. 2004 ; Kellenberger et al. 2003 ; Schild et al. 1997). Le canal ENaC est inhibé par l'amiloride diurétique ($IC_{50}=0,1-0,2\mu M$) et ses analogues (benzamil ($IC_{50}=11nM$)), ainsi que le triamterene ($IC_{50}=4,5\mu M$) (Kellenberger et al. 2003). Les cinétiques d'ouverture et de fermeture de ENaC sont très lentes, la probabilité d'ouverture varie selon le canal étudié (Snyder 2002).

Les trois sous-unités ont été subséquemment clonées chez l'humain (Voilley et al. 1994 ; Voilley et al. 1995), elles possèdent 30-35% d'homologie. Elles sont présentes tout au long de l'appareil respiratoire (Farman et al. 1997), en particulier dans le poumon (Canessa et al. 1994). Leur prévalence est variable. Ainsi la sous-unité α est nettement majoritaire dans l'épithélium nasal, tandis qu'il partage la présence avec la sous-unité γ dans l'épithélium distal, et la sous-unité β prédomine dans l'épithélium bronchique (Pitkanen et al. 2001). Le clonage des trois sous-unités a été réalisé chez le rat, dans les AT II par l'équipe du Dr Matalon (Yue et al. 1995), et par l'équipe du Dr Crandall dans les AT I (Borok et al. 2002). ENaC a été localisé à la membrane apicale de cellules épithéliales (Garty and Benos 1988).

Fonctions

Dans les poumons le transport de sodium est impliqué dans le maintien d'une phase liquidienne adéquate à la surface de l'épithélium. L'épithélium pulmonaire a un double rôle d'absorption et de sécrétion des ions et des fluides. Les canaux impliqués dans le transport du sodium participent à la réabsorption des fluides des zones proximale (Mall et al 2004) et distale (Berthiaume et al 1987) pulmonaires. Ils ont été identifiés aux membranes des cellules AT I et II (voir § 2.2.3.2). Le canal ENaC dans l'ensemble des poumons tient une place indispensable, car en son absence lors de la naissance, l'animal incapable de résorber le fluide pulmonaire fœtal, meurt (Hummler et al. 1996). Il est aussi indispensable à la clairance mucociliaire (Boucher 1994 ; Mall et al 2004).

D'autres rôles lui sont attribués, comme une augmentation délétère de son activité associée à l'hypertension et aux maladies cardiaques (Boucher 1994 ; Sagnella and Swift 2006 ; Teiwes and Toto 2007) ou encore la présence de mutations liées au développement de syndromes rénaux tel celui de Liddle (Boucher 1994 ; Ecelbarger and Tiwari 2006), mais ils ne seront pas traités ici.

Régulation du canal

ENaC est régulé par un nombre important de molécules à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel (formation, transport et stabilité à la membrane), fonctionnel (activation, probabilité d'ouverture et conductance). Il sera pris un ou deux exemples pour chacun des niveaux décrits ci-dessus. Il est entendu que chaque

exemple peut participer à d'autres niveaux, et que chaque niveau pourrait faire l'objet de plusieurs exemples.

Niveau transcriptionnel

-1- Les hormones corticostéroïdiennes sont secrétées par le cortex de la glande surrénale à partir du cholestérol et sous la dépendance de l'ACTH (adreno-cortico-trophic hormone hypophysaire). Il a été montré que le cortisol endogène est nécessaire à la régulation de la clairance alvéolaire basale, certainement par la modulation de l'expression des sous-unités de ENaC (Norlin et al. 1999) et la formation de canaux hautement sélectifs au sodium (HSC) (Eaton et al. 2004).

Les minérolo- et gluco-corticoïdes vont se lier à un récepteur intracytoplasmique, qui va se transloquer dans le noyau et réguler la transcription génique. Un élément GRE (glucocorticoid response element) a été localisé dans la région 5' d'ENaC (Chow et al. 1999 ; Sayegh et al. 1999). Il existe plusieurs variantes d'ENaC (Thomas et al. 1998 ; Voilley et al. 1994), dont $\alpha 1$ plus présent au niveau alvéolaire et $\alpha 2$ au niveau des voies aériennes. L'élément GRE en 5' de α ENaC est plus proche du codon méthionine (Met) dans $\alpha 1$, il est alors possible que les glucocorticoïdes soient plus actifs au niveau alvéolaire que bronchique (Xu and Chu 2007).

Les glucocorticoïdes augmentent l'expression d'ENaC, associée à celle du courant sodium de plus de 20 fois, c'est une régulation dite : tardive (3 à 24h). Il existe aussi une régulation dite précoce (1 à 3h), impliquant une augmentation du courant sodium par deux ou trois fois.

La dexaméthasone (hormone glucocorticoïde de synthèse ayant un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur, dont la puissance est environ 40 fois celle du cortisol) conduit à l'augmentation du courant court-circuit (Isc) amiloride-sensible et de l'ARNm de α ENaC (Chow et al. 1999 ; Dagenais et al. 2001 ; Lin et al. 1999 ; Sayegh et al. 1999). Il semble aussi qu'en présence d'aldostérone ou de dexaméthasone, cette augmentation de l'ARNm de α ENaC soit liée à l'augmentation du nombre de canaux ENaC HSC par rapport aux canaux ENaC NSC (Eaton et al. 2004).

-2- L'adrénaline (ou épinéphrine) est à la fois une hormone et un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines. Elle est sécrétée par les glandes surrénales. L'adrénaline se fixe aux récepteurs adrénergiques des cellules. Lors de la régulation de l'œdème pulmonaire, d'autres agonistes des récepteurs β -adrénergiques (terbutaline, salmeterol) agissent. Ils entraînent une altération du courant total [la terbutaline (10 μ M) produit une réponse bi-phasique avec une diminution transitoire, puis une augmentation soutenue de la différence de potentiel] (Mason et al. 1982), et sodium amiloride-sensible (Berthiaume et al. 1987 ; Sakuma et al. 1998). Les antagonistes β -adrénergiques (dont le propranolol) préviennent cet influx, prouvant l'implication des récepteurs β -adrénergiques. Un des modes d'action des agonistes β -adrénergiques, semble être l'augmentation des sous-unités β et γ ENaC (Planes et al. 2002), et donc probablement des canaux ENaC HSC (highly sensitive channel) (Chen et al. 2002), induisant un accroissement du courant sodium amiloride-sensible. En l'absence des sous-unités α ou β ENaC l'activation par les agonistes β -adrénergiques n'a plus lieu (Randrianarison et al. 2007). L'activation des récepteurs β_2 adrénergiques va aussi permettre l'augmentation du niveau intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique ((AMPc)_i), par l'activation de l'adénylate cyclase (Goodman et al. 1984). Il a été constaté que l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire ([AMPc]_i) (par activation de sa synthèse ou inhibition de sa dégradation (IBMX)), augmente le transport de sodium par l'activation des canaux sodium apicaux (Matalon et al. 1996). L'AMPc est capable d'agir à plusieurs niveaux dont l'augmentation de l'expression de α ENaC (Dagenais et al. 2001 ; Minakata et al. 1998), la stimulation de la translocation de vésicules contenant ENaC à la membrane par PKA (phosphokinase A) (Snyder 2000), l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal par PKA (Senyk et al. 1995), ou encore la stimulation de la conductance (Lazrak and Matalon 2003). L'équipe du Dr Husted montre que l'effet à long terme de l'AMPc sur la régulation de l'expression et de la synthèse de α ENaC, semble passer par PI₃K, PKA et p38 MAPK (Thomas et al. 2004).

Niveau traductionnel

-1- L'équipe du Dr O'Brodovich a beaucoup travaillé sur ce niveau. Ils ont d'abord mis en évidence la possibilité d'une régulation traductionnelle. En effet, la mutation de la zone 5'UTR modifie la traduction (Otulakowski et al. 2001), et la traduction des trois sous-unités est modulée différemment lors du développement pulmonaire (Otulakowski et al.

2004). Dans les conditions physiologiques de normoxie (glucocorticoïdes + 21% oxygène), une augmentation de la synthèse des protéines α ENaC, suite à l'association de l'ARNm avec de grands polysomes, est détectée. Cette association n'a pas lieu en présence de 3% d'oxygène (Otulakowski et al. 2006). En 2007, la même équipe montre que c'est le passage à 21% d'oxygène qui permet le fonctionnement de mTOR qui induit la phosphorylation de 4E-BP, qui n'est alors plus lié avec eIF4E. eIF4E est alors libre de s'associer avec eIF4G, participant à la formation du complexe 5'-cap binding complex, qui permet la traduction de α ENaC (Otulakowski et al. 2007).

Niveau post-traductionnel (transport et stabilité à la membrane)

-1- La régulation de l'endocytose et l'exocytose peut aussi contribuer à la régulation de ENaC (Shimkets et al. 1997). Le transport vésiculaire à la membrane plasmique de ENaC semble être dépendant des SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors). Les t-SNAREs à la membrane plasmique sont, entre autre, les syntaxines et SNAP-23. Les syntaxines 1 et 3 permettent le transfert à la membrane du canal ENaC, par contre la syntaxine 1 inhibe le courant (inhibition du nombre de canaux à la membrane (Qi et al. 1999)), tandis que la syntaxine 3 l'active (Berdiev et al. 2004 ; Saxena et al. 1999). La syntaxine 1A et SNAP-23 interagissent en un complexe permettant la régulation de ENaC à la membrane, le mécanisme d'action n'est pas encore connu (Saxena et al. 2006). La syntaxine 1A augmente le courant amiloride-sensible et le nombre de canaux ENaC à la membrane, de façon concomitante il y a une diminution du pool de ENaC cytosolique. La syntaxine 1A participe à la relocalisation des canaux ENaC (Saxena et al. 2007). Il reste une controverse quant au rôle activateur ou inhibiteur de la syntaxine 1A sur le nombre de canaux ENaC à la membrane plasmique. Il semble que la variation de réponse dépende de la concentration de syntaxine utilisée, du système de lecture utilisé : bicouche lipidique, patch, Ussing, modèle *in vivo*, mais aussi du type cellulaire et donc de l'organe.

-2- Les trois sous-unités de ENaC possèdent au niveau du C-terminal cytosolique un domaine riche en proline (PPxY ou PY). Lorsque ce site est muté (syndrome de Liddle) la probabilité d'ouverture du canal ENaC et le nombre de canaux ENaC à la membrane sont augmentés (Firsov et al. 1996). C'est au niveau de ces mêmes domaines que se lie la E_3

protéine-ubiquitine ligase Nedd4-2 *via* les domaines WW3 et 4. La zone C-terminale de Nedd4-2 possède le domaine catalytique qui est une ubiquitine ligase, ayant pour cible la zone C-terminale des sous-unités α et γ ENaC (Kellenberger et al. 1998). Nedd4-2 possède deux variantes, toutes deux exprimées dans le poumon (Fotia et al. 2003). En présence de Nedd4, l'activité du canal ENaC est inhibée et il y a une diminution du nombre de canaux à la membrane. Selon le niveau d'ubiquitination produit par Nedd4, le canal ENaC sera endocyté, puis recyclé ou dégradé par les voies protéosomale ou endosomale (Kellenberger and Schild 2002 ; Snyder 2002). D'autre part, il existe d'autres molécules de la famille de Nedd pouvant réguler ENaC (KIAA0439), ainsi que d'autres molécules régulant Nedd4-2 (N4WBP5A). Nedd4 possède un domaine C2 sur la zone N-terminale, qui permet la redistribution de la molécule à la membrane par l'ancrage aux phospholipides, suite à une augmentation du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (Plant et al. 1997). De même, le domaine C2 peut s'associer à l'annexine XIIIb d'une façon dépendante du calcium. Fortement présente dans les rafts, l'annexine XIIIb y recrute Nedd4 (Rotin 2000).

Niveau fonctionnel (activation, probabilité d'ouverture)

-1- La maturation de ENaC peut nécessiter un clivage protéolytique. Il semble que ce soit la famille des sérine-protéases à qui échoit ce rôle. Une sérine-protéase, CAP1 (channel-activating protease) a été clonée par l'équipe du Dr Rossier en 1997. Elle est présente dans le poumon (Yu et al. 1995). Il a été déterminé que la forme humaine de CAP1 serait la prostasine (Donaldson et al. 2002). Co-exprimée avec ENaC, elle augmente le courant sodium amiloride-sensible (Vallet et al. 1997). Subséquemment il est montré *in vitro* et *in vivo* que cette famille de protéines régule le transport de sodium amiloride-sensible mais aussi la clairance alvéolaire qui dépend du courant sodique (Planes et al. 2005). Il semble que cette régulation se fasse par l'augmentation de la probabilité d'ouverture (P_o) (Adebamiro et al. 2005 ; Caldwell et al. 2004 ; Donaldson et al. 2002). CAP1 est localisé à la membrane apicale par son ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol), son site catalytique (activité de clivage protéolytique) se trouve alors du côté extracellulaire, permettant une régulation de ENaC. En l'absence de l'ancre GPI, non seulement la protéine n'est plus présente à la membrane, mais aussi le courant amiloride-sensible est très faible, montrant ainsi l'importance de la co-localisation de ces deux protéines à la membrane (Vallet et al. 2002). D'autre part, la mutation du site catalytique de CAP1-prostasin

n'inhibe étonnamment pas totalement l'activation de ENaC (courant amiloride-sensible) (Vallet et al. 2002). On ne sait pas par quel mécanisme CAP1 agit sur ENaC, pour l'activer.

-2- Les catécholamines, dont la dopamine active le courant sodium, dans les AT II, en augmentant l'activité de la NaKATPase et indépendamment, la Po de ENaC. Cet effet passe par l'activation des protéines G couplées au récepteur dopaminergique D1, puis de l'adénylate cyclase, qui permet la formation d'AMPc. Par la suite l'AMPc induit, par différents mécanismes (Src, Rap1, MEK), l'augmentation de l'activité de la PI₃K qui va produire du PIP₃, molécule connue pour accroître l'activité de ENaC (Helms et al. 2006a). Dans les AT I la dopamine augmente l'activité des canaux ENaC, en utilisant les récepteurs dopaminergiques D1 (Helms et al. 2006b). La dopamine peut aussi utiliser les récepteurs β1-adrénergique pour agir.

L'adrénaline, quant à elle, se lie aux récepteurs adrénergiques. Elle agit à un niveau transcriptionnel comme nous l'avons vu plus haut. En activant les récepteurs β₂ adrénergiques, elle permet aussi l'augmentation du niveau intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique ((AMPc)_i) (Goodman et al. 1984). L'AMPc est capable d'agir à d'autres niveaux dont la stimulation de la translocation de vésicules contenant ENaC à la membrane par la PKA (Snyder 2000 ; Thomas et al. 2004) (= niveau post-traductionnel : transport à la membrane), l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal par la PKA (Senyk et al. 1995), la stimulation de la conductance (Lazrak and Matalon 2003), l'augmentation du transport de sodium par l'activation des canaux sodium apicaux (Matalon et al. 1996), ou encore l'augmentation, *via* la PKA et Nedd4-2 et/ou la PKA et SGK, de l'activité de ENaC (Mies et al. 2007 ; Senyk et al. 1995).

Comme exemple de mécanisme en chaîne, il semble que l'activation des récepteurs β-adrénergiques, implique une activation de la PKA, suite à l'augmentation de la concentration d'(AMPc)_i. La PKA serait nécessaire à l'accroissement du nombre de canaux HSC (augmentation du transport vésiculaire des sous-unités β et γ ENaC majoritairement (Planes et al. 2002)) parallèlement à une augmentation de [Ca²⁺]_i, qui elle induirait une amplification de la Po des NSC (non-selective cation channel) (Chen et al. 2002).

C Une pathologie : le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

Le SDRA est un syndrome qui se développe suite à diverses causes dont la pneumonie, une septicémie, un trauma sévère, etc.

1 Définition

Le SDRA est une forme très sévère de défaillance pulmonaire aiguë, se caractérisant par la survenue d'une détresse respiratoire, plus exactement inspiratoire. Cette défaillance est consécutive à une augmentation de perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire, permettant la formation d'œdème, et par la présence à la surface des canaux aériens et des alvéoles pulmonaires, de membranes hyalines. Il s'agit d'un processus inflammatoire dont l'origine peut être pulmonaire ou extrapulmonaire.

2 Historique

Bien que connu depuis très longtemps, sous des dénominations différentes, le SDRA fut décrit pour la première fois en temps que tel par D.G. Ashbaugh en 1967 (Ashbaugh et al. 1967). En 1988 une équipe a déterminé 4 points permettant la reconnaissance de cette pathologie pour les cliniciens : -1- la pression positive de fin d'expiration, -2- la sévérité de l'hypoxémie (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), -3- le degré de compliance du poumon et -4- le degré d'infiltration lors de radiographies thoraciques (Murray et al. 1988). Une conférence de consensus américano-européenne a précisé en 1994 les critères de définition de ce syndrome (définition, classification, incidence de la pathologie) dont les 4 critères deviennent : -1- l'hypoxémie (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$), -2- la présence d'infiltrats floconeux bilatéraux à la radiographie du thorax, -3- un facteur de risque pour le développement du SDRA et -4- l'absence d'une insuffisance cardiaque ou une pression capillaire bloquée inférieure à $18\text{cm H}_2\text{O}$ (Figure 12 : (Ware and Matthay 2000)).

TABLE 1. DEFINITIONS OF THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME.*

REFERENCE	YEAR	DEFINITION OR CRITERIA	ADVANTAGES	DISADVANTAGES
Perry and Ashbaugh ³	1971	Severe dyspnea, tachypnea Cyanosis refractory to oxygen therapy Decreased pulmonary compliance Diffuse alveolar infiltrates on chest radiography Atelectasis, vascular congestion, hemorrhage, pulmonary edema, and hyaline membranes at autopsy	First description Summarizes clinical features well	Lacks specific criteria to identify patients systematically
Murray et al. ⁴	1988	Preexisting direct or indirect lung injury Mild-to-moderate or severe lung injury Nonpulmonary organ dysfunction	Includes 4-point lung-injury scoring system Specifies clinical cause of lung injury Includes consideration of the presence or absence of systemic disease	Lung-injury score not predictive of outcome Lacks specific criteria to exclude a diagnosis of cardiogenic pulmonary edema
Bernard et al. ⁵	1994	Acute onset Bilateral infiltrates on chest radiography Pulmonary-artery wedge pressure ≤ 18 mm Hg or the absence of clinical evidence of left atrial hypertension Acute lung injury considered to be present if $PaO_2:FiO_2$ is ≤ 300 Acute respiratory distress syndrome considered to be present if $PaO_2:FiO_2$ is ≤ 200	Simple, easy to use, especially in clinical trials Recognizes the spectrum of the clinical disorder	Does not specify cause Does not consider the presence or absence of multi-organ dysfunction Radiographic findings not specific

* PaO_2 denotes partial pressure of arterial oxygen, and FiO_2 fraction of inspired oxygen.

Figure 12 : Historique des définitions du SDRA (Ware and Matthay 2000)

3 Statistiques épidémiologiques

L'incidence du SDRA en Amérique du Nord est mal identifiée. Des études relativement anciennes indiquent un taux variant de 1,5 à 8,3 pour 100000 personnes (Thomsen and Morris 1995 ; Villar and Slutsky 1989 ; Webster et al. 1988). Des études plus récentes, utilisant les normes définies en 1994, amènent un taux pour 100000 personnes de 15,3 en Amérique du Nord (Arroliga et al. 2002), de 7,8 en Islande (Sigvaldason et al. 2006), de 23 en Espagne (Manzano et al. 2005), de 16 en Écosse (Hughes et al. 2003). Ces variations peuvent s'expliquer par la variation de la population entre chaque pays mais aussi par les critères d'inclusion/exclusion, qui malgré les nouvelles normes, ne sont peut-être pas les mêmes. De plus d'autres variations sont dues à l'âge : 4,6 à 73,9 pour 100000 personnes en fonction des tranches d'âge en Espagne (Manzano et al. 2005), et 3,2 pour 100000 personnes sur le groupe d'âge enfant-adolescent en Allemagne (Bindl et al. 2005). D'autres études montrent une incidence plus importante dans les unités de soins intensifs (ICU), de 6,3% au Brésil (Oliveira and Basille 2006), de 2% en Chine (Lu et al. 2004), de 8,1% en Écosse (Hughes et al. 2003), de 7,7 % en Argentine (Estenssoro et al. 2002).

Le taux de mortalité varie de 10,3% en ICU pour la Chine (Lu et al. 2004), à 53,1% en ICU pour l'Écosse (Hughes et al. 2003) ou encore 49,4% en ICU pour une étude paneuropéenne (Brun-Buisson et al. 2004). Cette variabilité pourrait être due aux critères d'inclusion/exclusion pas suffisamment précis, à une mauvaise évaluation des patients, à une meilleure/moins bonne prise en charge des patients selon le pays.

4 La pathophysiologie

Elle peut être décrite en 3 stades qui se chevauchent dans le temps (Berthiaume et al. 1999 ; Schwarz 2001 ; Ware and Matthay 2000).

Tout d'abord la phase aiguë ou exsudative. Il existe une controverse quant à l'ordre d'apparition : d'abord un infiltrat de neutrophiles dans les alvéoles et l'interstitium, puis la génération de lésions tissulaires (Fowler et al. 1987), ou l'inverse (Pugin et al. 1999 ; Weinacker and Vaszar 2001). Il est toutefois établi que cet infiltrat neutrophilique diffus est hémorragique. En effet l'épithélium et l'endothélium pulmonaires sont endommagés. Il est à noter que les dommages tissulaires peuvent être exacerbés par la ventilation mécanique et l'exposition prolongée à de hauts taux d'oxygène. D'autre part, la détérioration des tissus conduit à la formation d'un œdème riche en protéines, pouvant remplir les alvéoles pulmonaires (Pugin et al. 1999). De plus, l'équilibre de production des cytokines pro et anti-inflammatoires par les cellules inflammatoires (dont les neutrophiles), épithéliales et les fibroblastes, est rompu, tout comme l'équilibre des radicaux oxydants et molécules anti-oxydantes (voir § C.6 et (Lenz et al. 1999)). L'altération des AT II conduit à une diminution de la synthèse et du renouvellement du surfactant pulmonaire (Baker et al. 1999 ; Crim and Longmore 1995 ; Gregory et al. 1991). Les neutrophiles, par la synthèse d'élastase (Baker et al. 1999), induisent le clivage et donc l'inactivation de protéines du surfactant. Les radicaux oxydants ont le même effet (Seeger et al. 1993b) et des éléments du surfactant peuvent être incorporés à la structure des membranes hyalines (Seeger et al. 1993a). Ces quatre derniers aspects mènent à l'augmentation de la tension de surface des alvéoles et donc à leur collapsus. D'autre part, des dépôts de molécules de fibrinogène provenant de l'exsudat, forment un réseau de fibrine le long des parois alvéolaires endommagées (Idell et al. 1987a). La persistance de ces accumulations peut conduire à la formation de membranes hyalines. Ces différents éléments amènent à l'endommagement de

la barrière alvéolo-capillaire, induisant une diminution de la régulation des flux ioniques et aqueux, et des échanges gazeux. Ce stade dure environ 6 jours.

Chez certains patients, le SDRA se résout à ce stade, ne laissant pas de trace fonctionnelle du syndrome (Ware and Matthay 2001). En effet les AT II migrent à la surface des membranes hyalines et les transforment en tissu interstitiel, permettant le renouvellement de l'épithélium respiratoire (Geiser 2003).

Si le SDRA ne se résout pas, il se développe une phase dite subaiguë ou proliférative. Les dommages alvéolaires s'accroissent et consistent en une hyperplasie, métaplasie des pneumocytes II, une prolifération des myofibroblastes, des fibroblastes dans les septas interalvéolaires et les espaces alvéolaires, et des cellules endothéliales (Schwarz 2001).

Cette phase dure de 4 à 10 jours et peut commencer dès le 3^{ème} jour.

Une phase chronique ou fibrosante, constituée par l'accumulation d'éléments de la matrice extracellulaire et de fibroblastes, se met ensuite en place. Il y a une fibrose des zones interalvéolaires, alvéolo-capillaires, des alvéoles et des conduits alvéolaires (Tomashefski, Jr. 1990), mécanisme qui forme une barrière physique au niveau des parties collapsées, atelectatiques ou trop endommagées. Malheureusement ce tissu est incapable d'échanges gazeux. Cette période peut débuter dès les 36 premières heures et se poursuit pendant 3 à 4 semaines.

5 Les traitements en essai

Augmenter les capacités de l'épithélium pulmonaire à se régénérer, à diminuer le taux de stress oxydant, à accroître le taux de clairance de l'œdème alvéolaire sont les cibles premières pour travailler précocement sur le développement du SDRA.

Les agonistes des récepteurs β -adrénergiques ont été utilisés dans plusieurs modèles en lien avec le SDRA, *in vivo* et *in vitro*, testant ainsi leur capacité à amoindrir les dommages causés. Du point de vue de la réparation des lésions, il semble que l'isoprotérénol diminue la fermeture de plaies préalablement stimulée par l'EGF (epithelial growth factor), *in vitro* (Schnackenberg et al. 2006). Par contre les agonistes des récepteurs β -adrénergiques diminuent le stress oxydant créé par les neutrophiles (Kopprasch et al. 1997 ; O'Dowd et al. 2004), et stimule la clairance du fluide alvéolaire (Qiu et al. 2006 ; Sakuma et al. 2005). Des essais post-traumatiques chez les animaux ont encore besoin d'être faits pour connaître

l'utilité de ce type de molécules dans le ralentissement, l'arrêt, voir la régression du développement du SDRA.

Un autre type moléculaire, plus intensément étudié et très controversé, sont les glucocorticoïdes. Les modèles animaux démontrent leur efficacité lorsqu'utilisés en prétraitement (Held et al. 2001 ; Shu et al. 2007b ; Shu et al. 2007a). Le passage à l'homme fût moins concluant. Des études montrent que si certaines conditions ne sont pas réunies les corticostéroïdes augmentent les complications et le taux de mortalité (Steinberg et al. 2006). Il semble toutefois que certaines molécules, à certaines doses, données à un temps particulier, contrent le développement du SDRA. Par exemple ils aident à diminuer le temps de ventilation mécanique et temps de présence dans les unités de soins intensifs (Guglani et al. 2006 ; Koontz et al. 2006 ; Meduri et al. 2007). L'utilisation des glucocorticoïdes, lors d'études pré-cliniques, peut donc s'avérer utile afin d'assurer de meilleurs conditions de vie et/ou d'augmenter les chances de survies, d'une partie des patients SDRA (Meduri et al. 2005).

6 Le SDRA et les lésions épithéliales

Lorsque le SDRA se met en place, l'un des premiers évènements à avoir lieu, est la formation de lésions épithéliales. Leur réparation rapide est un facteur de bon pronostic de guérison du patient (Ware and Matthay 2000). En effet, certains patients suite au développement de ces lésions et à la création subséquente d'un œdème, recouvrent la santé (Ware and Matthay 2001). Pour d'autres leur persistance amène une réparation anormale des tissus lésés et la formation de fibrose. La réparation (migration, prolifération et différenciation) par les cellules progénitrices est donc un évènement dont une meilleure compréhension aiderait à l'arrêt du développement du SDRA. En 1997, le Dr Uhal s'intéresse aux phénomènes de multiplication et différenciation (et transdifférenciation) :

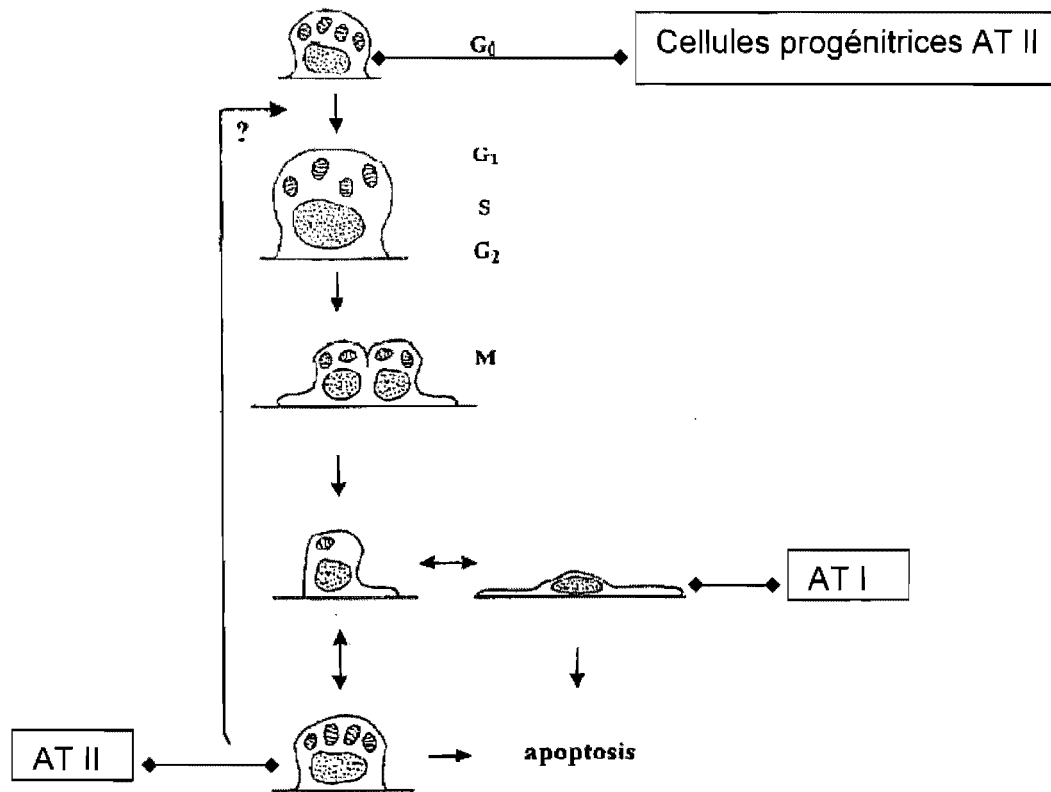


Figure 13 : Schéma de réparation d'un épithélium lésé d'après le Dr Uhal. La division des AT II conduit à la formation de cellules filles ayant différents phénotypes. L'un est la différenciation en AT I, qui est une différenciation terminale et est incapable de division. L'autre phénotype est celui des AT II qui reforme la population de cellules progénitrices initiale (Uhal 1997).

Il est à noter que la différenciation des cellules progénitrices en AT I, n'est pas dite définitive par toutes les équipes qui se sont penchées sur le sujet (Danto et al. 1995 ; Qiao et al. 2008).

En 1999, les Drs Berthiaume, Lesur et Dagenais ont rédigé à une revue de littérature portant sur l'ordre des événements de la réparation alvéolaire, ils produisent le schéma suivant :

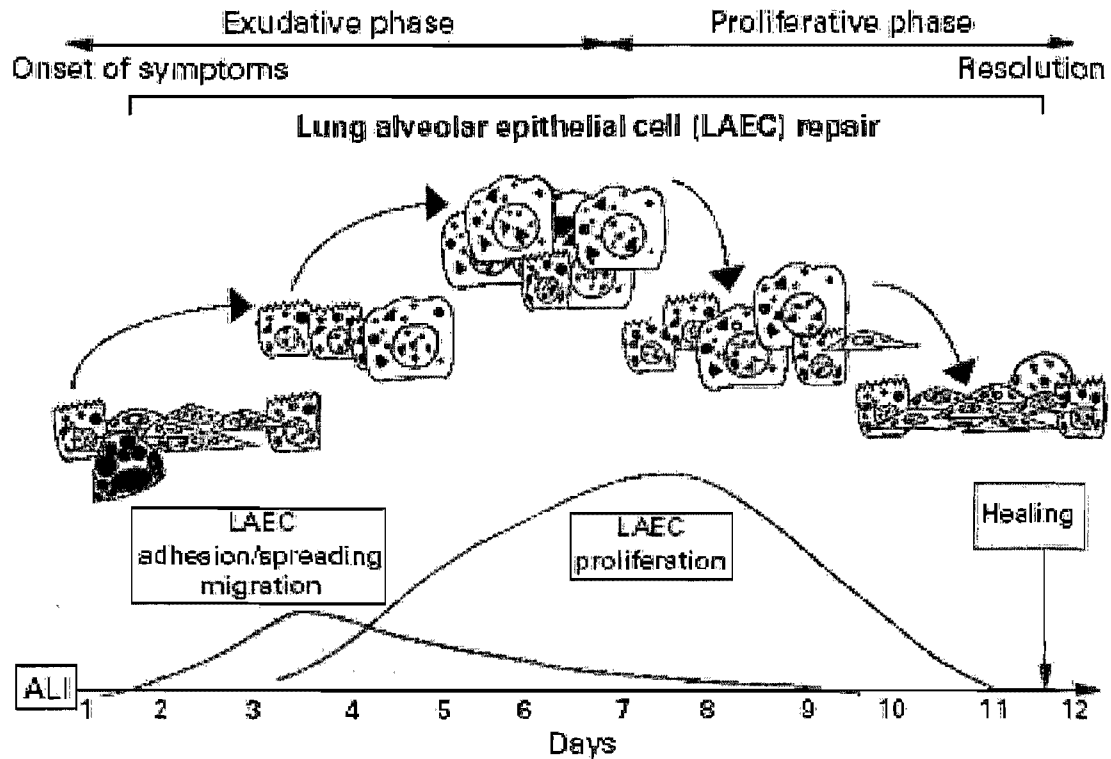


Figure 14 : Les différentes phases du processus de réparation des cellules alvéolaires. Le premier évènement à avoir lieu serait l'ensemble adhésion-dissémination-migration, puis aurait lieu la prolifération, avant la différenciation pour la réparation finale (Berthiaume et al. 1999).

Lors de lésions tissulaires, il existe des cellules dites progénitrices permettant la régénération du tissu en utilisant les mécanismes de réparation décrits ci-dessus. Dans le poumon l'origine de ces cellules est diverse. Dans la trachée et les bronches, ce sont les cellules basales (Hong et al. 2004), tandis que dans les bronchioles, c'est une sous-population des cellules de Clara (vCE cells) (Hong et al. 2001). Ces cellules semblent aussi à l'origine de la formation des AT II (Reynolds et al. 2004). Une subdivision de la population des AT II permet la régénération de l'épithélium alvéolaire, par la génération des AT I (Adamson and Bowden 1974b ; Reddy et al. 2004 ; Uhal 1997). Dans le SDRA, la prolifération, l'hyperplasie et l'apoptose des AT II semblent nécessaire à la réparation de la membrane alvéolo-capillaire, et permettent la normalisation de la clairance alvéolaire (Anderson and Thielen 1992 ; Fehrenbach et al. 1999 ; Tomashefski, Jr. 1990).

L'hyperplasie des AT II contribue probablement à l'augmentation de la clairance alvéolaire (Folkesson et al. 1998 ; Wang et al. 1999a).

Les cellules épithéliales alvéolaires jouent ainsi un rôle important dans la restauration de l'architecture normale des alvéoles et de la barrière alvéolo-capillaire, et la prévention de l'invasion de l'espace alvéolaire par les fibroblastes.

Les AT II sont stimulées dans ces activités par plusieurs facteurs de croissance, dont HGF (growth factor) et EGF. Dans le poumon, le HGF est produit par plusieurs types cellulaires: fibroblastes, cellules endothéliales, neutrophiles, macrophages. Le récepteur du HGF (ou c-met) est exprimé par les AT II suite à l'induction de lésions par la bléomycine (Douglas et al. 2002). Les AT II transcrivent EGF, le traduisent et conduisent son signal (Raaberg et al. 1992). L'expression du récepteur du EGF est augmentée dans le poumon et dans les AT II suite à l'induction de lésions par la bléomycine ou par du matériel infectieux (Madtes et al. 1994 ; Tesfaigzi et al. 1996). EGF agit via ses récepteurs erb1 et 2 (récepteurs à l'EGF) sur les cellules alvéolaires (Aida et al. 1994 ; Trinh et al. 2007 ; Vermeer et al. 2006). EGF et HGF participent à la réparation d'un épithélium alvéolaire lésé (Trinh et al. 2007 ; Zahm et al. 2000). Ils activent la réparation par les AT II d'un point de vue mitogénique (stimulation de la multiplication) (Adamson and Bakowska 1999 ; Mason et al. 1994 ; Nakamura 1994 ; Trinh et al. 2007), motogénique (stimulation de la migration) (Lesur et al. 1996 ; Nakamura 1994 ; Trinh et al. 2007 ; Zahm et al. 2000), et morphogénique (induction différenciation) (Nakamura 1994 ; Vermeer et al. 2006).

Les modèles animaux montrent un effet bénéfique du HGF, qu'il soit administré avant ou après l'agression pulmonaire. Par contre, chez le patient atteint de SDRA, la mortalité la plus élevée est observée chez les patients ayant les concentrations d'HGF les plus élevées dans l'alvéole (Stern et al. 2000). Le rôle des facteurs de croissance n'est donc pas encore clairement défini.

D'autres éléments sont aptes à stimuler les AT II dans leur rôle de reconstruction de l'épithélium alvéolaire, tel que l'interleukine (IL) 1 β (Geiser et al. 2000). D'autres encore participent à sa modulation, dont les protéases et les ROS sécrétés par les cellules inflammatoires, ainsi que des éléments de la matrice extracellulaire, et les canaux potassiques (Trinh et al. 2007).

La perte de l'intégrité physique du tissu pulmonaire induit la possibilité d'une infection et d'une septicémie, une augmentation de l'inflammation mais aussi une production anormale du surfactant, ainsi qu'une dérégulation du transport des ions et des fluides transcellulaires.

Or pour que l'œdème se résorbe, un transport actif de sodium de l'espace alvéolaire vers l'interstitium, conduisant des fluides, doit avoir lieu (Matthay and Wiener-Kronish 1990 ; Sznajder 1999) (voir § 3.7). Les mécanismes de réparation permettent la restauration de la production du surfactant (respiration sans collapsus des alvéoles) et du transport ionique-aqueux (élimination de l'œdème).

7 Le SDRA et le stress oxydant

Il existe plusieurs études qui laissent supputer l'importante implication des ROS lors du développement du SDRA. En effet, il a été montré que les patients SDRA sont porteurs d'une plus grande quantité de H_2O_2 dans leurs urines (Mathru et al. 1994) et dans l'air exhalé (Kietzmann et al. 1993). De plus une peroxydation lipidique (Kumar et al. 2000) et protéique (Lamb et al. 1999 ; Lenz et al. 1999) a été notée, ainsi qu'une diminution du taux de molécules anti-oxydantes dans le plasma (Metnitz et al. 1999) et dans le fluide alvéolaire (Pacht et al. 1991). Voir aussi revue Dr Chabot et al, 1998. Les ROS contiennent principalement le radical anionique superoxide ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) [Figure 15].

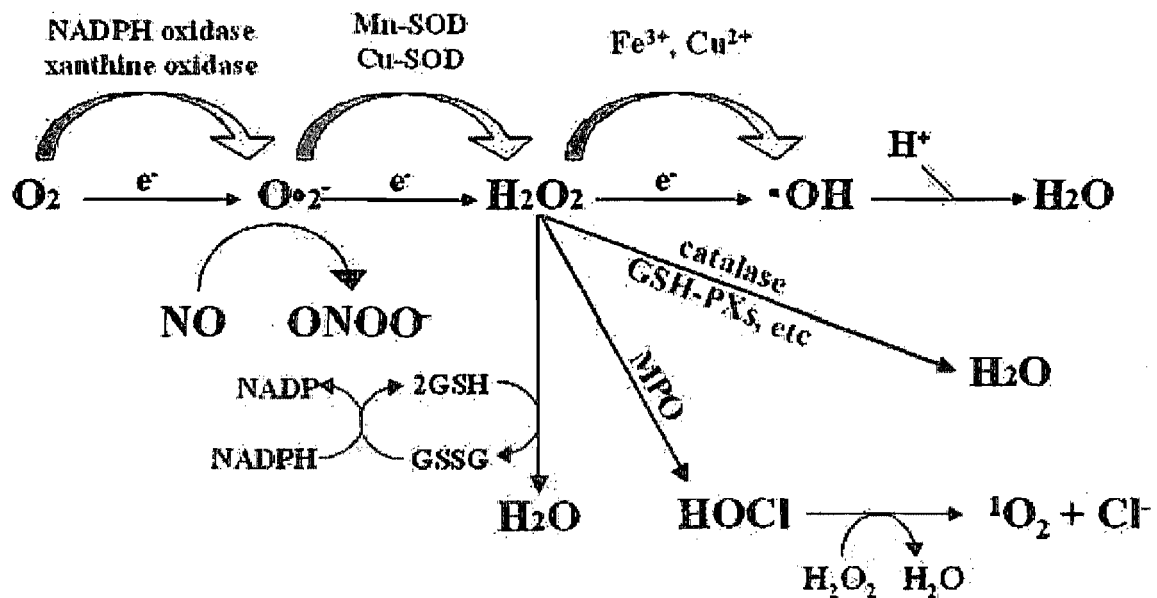


Figure 15 : La formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Tasaka et al 2008)

D'un point de vue moléculaire, les ROS vont induire le clivage de l'ADN nucléaire (Nakamura et al. 2000), altérer la structure protéique (DalleDonne et al. 1995) et modifier les lipides (Kumar et al. 2000). Par l'intermédiaire d'une cascade d'évènements indéterminés, les ROS vont conduire à l'activation de facteurs de transcription comme NF κ B et AP-1, augmentant la transcription de gènes pro-inflammatoires (Haddad et al. 2000). D'un point de vue cellulaire, les ROS augmentent la perméabilité endothéliale (Lum and Roebuck 2001), et l'hyperperméabilité de l'épithélium alvéolaire associée à une dérégulation du transport sodique (Kim and Suh 1993). *In vivo*, les oxydants diminuent la clairance alvéolaire (Modelska et al. 1999 ; Sakuma et al. 2000). Les cellules pouvant former ces ROS, sont les neutrophiles, monocytes et macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes et myocytes. Ils sont aussi créés par la chaîne respiratoire des mitochondries et des concentrations trop élevées de l'oxygène inhalé suite à une ventilation mécanique par exemple. Pour réguler les ROS et leurs effets destructeurs, le métabolisme cellulaire génère des antioxydants comme les superoxide dismutase, catalase et glutathione peroxidase (Freeman and Crapo 1982).

Plusieurs équipes mettent donc en évidence, dans le syndrome du SDRA, un déséquilibre oxydants / antioxydants, à la fois par une augmentation de la production de ROS (voir ci-dessus) et la diminution du taux d'antioxydants (Haddad et al. 2000 ; Metnitz et al. 1999).

D'autres études questionnent l'impact du stress oxydant sur les courants ioniques et les canaux, qui sont impliqués dans la clairance des fluides alvéolaires. Il ressort que selon le type de stress oxydant appliqué, les effets sont opposés. Ainsi une condition sub-léthale en oxygène induit l'augmentation de la synthèse de ARNm α ENaC *in vitro* et *in vivo*, augmentation de la protéine ENaC (Haskell et al. 1994 ; Yue et al. 1995), du nombre de canaux et de la probabilité d'ouverture (P_o), et du courant sodium amiloride-sensible (Haskell et al. 1994 ; Wang et al. 2000 ; Yue et al. 1995). Par contre en présence de H₂O₂, l'ARNm α ENaC est inhibé par la voie d'activation de ERK, qui ne pourrait alors plus induire la transcription *via* GRE (Wang et al. 2000).

8 Le SDRA et la clairance alvéolaire

Chez les patients atteints du SDRA, il est observé une corrélation inverse entre la capacité de clairance alvéolaire, et le temps de ventilation mécanique et la mortalité (Ware and Matthay 2000). Plusieurs études ont montré que la clairance alvéolaire permet l'élimination

de l'œdème, elle est conduite par des courants transépithéliaux de sodium (Matthay et al. 2002) et de chlore (Berthiaume et al. 1987 ; Fang et al. 2002 ; Lee et al. 2003b ; Matthay et al. 2005). En utilisant une approche inverse, l'équipe du Dr Matthay a montré que la présence d'un œdème (fluide alvéolaire de patients ALI (acute lung injury)) provoque la dérégulation du transport des fluides alvéolaires chez les AT II, et cela *via* la modulation de plusieurs canaux ioniques (ARNm et protéines de α ENaC, α 1NaKATPase, et CFTR) (Lee et al. 2007).

Une approche intéressante pour augmenter la résorption des œdèmes est la stimulation de la clairance des fluides alvéolaires par l'activation (quelque soit le niveau d'activation) de canaux ioniques participant à cette clairance. Les hormones glucocorticoïdes dont la dexaméthasone et l'aldostérone, stimulent la clairance alvéolaire par l'augmentation du transport de sodium, possiblement *via* ENaC, *in vivo* et *in vitro* (Folkesson et al. 2000 ; Sznajder 1999 ; Tchepichev et al. 1995) (voir p28).

D. Hypothèses et objectifs

Le SDRA est un syndrome qui se développe en trois phases. Dans la première l'épithélium alvéolaire est lésé, les AT I sont particulièrement touchées. Les lésions de l'épithélium alvéolaire brise l'intégrité de la barrière alvéolaire, mais aussi diminue le transport des ions. En réduisant l'absorption des fluides alvéolaires, la baisse de transport ionique, élève la probabilité de présence et de persistance d'un œdème. L'influx œdémateux est caractérisé par une concentration élevée en protéines (Pugin et al. 1999). A ce stade le syndrome peut se résoudre (Ware and Matthay 2001) ou perdurer. Il est à noter qu'une clairance des fluides alvéolaire faible est associée à un taux de mortalité plus élevé (Matthay 2002 ; Sakka et al. 2002). S'il perdure, il y a formation de membranes hyalines, puis apparition graduelle d'une fibrose intra-alvéolaire (Bachofen and Weibel 1982). Il est important de mieux comprendre les mécanismes de résorption de l'œdème pulmonaire et de réparation de l'épithélium alvéolaire, qui participent à la résolution du SDRA. Une fonctionnalité intacte de la barrière épithéliale est nécessaire à la résolution de l'œdème pulmonaire chez l'humain (Matthay and Wiener-Kronish 1990).

Plusieurs équipes ont souhaité mettre en place un modèle d'études du SDRA. Parmi elles, le modèle de la bléomycine permet la création d'un stress oxydant induisant des lésions épithéliales associées au développement d'un œdème, et à la mise en place de la fibrose (Shimabukuro et al. 2003). La perte de l'intégrité physique du tissu pulmonaire induit en outre la possibilité d'une infection et d'une septicémie, l'augmentation de l'inflammation et la production anormale du surfactant, mais aussi une dérégulation du transport des ions et des fluides transcellulaires (Matthay and Wiener-Kronish 1990 ; Sznajder 1999).

Nous avons donc reproduit un modèle murin qui, suite à l'instillation intra-trachéale de bléomycine, développe un œdème puis une fibrose (Bellet-Barthas et al. 1983 ; Karmouty-Quintana et al. 2007). La bléomycine est une molécule qui en induisant le clivage de l'ADN, conduit à la formation de radicaux oxydants. L'une des voies d'action de la bléomycine pourrait donc être l'inhibition de la clairance du fluide alvéolaire par le stress oxydant produit (Modelska et al. 1999 ; Sakuma et al. 2000). Ces animaux nous permettent d'étudier le développement de l'œdème pulmonaire par la technique dite « Wet/Dry ».

Les courants sodium et chlore sont impliqués dans la clairance des fluides alvéolaires (Fang et al. 2002 ; Jiang et al. 1998 ; Matthay et al. 2002), indispensable à l'élimination de

l'œdème, et le stress oxydant agit de plusieurs façons sur le courant sodique (DuVall et al. 1998 ; Heberlein et al. 2000 ; Hu et al. 1994 ; Wang et al. 2000 ; Yue et al. 1995). L'étude du transport ionique en condition normale et de stress oxydant (bléomycine) dans les alvéoles, augmente les connaissances nécessaires au développement de stratégies induisant l'élimination de l'œdème alvéolaire présent lors du SDRA. A cette fin, nous avons employé deux méthodes.

In vivo, nous avons utilisé des souris ENaC $-/-$ transgène +, autrement appelées ENaC $-/-$ Tg+. Ces animaux produits par l'équipe du Dr Hummler, sont KO (knock-out) pour le gène ENaC et « rescue » grâce à un transgène ENaC, localisé sur le chromosome X. Elles expriment plus faiblement le gène et la protéine ENaC dans le poumon (Hummler et al. 1997). L'utilisation de telles souris nous permet de mesurer l'importance du transport ionique *via* le canal ENaC dans la régulation du transport hydrosodé.

La deuxième méthode consiste en l'utilisation de AT II, *in vitro*. Les AT II sont des cellules pluripotentes, plus résistantes aux dommages, participant entre autre à la ré-épithélialisation des alvéoles et au transport des ions (Adamson and Bowden 1974a ; Adamson and Bowden 1974b ; Geiser 2003 ; Wang et al. 1999b). Elles nous permettent, dans des conditions normale et pathologique (bléomycine), de mesurer les courants totaux et amiloride-sensibles, transépithéliaux et apicaux à l'aide d'une chambre de type Ussing.

Les AT II étant fortement impliquées dans la reconstitution de l'épithélium alvéolaire, une meilleure compréhension des mécanismes de réparations des plaies (fermeture, migration, prolifération) dans des conditions normale et pathologique (bléomycine), participerait au déploiement de stratégies d'intérêt aidant à la ré-épithélialisation des alvéoles lésées au cours de diverses pathologies dont le SDRA.

Il existe de nombreuses voies d'activation du canal ENaC (voir p27), dont les corticoïdes. La dexaméthasone est une hormone glucocorticoïde de synthèse ayant un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Il a une puissance d'environ 40 fois celle du cortisol. De plus, il a été montré que la dexaméthasone augmente la clairance alvéolaire (Folkesson et al. 2000). D'autre part, la dexaméthasone est connue pour augmenter l'expression de α ENaC et le courant sodium amiloride-sensible *in vitro* (Champigny et al. 1994) et *in vivo* (Tchepichev et al. 1995). *In vivo*, la co-injection intra-péritonéale de la dexaméthasone sera donc utilisée afin de vérifier si l'on arrive à contrecarrer non seulement l'effet délétère de la bléomycine, mais aussi la faible expression de ENaC dans les souris Tg. *In vitro*, en pré-

traitement sur AT II, la dexaméthasone permettra de vérifier si l'on arrive à contrecarrer l'effet délétère de la bléomycine sur le courant et la réparation.

Notre hypothèse de travail est donc que le stress oxydant influencerait des mécanismes participant à la clairance des fluides alvéolaires et à la réparation de l'épithélium, lors de lésions pulmonaires.

Ma maîtrise a été régit par deux objectifs principaux :

- mon premier objectif a été d'évaluer l'importance du canal ENaC lors de la constitution de lésions épithéliales et d'œdème pulmonaire, suite à un stress oxydant, *in vivo* et *in vitro*.
- mon second objectif a été de déterminer l'influence du stress oxydant sur les processus de réparation épithéliale.

CHAPITRE 2

METHODOLOGIE



A. In vivo

1 Le modèle animal

Afin de déterminer le rôle du transport ionique, et en particulier du transport sodique par le canal ENaC, lors de la mise en place et de la persistance de l'œdème, une colonie de souris transgéniques a été développée. Cette lignée a été créée par le Dr Hummler (Hummler et al. 1997), à partir de la souche NMRI (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA). Les animaux dits transgéniques (Tg) sont «knock-out» (KO) pour le gène «alpha epithelium sodium channel» α ENaC (Hummler et al. 1996), et le transcrite du gène α ENaC, sous promoteur CMV (cytomegalovirus), a été ajouté sur le chromosome X, induisant une faible expression de ENaC (Hummler et al. 1997). Cette expression est suffisante pour permettre à l'animal de dépasser le seuil de létalité (40h) des souris KO. Ces animaux sont plus petits à la naissance, mais leur courbe de croissance est identique à celle des animaux sauvage (wild type ou WT) (Hummler et al. 1997).

2 Les modèles oxydants

2.1 Le modèle bléomycine

♦ La bléomycine a été isolée du champignon *Streptomyces verticillus* par le Dr Umezawa en 1965 (Umezawa 1965). C'est un antibiotique utilisé comme anti-tumoral dans le cadre de cancer testiculaire et de lymphome. Il a été déterminé qu'au delà d'une dose cumulative de 150mg par personne, à vie, (Sostman et al. 1977), la bléomycine entraîne le développement d'une fibrose pulmonaire (Jules-Elysee and White 1990) tant chez l'humain que chez la souris.

La bléomycine induit une réponse inflammatoire (lymphocytes et cellules plasmatiques), une nécrose des pneumocytes de type I (AT I), une hyperplasie des pneumocytes de type II (AT II), la mise en place de membranes hyalines, le développement d'une fibrose et le dépôt excessif de collagène. La bléomycine instillée intra-trachéalement est utilisée depuis 1979 afin de développer chez l'animal des lésions et une inflammation, associées à la mise en place d'un œdème alvéolaire, puis d'une fibrose pulmonaire (Thrall et al. 1979), mimant le développement de plusieurs pathologies dont le SDRA (Folkesson et al. 1998 ; Holley et al. 2007 ; Shimabukuro et al. 2003).

La bléomycine est formée de trois domaines : le domaine carbohydrate permet l'entrée dans la cellule, le domaine N-terminal permet la liaison aux métaux comme le fer et le cuivre, et le domaine C-terminal permet la liaison à l'ADN. Après son entrée dans la cellule la bléomycine forme un réactif oxydatif avec le fer et l'oxygène. Elle s'intercale alors dans la double-hélice d'ADN, provoquant des ruptures de la chaîne d'ADN (Kemsley et al. 2003) et la production de ROS (reactive oxygen species), qui peuvent conduire à l'apoptose *via* la voie mitochondriale (Lee et al. 2005 ; Wallach-Dayana et al. 2006). La bléomycine induit donc un stress oxydatif.

◆ La bléomycine (MaynePharma Canada Inc. ; 4U/kg poids de souris) a été instillée à 174 souris mâles de 7 à 9 semaines, de souche NMRI WT et NMRI Tg. La souris est anesthésiée avec un mélange 1% kétamine (100mg/ml) – 0,1% xylazine (20mg/ml) (0,1ml /10g de souris). Un otoscope modifié permet la visualisation des cordes vocales, qui ne seront alors pas endommagées lors de l'instillation. L'instillation est faite à l'aide de la seringue FMJ-250 high pressure (Penn-Century, Inc), 50µl de bléomycine ou de salin 0,9% (contrôle) sont administrés. Afin d'évaluer l'intensité des lésions provoquées par la bléomycine, les souris sont sacrifiées entre les jours 3 et 16.

2.2 Le modèle *thiourea*

◆ Le *thiourea* et les molécules dérivées, peuvent être le substrat d'enzymes oxygénantes comme les FMO (flavin-containing monooxygenases). Il se forme alors des acides sulféniques qui peuvent être convertis en acides sulfiniques, toujours par ajout d'oxygène. Les acides sulfiniques réagissent, de façon réversible, avec le GSH (glutathion), produisant du GSSG (glutathion disulfide) et régénérant la molécule de *thiourea* (Henderson et al. 2004). Cette déplétion du GSH intracellulaire peut conduire à la mise en place d'un stress oxydatif. Une autre forme de toxicité est la liaison de l'acide sulfénique avec les résidus cystéines de diverses protéines (Henderson et al. 2004).

◆ 34 souris ont été injectées intra-péritonéalement avec 150µl de *thiourea* (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) à 40mg/kg (poids de souris) ou 150µl de salin 0,9%. Afin de reproduire l'expérience faite par l'équipe du Dr Scherrer, une dose du traitement est injectée pour 4 ou 7h, puis les animaux sont euthanasiés (Egli et al. 2004).

3 Le modèle dexaméthasone

♦ Le dexaméthasone (dex) est un stéroïde cortico-surrénal synthétique. Il appartient à la famille des glucocorticoïdes ou corticostéroïdes, synthétisés par les glandes surrénales. Ils jouent un rôle inhibiteur sur les réponses inflammatoires, allergiques et immunitaires normales. Le dexaméthasone en se fixant aux récepteurs des glucocorticoïdes, permet leur dimérisation, leur translocation au noyau, puis leur fixation aux éléments GRE (glucocorticoid-responsive element), présents en 5' du promoteur de divers gènes. D'autre part, les hormones glucocorticoïdes, dont le dexaméthasone, peuvent stimuler la clairance alvéolaire en augmentant le transport de sodium (Folkesson et al. 2000 ; Sznajder 1999 ; Tchepichev et al. 1995), et modulent le courant Isc amiloride-sensible (Chow et al. 1999 ; Dagenais et al. 2001 ; Lin et al. 1999 ; Sayegh et al. 1999), impliquant probablement ENaC. Les glucocorticoïdes sont aussi aptes à agir précocement (augmentation du courant Isc amiloride-sensible) et tardivement (augmentation de l'ARNm de α ENaC) sur la régulation du canal ENaC (Chow et al. 1999 ; Dagenais et al. 2001 ; Sayegh et al. 1999). De plus, le stress oxydant et les glucocorticoïdes semblent montrer une possible imbrication de leurs effets sur le canal ENaC (Jovanovic et al. 2001; Guney et al. 2007a).

♦ 73 souris ont été injectées intra-péritonéalement avec 100 μ l de dexaméthasone (Sandoz Canada (Boucherville QC)) à 0,5mg/kg (poids de souris) ou 100 μ l de salin 0,9% (contrôle). Le traitement dure 7j, le dexaméthasone est injecté quotidiennement car il est éliminé en 24h.

4 Procédures générales, suivant les traitements aux animaux

4.1 Euthanasie et nécropsie

Quelque soit le traitement subit, la souris reçoit 0,2ml du mélange kétamine-xylozine pour chaque 10g (poids de souris) en injection intra-péritonéale, puis est installée en position dorsale. Une incision ventrale latérale est pratiquée, suivie d'une exsanguination par rupture de la veine cave abdominale. Suite à l'ouverture de la cage thoracique, le bloc cœur-poumons est prélevé. Les poumons droit et gauche sont alors séparés et déposés sur des contenants pré-pesés contenus dans une boîte humide (voir A.4.2 Wet to Dry).

4.2 Wet to Dry ou Mesure poids mouillé/poids sec

Le principe est de peser le poumon juste après la nécropsie (poids mouillé ou Wet), puis après 24h de séchage à 95°C (poids sec ou Dry), de façon à mesurer par le différentiel le volume d'œdème présent dans le poumon. Le calcul fait est : (poids mouillé – tare) / (poids sec – tare).

4.3 Mesure du poids

Chaque souris est pesée avant son traitement, afin de déterminer la dose de bléomycine à lui instiller et/ou les doses de *thiourea* ou dexaméthasone à injecter. Elle est ensuite pesée à la fin de son traitement. Ces mesures ont aussi permis la détermination de la prise ou perte de poids que subit l'animal.

4.4 Histologie

Après 9 jours de traitement les souris sont anesthésiées mortellement (voir § A.4.1). Elles sont installées en position dorsale. Une incision ventrale latérale est ensuite faite, suivie d'une exsanguination par coupure de la veine cave abdominale. Suite à l'ouverture de la cage thoracique, la trachée est canulée (aiguille 20G). De l'OCT (optimal cutting temperature ; # 4583 Tissue-Tek Sakura) dilué à 50% dans du salin (0,9%), est instillé dans les poumons sous une pression de 20cm d'H₂O. Les poumons sont ensuite enrobés d'OCT et congelés dans de l'azote liquide. Ils sont conservés à -80°C jusqu'au jour de coupe. Les coupes sont faites à l'IRIC (institut de recherche en immunologie et en cancérologie) de l'Université de Montréal. La coloration utilisée est de l'hématoxyline phloxine safran (HPS).

B. In vitro

1 Le modèle cellulaire

1.1 La chirurgie

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant de 175 à 200g, sont utilisés pour recueillir les cellules alvéolaires de type II (AT II) dont nous faisons la culture primaire. Les rats d'abord

anesthésiés par injection intra-péritonéale de Somnotol (40mg/kg), sont ouverts de l'abdomen au cou, et la veine cave abdominale est sectionnée pour une exsanguination. Suite à une thoracotomie, un écarteur est placé de façon à dégager un accès au bloc cœur-poumons. Une trachéotomie est ensuite faite parallèlement à une incision dans l'artère pulmonaire. L'accès à la trachée par un cathéter 18g permet l'insufflation d'air tandis que l'accès à l'artère pulmonaire permet l'injection de la solution II [voir annexe 1]. Ces deux actions menées dans le même temps permettent l'élimination du sang dans les poumons tout en empêchant l'atélectasie. Les oreillettes droite et gauche sont aussi incisées de façon à permettre l'élimination du sang. Ensuite le bloc cœur-poumons est prélevé, lié au cathéter, ce qui permet l'injection de 10ml de solution I [voir annexe 1], 10fois, et à chaque fois retirée pour éliminer le surfactant et les macrophages alvéolaires. L'élastase est injectée (1 x 1 ml x 1min et 3 x 1ml x 10 min pour 160U par rat), elle permet la digestion du tissu pulmonaire. Pendant ce temps le bloc cœur-poumons est maintenu dans un bain-marie à 37°C, dans une solution de SGGs (sodium glucose gentamycine septra).

1.2 Isolation des cellules AT II

Les poumons sont émincés dans 5ml de solution II (voir ci-dessus) additionnée de 806,45µM de DNase I pendant 5min. Les activités de l'élastase et de la DNase sont arrêtées par l'ajout de 5ml de SVF pur (sérum de veau fœtal ou foetal bovine serum (FBS)). La suspension cellulaire est ensuite mise sous agitation pendant 5min, puis filtrée à travers 2 gazes, puis deux filtres de 150µm, et de 30µm. Le filtrat est centrifugé pendant 10min à 800rpm, puis le culot est resuspendu dans du MEM [voir annexe 1]. Cette suspension cellulaire est distribuée dans 3 pétris de bactériologie recouverts d'IgG rat (Sigma # I-4131) et incubée de 30 à 60min dans un incubateur (5% CO₂, 37°C), de façon à éliminer les macrophages encore présents. Cette technique d'adhérence permet d'éliminer des macrophages (Dobbs et al. 1986). Le surnageant est ensuite récupéré et à nouveau centrifugé (10min à 800rpm). Le culot cellulaire est alors resuspendu du MEM additionné de 10% SVF et 367,9µM septra. Le comptage des cellules est fait à l'aide d'un hémacytomètre, et le taux de mortalité est évalué à l'aide d'une coloration au bleu trypan. La technique de purification cellulaire des AT II a été vérifiée plusieurs fois (Dobbs et al. 1986 ; Jones et al. 1982 ; Brochiero et al. 2004). Elle permet d'obtenir une pureté d'au moins 80% de pneumocytes II, nous ne l'avons re-testée à nouveau. Les AT II sont cultivées pendant les trois premiers jours en MEM + Septra + 10%SVF. Au jour 3, le

milieu est changé pour du MEM + 10% SVF. Les AT II sont utilisées au jour 4. Dans nos expériences, les AT II ne subissent pas de passage.

2 Les modèles oxydants

2.1 Le modèle bléomycine

◆ Comme décrit dans le § 1.1, la bléomycine forme un réactif oxydatif avec le fer et l'oxygène. Afin de se stabiliser, elle s'intercale dans la double-hélice d'ADN, provoquant des ruptures de la chaîne (Kemsley et al. 2003) et la production de ROS (reactive oxygen species). La bléomycine induit donc un stress oxydatif qui permet de reproduire *in vitro*, non seulement le stress oxydatif présent *in vivo*, mais aussi l'aspect lésionnel engendré par sa capacité apoptotique (voir section Résultats § C.1 et figure 29B : effet toxique lors des expériences de réparation).

◆ Une courbe dose-réponse de sensibilité à la bléomycine (12,5-25-50-100-150 mU/ml) dans le cadre d'une expérience de réparation épithéliale a été faite. Cela nous a permis de déterminer les valeurs seuils, pour l'effet de toxicité. Les concentrations de 50 ou 100mU/ml de bléomycine, à 24h, seront utilisées dans les expériences subséquentes (voir Résultats § C.1 et figure 29B).

2.2 Le modèle DMNQ

◆ Le DMNQ ou 2,3-dimethoxy-1,4-naphtoquinone interagit avec la chaîne respiratoire mitochondriale produisant des radicaux libres tel que l'O₂⁻, et le H₂O₂, et diminue la concentration intracellulaire de GSH (Ross et al. 1986 ; Dypbukt et al. 1990 ; Floreani and Carpenedo 1992). Le DMNQ (Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA)) détériore l'équilibre « redox » et induit un stress oxydatif qui peut conduire à l'induction de l'apoptose cellulaire.

◆ Une courbe dose-réponse de sensibilité au DMNQ (10-12,5-15µM) dans le cadre d'une expérience de réparation épithéliale a été faite. Cela nous a permis de déterminer une valeur seuil, pour l'effet de toxicité. Une concentration de 10µM de DMNQ, pendant 24h, sera utilisée dans les expériences de migration (voir Résultats § C.2). Dans les expériences de prolifération 2,5µM de DMNQ sera utilisé, pendant 24h, à cause de la faible densité cellulaire, qui les rend hyper-sensible à tout agent ajouté.

3 Le modèle dexaméthasone

♦ Comme décrit dans le § 1.3, le dexaméthasone (stéroïde cortico-surrénal synthétique) induit l'activation de gènes portant l'élément GRE en 5' de leur promoteur, comme c'est le cas des différentes sous-unités de ENaC.

♦ Le dexaméthasone est utilisé à 100nM car différentes équipes ont déterminé qu'à cette concentration, son action est maximale sur l'activation de la transcription et le courant amiloride-sensible (Champigny et al. 1994 ; Dagenais et al. 2006 ; Venkatesh and Katzberg 1997).

4 Procédures générales des travaux cellulaires

4.1 Mesure des courants impliqués dans la résorption œdémateuse (Ussing)

Les cellules AT II sontensemencées à J0 à raison de 4×10^6 cellules par filtre (4cm^2 , Costar 3412, Corning Life Sciences), dans du MEM + SVF + sepra. À J2 les cellules peuvent être pré-traitées avec du dexaméthasone à 100nM, côté apical, dans du MEM + SVF. À J3 les cellules sont traitées avec le DMNQ à 2,5 ou $10\mu\text{M}$, la bléomycine à 50 mU/ml et/ou le dexaméthasone à 100nM, côté apical, dans du MEM + SVF. Après 24h de traitement (48h de pré-traitement), à J4, les filtres sont déposés en chambre de Ussing, dans un gradient sodium (apical $[\text{Na}] = 141\text{mM}$ et basolatéral $[\text{Na}] = 25\text{mM}$), à 37°C . Le gradient sodium oblige les cellules à former un influx sodium (apical vers basolatéral). Pour étudier l'implication du courant amiloride-sensible dans le courant total, il est ajouté 10^{-5}M d'amiloride côté apical. Pour étudier le courant total ou amiloride-sensible, apicaux uniquement, la membrane basolatérale est perméabilisée avec de l'amphotéricine b à $7,5\mu\text{M}$. Le logiciel « Chart 5 » nous permet de suivre en direct l'application du potentiel de membrane (mV) et la lecture de la résistance (Ohm), puis suite à un traitements des données d'obtenir le courant (μA).

La chambre de Ussing a été développée par l'équipe du Dr H.H. Ussing en 1958. Cette chambre a été adaptée pour nos besoins et mise en place dans le laboratoire, par les Drs Berthiaume, Brochiero et Grygorczyk. Elle consiste en deux chambres, apicale et basolatérale, séparées par le filtre portant une monocouche cellulaire. Il est appliqué une différence de potentiel (U) de 0mV, qui permet, lorsque le voltage est clampé à 1mV de

façon intermittente, de mesurer la résistance (R) de la monocouche cellulaire en Ohm. Par la loi de Ohm ($U=R \times I$) il est alors possible de mesurer le courant de court-circuit (I_{sc}) en μA .

4.2 Mesure des processus de réparation épithéliale

4.2.1 Mesure de la réparation des plaies

À jour 0 (J0) les cellules AT II sontensemencées à 10^6 cellules dans un pétri de 35mm de diamètre dans 5ml de MEM + SVF + sepra. À J2, les cellules peuvent être pré-traitées si nécessaire. À J3 les AT II forment une monocouche cellulaire possédant des jonctions serrées (Cavanaugh, Jr. et al. 2001), des plaies y sont faites à l'aide d'une pointe de pipette de 10 μ l (Gilson). Le pétri est ensuite rincé avec du PBS, permettant l'élimination des cellules détachées. Le traitement peut alors être ajouté. Après 30min, une photo est prise de chaque plaie dans le milieu du pétri le long d'une ligne pré-tracée. À J4 et J5, soit 24 et 48h post-plaies, une nouvelle photo est prise au même endroit. La mesure de la fermeture de la plaie est faite à l'aide du calcul suivant : largeur de la plaie au temps X, divisé par largeur de la plaie au temps 30min, multiplié par 100. Cette technique a été mise au point dans la laboratoire du Dre Brochiero (Trinh et al. 2007).

Le pré-traitement fait à J2, est le dexaméthasone (100nM) dans du MEM + SVF. Les traitements sont la bléomycine à 12,5-25-50-100-150 mU/ml, le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) à 10-12,5-15 μ M et le dexaméthasone à 100nM dans du MEM + SVF. Les expériences sont réalisées en duplicata sur les cellules provenant de 8 rats différents.

4.2.2 Mesure de la migration

Les cellules AT II sontensemencées à J0 à raison de 8×10^6 cellules par flask de 25mm² dans 10ml de MEM + SVF + sepra. À J3 les cellules sont trypsinées (trypsine 0,05%), puis centrifugées 10min à 800rpm. Le culot est repris dans 2ml de MEM + SVF, puis comptées à l'hémacytomètre. La migration est mesurée à l'aide d'une chambre de type Boyden. Les cellules sont déposées sur des filtres transparents 33,6mm², pores de 8 μ m, préalablement enduits sur la face inférieure du filtre de gélatine 100 μ g/ml, à raison de 100000 cellules par 250 μ l MEM par filtre. Les cellules sont traitées en même temps qu'elles sontensemencées sur les filtres. Les traitements utilisés, sont la bléomycine à 25-50-100 mU/ml et le DMNQ à 10 μ M, dans du MEM seul. La migration est évaluée sur une période de 24h.

Donc à J4 ou J5 soit 24h ou 48h post-traitement, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4%, puis colorées au crystal violet (10mg + 8ml H₂O + 2ml méthanol). Les cellules ayant migré sur la face inférieure du filtre, peuvent être comptées au microscope, grossissement 40X (5 champs minimum).

Les expériences sont réalisées en duplicata sur les cellules provenant de 8 rats différents.

4.2.3 Mesure de la prolifération

La prolifération cellulaire est estimée à partir de la mesure d'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN des cellules en croissance.

Les cellules AT II sontensemencées à J0 à raison de 150000 cellules par puits de plaque de 12, en MEM + SVF + septra. À J2 les cellules peuvent être pré-traitées avec du dexaméthasone à 100nM, dans du MEM + SVF. À J3 les cellules sont traitées avec la bléomycine à 100 mU/ml, le DMNQ à 2,5µM et le dexaméthasone à 100nM, dans du MEM complet + SVF, en présence de thymidine ³H à 1µCi/ml.

À J4 soit après 24h d'incorporation de thymidine ³H, le milieu est éliminé, les cellules sont fixées 10min avec du TCA (trichloroacetic acid) 5%, puis rincées dans 3 bacs d'eau glacée, puis lysées avec du NaOH 0,1N. Seule la radioactivité internalisée est ainsi comptée (compteur à scintillation liquide (Liquid Scintillation Analyser Packard)), mesure des coups par minute (cpm)) pour chaque puits). Un dosage protéique est réalisé pour chaque puits, selon le protocole du fabricant du Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce), afin de normaliser nos expériences. Cette technique a été mise au point dans la laboratoire du Dre Brochiero (Trinh et al. 2007).

Les expériences sont réalisées en quadruple sur les cellules provenant de 8 rats différents.

C. Statistiques

Tous les résultats expérimentaux ont été analysés par le logiciel Stat View – ANOVA à l'aide des fonction t-tests – repeated mesures ANOVA et ANOVA Post Hoc Test. Une différence est dite significative lorsque le $p < 0,05$.

CHAPITRE 3

RESULTATS



A. Évaluation de l'importance du canal ENaC lors de l'évolution des lésions épithéliales et de l'œdème pulmonaire, suite à un stress oxydant, *in vivo*

Un stress oxydant élevé est une des caractéristiques des patients SDRA (Kietzmann et al. 1993 ; Kumar et al. 2000 ; Lamb et al. 1999 ; Lenz et al. 1999 ; Mathru et al. 1994 ; Metnitz et al. 1999 ; Pacht et al. 1991). Entre autre, le stress oxydant agit sur la régulation des courants ioniques impliqués dans la clairance des fluides alvéolaires (Haskell et al. 1994 ; Wang et al. 2000 ; Yue et al. 1995). Le stress oxydant induit aussi des lésions épithéliales pulmonaires (Hay et al. 1991). Le modèle de stress oxydant bléomycine utilisé *in vivo*, permet d'obtenir un modèle de la pathologie des patients SDRA (voir Méthodologie § A.2.1).

Le modèle animal choisi, est la souris. Nous utilisons des souris génétiquement modifiées pour le canal ENaC, afin de déterminer l'implication de ce canal dans l'évolution d'un œdème induit par un stress oxydant. Les souris ENaC $-/-$ Tg $+$ ont été créés par le Dre Hummler (Hummler et al. 1997) (voir Méthodologie § A.1).

Le Dr Hummler nous a fourni les souris de souche NMRI (Naval Medical Research Institute), de génotypes sauvage (WT) et ENaC $+/-$ Tg $+$. Des croisements ont été effectués pour obtenir les lignées WT et ENaC $-/-$ Tg $+$.

Une souris femelle ENaC $+/-$ Tg $+$ peut produire 4 types de gamètes :

ENaC $+$ (X)Tg $+$ ENaC $+$ (X)Tg $-$ ENaC $-$ (X)Tg $+$ ENaC $-$ (X)Tg $-$

Une souris mâle ENaC $+/-$ Tg $+$ peut produire 4 types de gamètes :

ENaC $+$ (X)Tg $+$ ENaC $+$ (Y)Tg $-$ ENaC $-$ (X)Tg $+$ ENaC $-$ (Y)Tg $-$

Lors de l'accouplement de ces souris, les croisements suivants peuvent avoir lieu :

mâle ENaC ^{+/-} Tg ⁺	femelle ENaC ^{+/-} Tg ⁺			
	Gamète	ENaC ⁺ (X)Tg ⁺	ENaC ⁺ (X)Tg ⁻	ENaC ⁻ (X)Tg ⁺
ENaC ⁺ (X)Tg ⁺	ENaC ^{+/+} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{+/+} (XX)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/-}
ENaC ⁺ (Y)Tg ⁻	ENaC ^{+/+} (XY)Tg ^{+/-}		ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{-/-}
ENaC ⁻ (X)Tg ⁺	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/-}	ENaC ^{-/-} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{-/-} (XX)Tg ^{+/-}
ENaC ⁻ (Y)Tg ⁻	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{-/-}	ENaC ^{-/-} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{-/-} (XY)Tg ^{-/-}

Figure 16 : Tableau de croisements des souris ENaC ^{+/-} Tg⁺

1/16^e des animaux pourra être WT (case verte ou ENaC^{+/+} Tg^{-/-}), 1/16^e des animaux décèdera dans les 40h suivant leur naissance (case rouge ou ENaC^{-/-} Tg^{-/-}) (Hummler et al. 1996) et 3/16^e des animaux seront porteurs de la délétion (KO) pour ENaC et d'au moins un copie du transgène (cases oranges ou ENaC^{-/-} Tg⁺).

Pour chacune des expériences décrites ci-dessous, 6 souris au minimum par génotype (WT et ENaC^{-/-} Tg⁺) et par condition auront été nécessaires.

Suite à l'utilisation de plusieurs techniques d'instillation intra-trachéale, nous avons choisi celle qui est indolore pour les souris. Elle consiste en l'anesthésie de l'animal, puis en l'instillation intra-trachéale par la bouche, à l'aide d'une seringue permettant une diffusion en aérosol de la solution choisie (voir Méthodologie §A.2.1).

1. Réponse à la bléomycine

Nous évaluons, tout d'abord, l'effet de la bléomycine sur la survie des souris WT et ENaC^{-/-} Tg⁺.

Les souris WT présentent un taux de mortalité de 100% à 10 jours, alors que les souris ENaC^{-/-} Tg⁺ commencent à mourir vers le 14^{ème} jour. Cela démontre une sensibilité plus grande des souris WT à la bléomycine, par rapport aux souris ENaC^{-/-} Tg⁺. [Figure 17]

Nous avons ensuite testé l'impact de la bléomycine sur le poids des souris WT et ENaC^{-/-} Tg⁺.

Les souris WT et ENaC^{-/-} Tg⁺ prennent du poids en condition contrôle, tandis qu'elles en perdent progressivement au fur et à mesure des jours, à la suite de l'instillation de la bléomycine ($p < 0,0001$).

Les comparaisons entre les deux groupes de souris sont faites entre 3 et 9 jours. En effet, les souris WT décèdent le 10ème jour d'incubation de la bléomycine. Il est important de noter que les souris WT perdent significativement plus de poids que les souris ENaC^{-/-} Tg⁺, entre 3 et 9 jours, en condition bléomycine ($p < 0,0001$). [Figure 18]

Les souris WT et ENaC^{-/-} Tg⁺ prennent du poids en condition contrôle, tandis qu'elles en perdent progressivement au fur et à mesure des jours, à la suite de l'instillation de la bléomycine ($p < 0,0001$).

Puis, nous avons estimé le développement de l'œdème chez les souris WT et ENaC^{-/-} Tg⁺.

Les comparaisons entre les souris WT et ENaC^{-/-} Tg⁺ se font aux jours 3 à 9, en raison de la mortalité des souris WT au jour 10. Il est important de savoir que le taux « Wet/Dry » sans instillat, varie entre 4,5 et 5 (Arensman et al. 1977 ; Hummler et al. 1997 ; Mansour et al. 1988).

En présence de solution saline [=ctl], entre les jours 3 et 9, les souris ENaC^{-/-} Tg⁺ présentent un taux « Wet/Dry » plus élevé que les souris WT ($p = 0,0002$). Par contre, si les deux groupes de souris développent un œdème significativement plus important en présence de bléomycine par rapport au salin ($p < 0,0001$), il n'y a pas de différence significative entre eux. Toutefois au 9ème jour, chez les souris ENaC^{-/-} Tg⁺ l'œdème continue d'augmenter, tandis qu'il diminue chez les souris WT ($p = 0,0054$). Alors que survient cette diminution de l'œdème chez les souris WT, elles décèdent quand même au

jour 10. De plus, chez les souris ENaC $-/-$ Tg+, en présence de bléomycine, l'œdème se résorbe graduellement après le jour 12. Puis il retourne à des valeurs proches du contrôle, au jour 16. Nous sommes surpris de constater que les souris ENaC $-/-$ Tg+, que l'on pensait plus sensibles au développement de l'œdème, à cause de la faible expression de ENaC, soient finalement plus résistantes. [Figure 19]

Finalement, nous avons observé l'histologie des poumons des souris 9 jours après l'instillation de solution saline ou de bléomycine. Les photos sont prises à un grossissement 125x et 500x, respectivement en haut et en bas.

Il est facile de constater qu'en présence de bléomycine, les alvéoles des souris WT présentent un infiltrat protéique, un infiltrat leucocytaire et un épaissement de l'interstitium, par rapport aux souris instillées à la solution saline. [Figure 20]

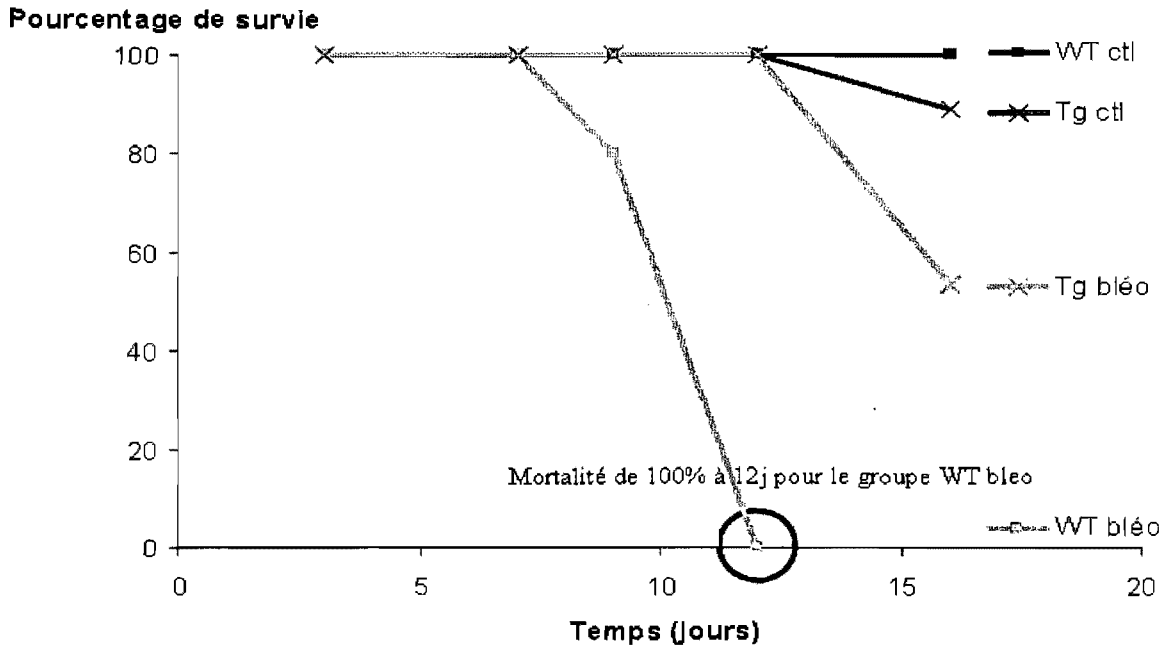


Figure 17 : Effet de la bléomycine sur la mortalité des souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$
 Les souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$ [= Tg] sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [= ctl] ou de la bléomycine (4U/kg) [= bleo] à J0, pour 3 à 16 jours. La survie est vérifiée au fur et à mesure de l'expérience. (n=2-15 par groupe).

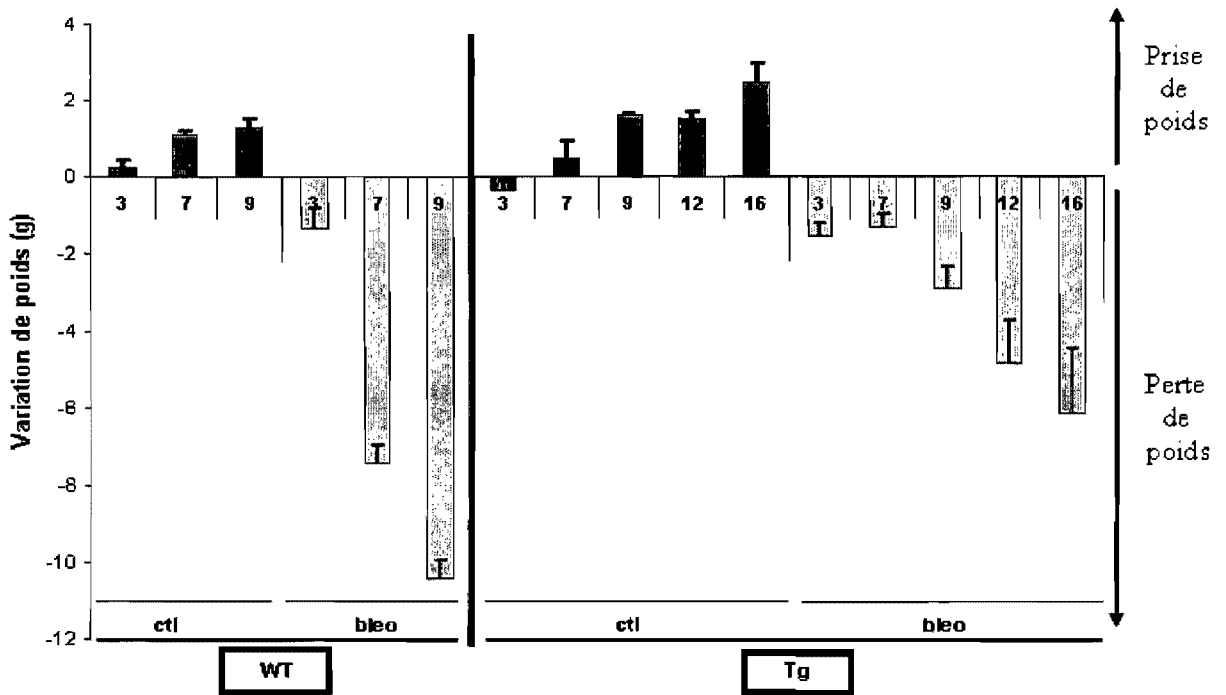


Figure 18 : Effet de la bléomycine sur la variation de poids chez les souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$

Les souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$ sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [= ctl] ou de la bléomycine (4U/kg) [= bleo] à J0, pour 3 à 16 jours. Le poids des souris est mesuré le jour de leur euthanasie. (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo ; n=6-15 par groupe).

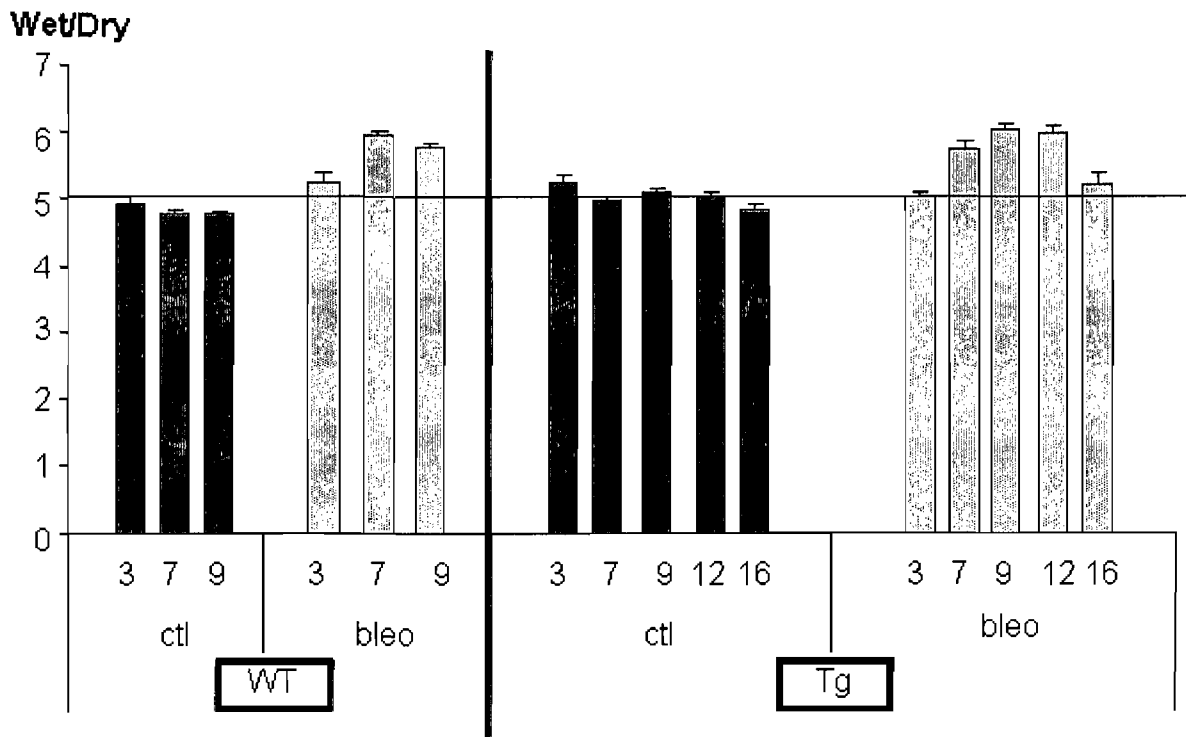


Figure 19 : Effet de la bléomycine sur le développement de l'œdème chez les souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$

Le ratio Wet/Dry (poids mouillé/poids sec) permet d'estimer le développement de l'œdème pulmonaire. Les souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$ sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [= ctl] ou de la bléomycine (4U/kg) [= bleo] à J0, pour 3 à 16 jours. Le poids des poumons post-nécropsie et après 24h à 95°C, est calculé, permettant d'évaluer le rapport Wet/Dry. (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo ; $n=6-9$ par groupe).

Souris WT

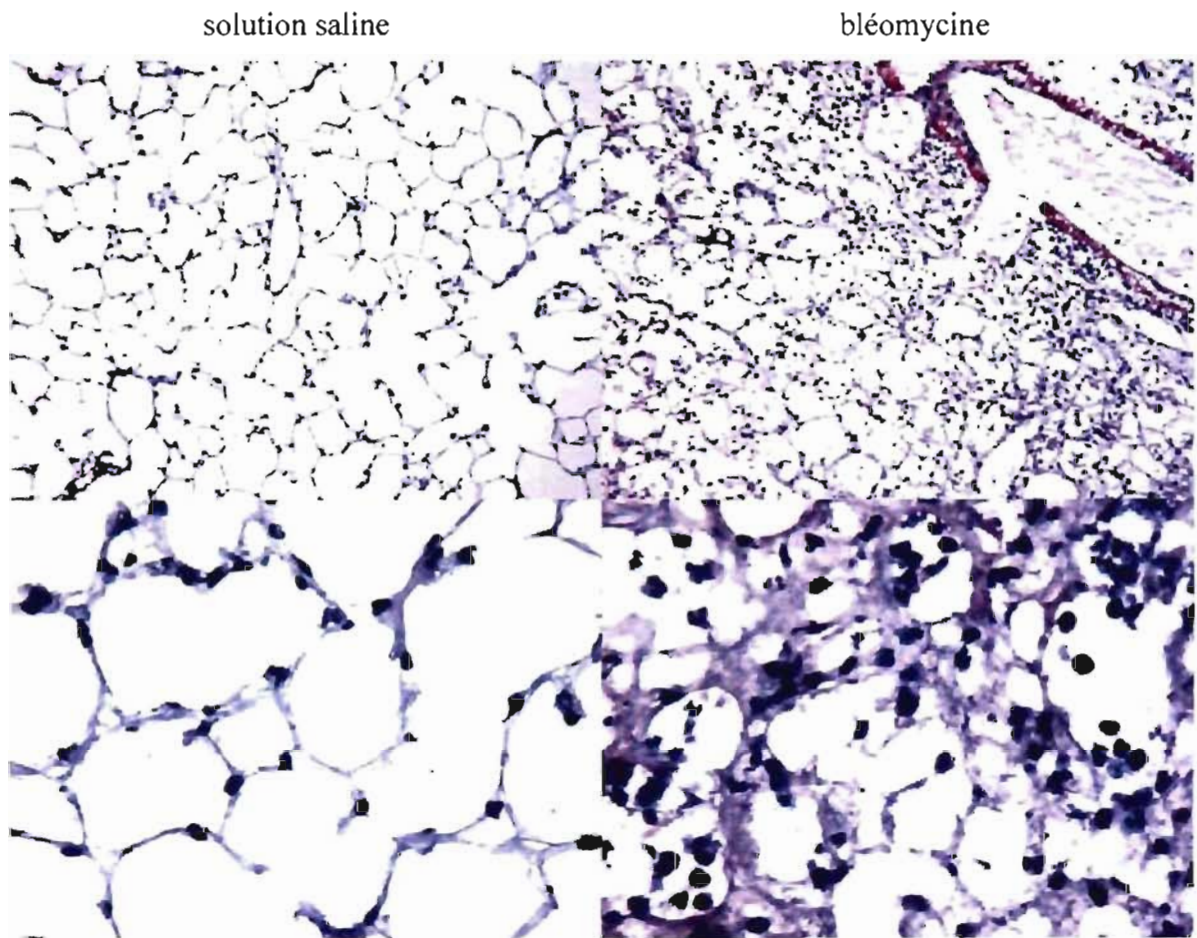


Figure 20 : Effet de la bléomycine sur l'histologie chez les souris WT

Les souris ont été instillées à J0 avec de la solution saline (0,9%) [= ctl], ou de la bléomycine (4U/kg) [= bleo]. Les animaux ont été euthanasiés par surdose d'anesthésique à J9. Les poumons ont été fixés à l'OCT (optimal cutting temperature), selon une pression de 20cm d'H₂O, et congelés dans de l'azote liquide. Les photos sont faites avec un grossissement 125x et 500x, respectivement en haut et en bas, à l'aide d'une coloration hematoxyline phloxine safran (HPS).

2. Réponse au thiourea

Au vu des résultats inattendus, observés en présence de bléomycine, nous avons décidé d'utiliser le *thiourea*. Il induit un stress oxydant à la mitochondrie et le développement d'un œdème pulmonaire par lésion de l'endothélium pulmonaire (Cunningham and Hurley 1972). Chez les souris ENaC^{-/-} Tg⁺, l'œdème causé par le *thiourea* semble plus important par rapport aux souris WT (Egli et al. 2004). Nous avons reproduit leur expériences, vérifiant ainsi si les profils oxydatifs du *thiourea* [= th.40] et de la bléomycine, induisent le même profil œdémateux.

En condition contrôle, les souris ENaC^{-/-} Tg⁺ développent globalement plus d'œdème, que les souris WT (p=0,03). D'autre part, les deux modèles de souris développent, en présence de *thiourea*, un œdème significativement plus important qu'en présence de solution saline (p<0,0001). De plus, nous constatons une persistance de l'œdème chez les souris ENaC^{-/-} Tg⁺, à 7h, par rapport aux souris WT (p=0,0036). [Figure 21]

3. Réponse à la dexaméthasone

Afin de moduler la résolution de l'œdème alvéolaire, nous avons utilisé la dexaméthasone. La dexaméthasone (dex) stimule la clairance par l'augmentation du transport de sodium, possiblement *via* ENaC (voir Méthodologie § A.3). L'effet de la dexaméthasone sur le développement œdémateux induit par la bléomycine est donc étudié.

Dans cette série d'expérience, lors de l'injection du salin [= ctl], les souris ENaC^{-/-} Tg⁺ développent plus d'œdème que les souris WT (p<0,0001). D'autre part, les souris WT développent plus d'œdème en condition bléomycine par rapport au contrôle (p<0,0001), tandis que le dexaméthasone n'a pas d'effet significatif (p=0,6261). Pour les souris ENaC^{-/-} Tg⁺, la présence de bléomycine n'influe pas sur le développement de l'œdème (i.e. non significativement différent du salin) (p=0,5723). Finalement, il est important de noter que ni les souris WT, ni les souris ENaC^{-/-} Tg⁺ ne montrent une diminution de l'œdème induit par la bléomycine, en présence de dexaméthasone (respectivement p=0,2383 et p=0,2268). [Figure 22]

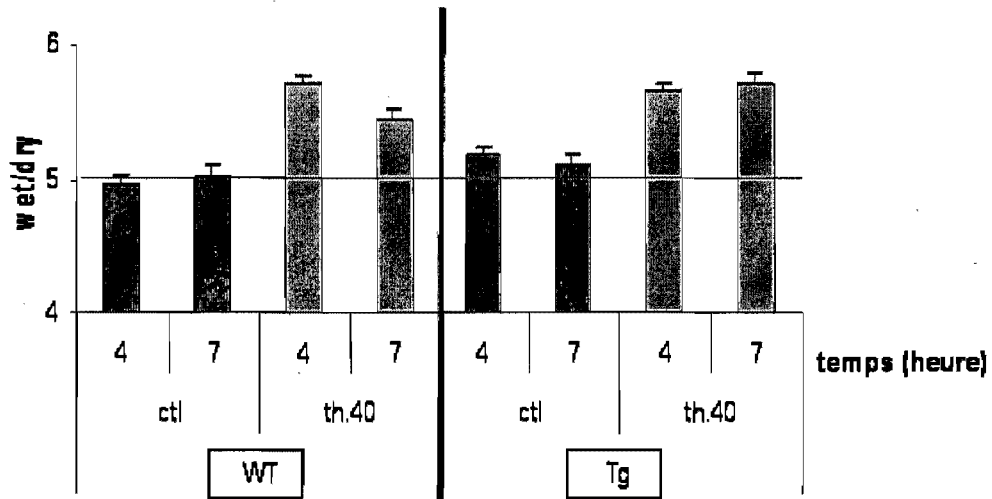


Figure 21 : Effet du thiourea sur le développement de l'œdème chez les souris WT et ENaC $-/-$ Tg+

Les souris WT et ENaC $-/-$ Tg+ sont injectées intra-péritonéalement avec une dose de salin (0,9%) [= ctl] ou de thiourea (40mg/kg) [= th.40] à J0. Elles sont euthanasiées après 4 ou 7h. Le poids des poumons post-nécropsie, et après 24h à 95°C, est mesuré, permettant de calculer le rapport Wet/Dry. (colonne noire = ctl, colonne grise = th.40 ; n=4-6 par groupe).

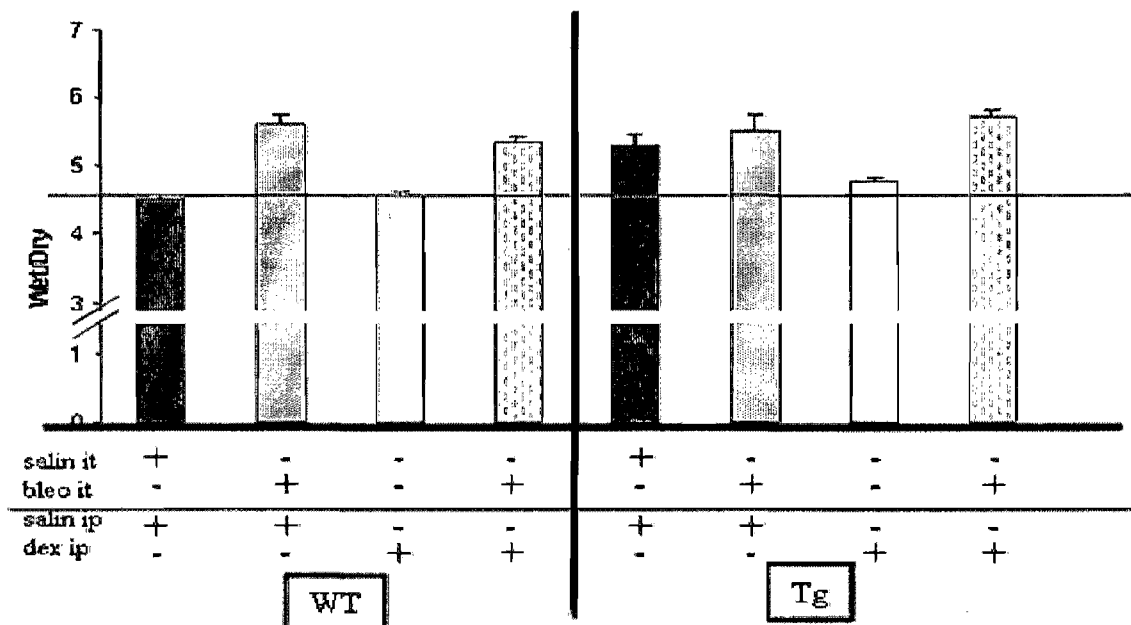


Figure 22 : Effet du dexaméthasone sur le développement de l'œdème, en présence ou non de bléomycine, chez les souris WT et ENaC $-/-$ Tg+, à 7j

Les souris WT et ENaC $-/-$ Tg+ sont instillées intra-trachéalement (it) à J0 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [= bleo]. Elles seront euthanasiées à J7. Elles sont, aussi à J0, injectées intra-péritonéalement (ip) avec du salin (0,9%) ou du dexamétasone (0,5mg/kg) [= dex], quotidiennement, pendant 7 jours. Le poids des poumons post-nécropsie et après 24h à 95°C, est calculé, permettant de mesurer le ration Wet/Dry. (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo, colonne blanche = dex, colonne blanche et grise = bleo dex ; n=5-9 par groupe).

B. Évaluation de l'importance du canal ENaC dans les transports ioniques dont dépend la clairance des fluides, suite à un stress oxydant, *in vitro*

Les patients SDRA montrent une augmentation du taux de stress oxydant. Or celui-ci modifie les courants ioniques impliqués dans la clairance des fluides alvéolaires (voir Introduction § C.7). Le modèle de stress oxydant bléomycine utilisé *in vivo*, permet de reprendre les caractéristiques du stress oxydant et de la pathologie des patients SDRA. Nous avons choisi d'utiliser cette même bléomycine afin d'évaluer l'effet de son profil oxydatif sur les courants ioniques, *in vitro*.

In vivo, en présence d'un stress oxydant, les AT I sont la cible principale des lésions et disparaissent (Geiser 2003). De plus, les cellules progénitrices, une sous-population des AT II, assument la réparation de l'épithélium et la clairance alvéolaire (Guidot et al. 2006). Nous avons donc utilisé les AT II comme modèle cellulaire. Nous les avons soumises à un stress oxydant afin d'évaluer l'influence de ce stress sur la régulation du courant, en particulier du canal ENaC.

1 Réponse à la bléomycine

Les cellules AT II sont cultivées sur un filtre poreux de 4 cm². Le filtre est déposé dans une chambre de Ussing à J4, afin de mesurer les courants sodium transépithélial et apical de court circuit. Des exemples sont montrés aux figures 23i et 23ii.

L'impact de la bléomycine, en présence d'un gradient sodium, est mesuré sur le courant transépithélial amiloride-sensible d'une part et sur le courant apical amiloride-sensible d'autre part. Dans le premier cas nous utilisons une monocouche intacte de AT II, dans le second une monocouche de AT II perméabilisée à l'amphotéricine B, en basolatéral.

Le traitement à la bléomycine ne modifie aucun des courants trans-épithéliaux et apicaux, totaux et amiloride-sensibles (respectivement $p=0,7338$, $p=0,3501$, $p=0,386$ et $p=0,8166$), par rapport aux conditions contrôles. [Figure 24]

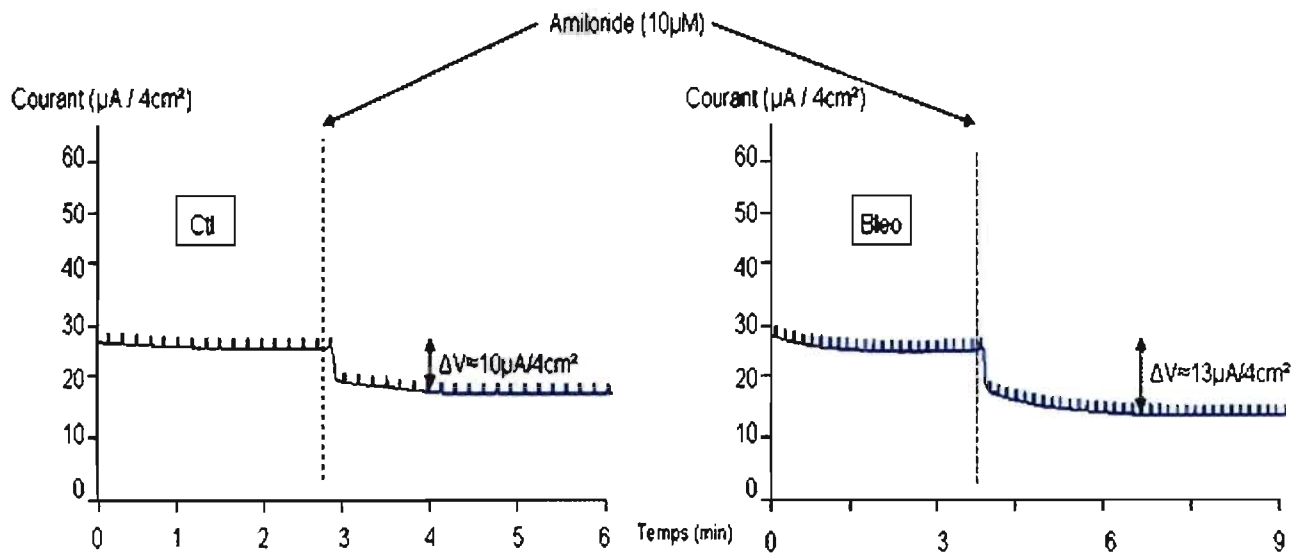


Figure 23 i : Exemple de courant sodium transépithélial en condition contrôlé et bléomycine (50mU/ml)

Le courant transépithélial est mesuré en présence d'un gradient sodium, puis suite à l'obtention d'un courant stable, la variation (Δ) du courant est mesurée avant et après l'ajout d'amiloride (10 μM).

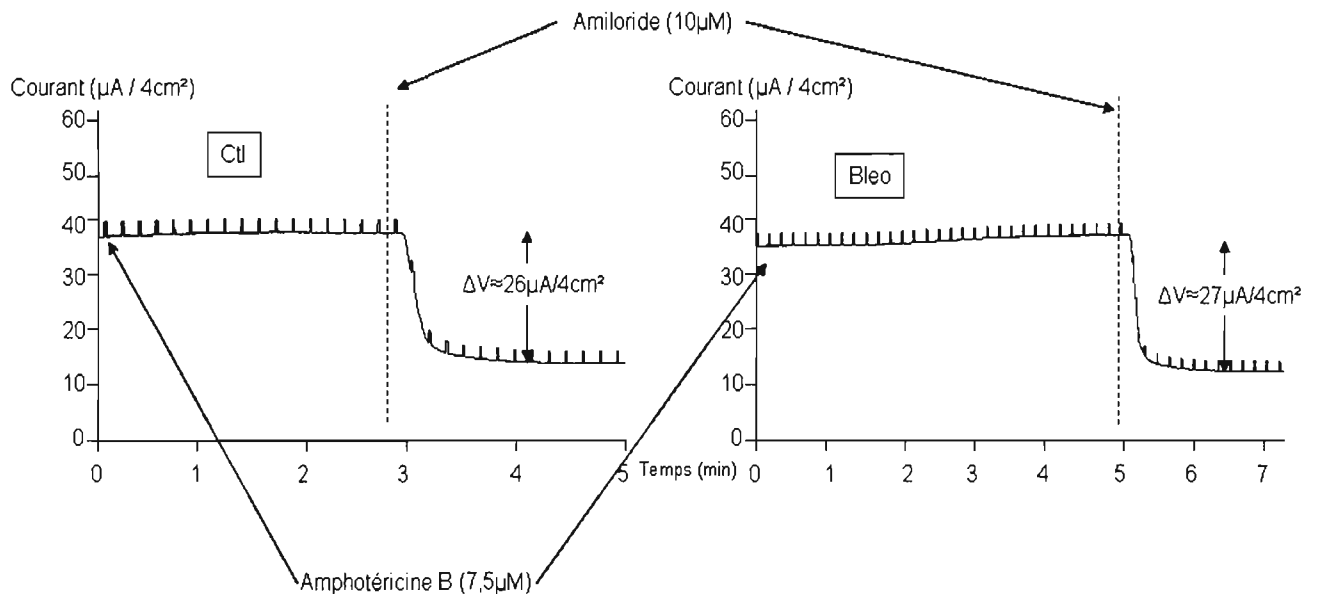


Figure 23 ii : Exemple de courant sodium apical en condition contrôlé et bléomycine (50mU/ml)

Le courant apical est mesuré en présence d'un gradient sodium et de l'amphotéricine B (7,5 μM) en baso-latéral, puis suite à l'obtention d'un courant stable la variation (Δ) du courant est mesurée avant et après l'ajout d'amiloride (10 μM).

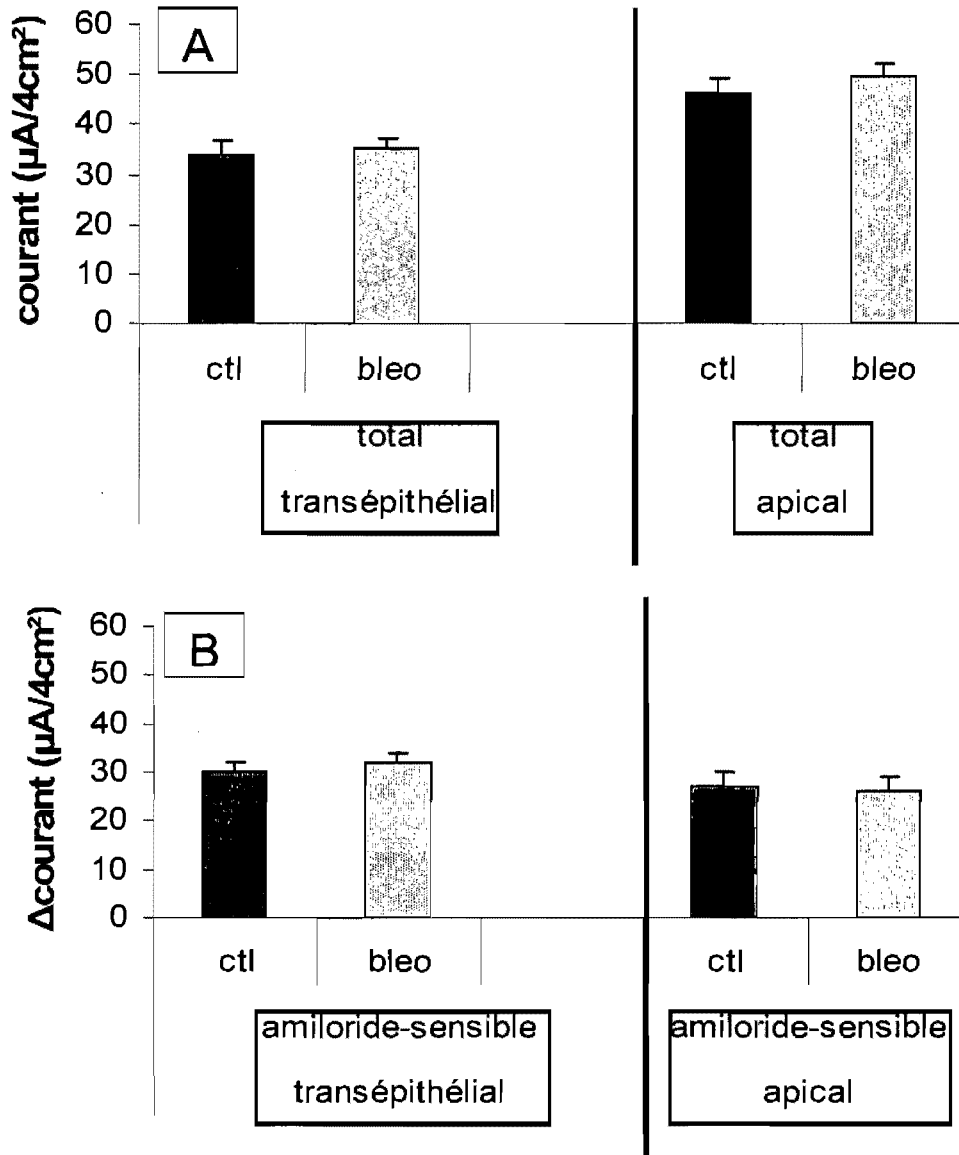


Figure 24 : Effet de la bléomycine sur (A) les courants transépithélial et apical totaux, et sur (B) la variation des courants transépithélial et apical amiloride-sensibles, chez les AT II

Les AT II, en culture primaire sur filtre, sont soumises ou non, à la présence de 50mM de bléomycine [= bleo] (apical), pour 24h. Les mesures sont faites en chambre de Ussing, comme reporté dans les figures 23 i et ii (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo ; $n=9-11$ par groupe).

2. Réponse au DMNQ

Le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) produit un stress oxydant dans la cellule (voir Méthodologie § B.2.2). L'utilisation de DMNQ nous permet d'évaluer l'effet d'un stress oxydant connu *in vitro* sur les courants chez les AT II, et de comparer le profil oxydatif obtenu avec celui de la bléomycine.

Le traitement DMNQ10 n'a pas d'effet significatif sur le courant transépithélial total ($p=0,2592$). Par contre, il diminue le courant apical total ($p=0,0446$) par rapport à la condition contrôle [= ctl]. D'autre part, il ne diminue pas significativement le courant amiloride-sensible transépithélial ($p=0,0942$). Par contre, il diminue le courant amiloride-sensible apical ($p=0,0004$), par rapport à des filtres non-traités [= ctl]. [Figure 25]

3. Réponse au dexaméthasone

Les glucocorticoïdes stimulent la clairance alvéolaire par l'augmentation du transport de sodium et modulent le courant I_{sc} amiloride-sensible. De plus, les effets du stress oxydant et des glucocorticoïdes semblent être imbriqués sur le canal ENaC (voir Méthodologie § A.3). Nous étudions donc l'impact du dexaméthasone, sur les courants produits par les AT II, en présence ou non de bléomycine.

Il est très net que la présence de dexaméthasone augmente les courants transépithélial et apical totaux et apical amiloride-sensible ($p=0,0009$, $p<0,0001$ et $p=0,0003$ respectivement) par rapport aux conditions contrôles. Par contre ce n'est pas le cas pour le courant transépithélial amiloride-sensible ($p=0,2715$). D'autre part, cette augmentation en présence de dexaméthasone et de bléomycine est aussi significative pour les courants transépithélial et apical totaux et apical amiloride-sensible, par rapport à la bléomycine ($p=0,0112$, $p=0,0023$ et $p=0,0002$). Par contre ce n'est pas le cas pour le courant transépithélial amiloride-sensible ($p=0,9189$). [Figure 26]

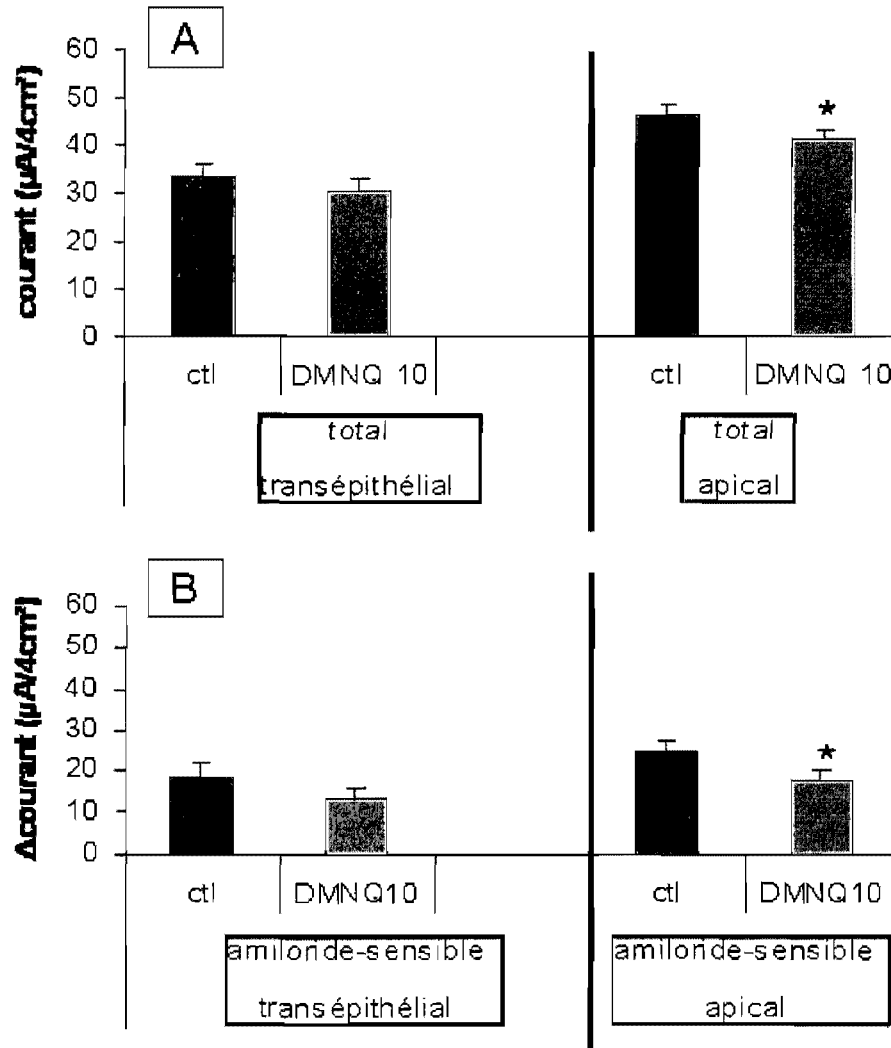


Figure 25 : Effet du DMNQ sur (A) les courants transépithélial et apical totaux, et sur (B) la variation des courants transépithélial et apical amiloride-sensibles, chez les AT II

Les AT II, en culture primaire sur filtre, sont soumises à la présence de 10 μM de DMNQ [= DMNQ10] (apical), pour 24h. Les mesures sont faites en chambre de Ussing. (colonne noire = ctl, colonne grise = DMNQ10 ; $n=8-9$ par groupe).

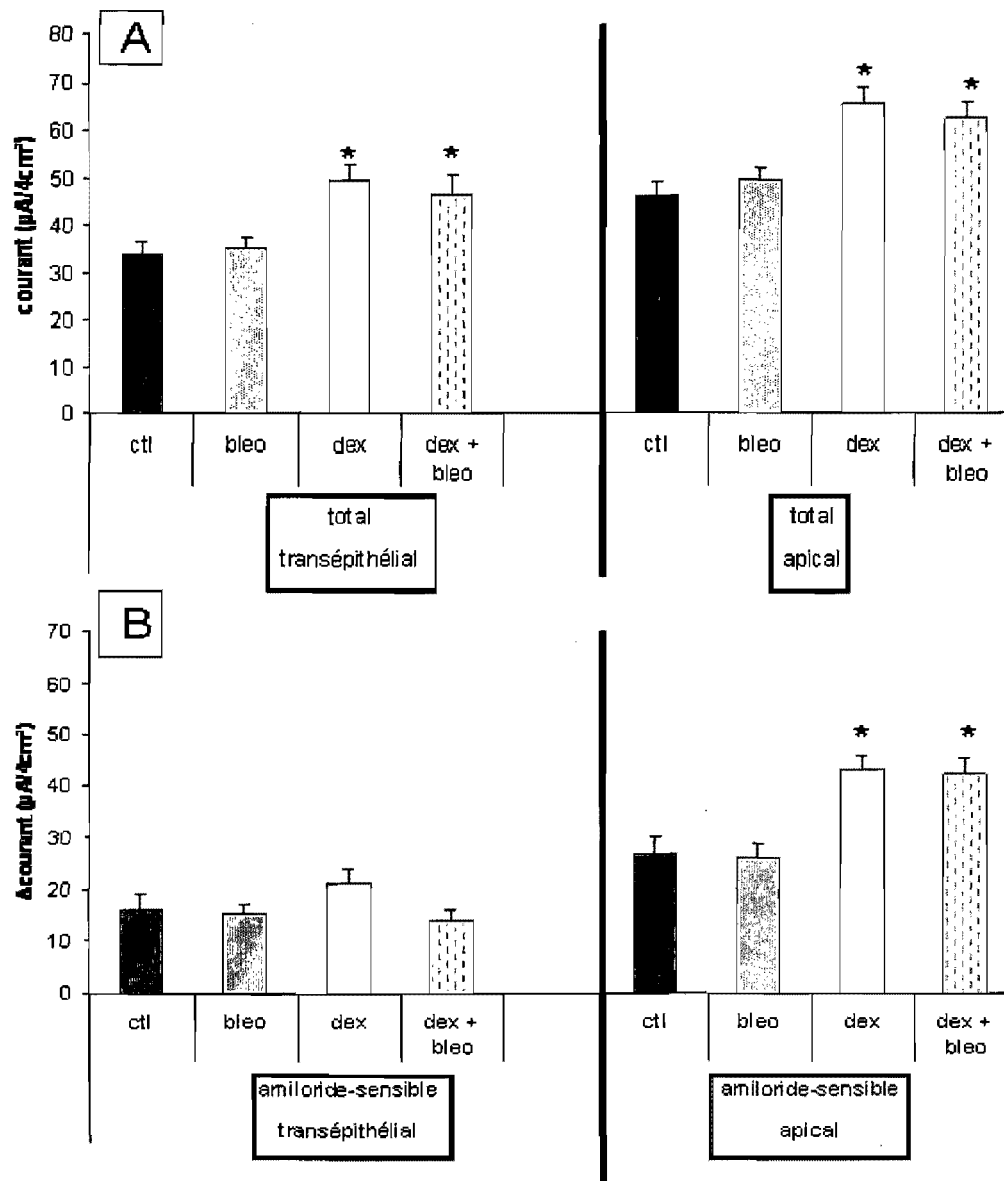


Figure 26 : Effet du dexaméthasone sur (A) les courants transépithélial et apical totaux et sur (B) la variation des courants transépithélial et apical amiloride-sensibles, en présence ou non de bléomycine, chez les AT II

Les AT II, en culture primaire sur filtre, sont traitées ou non avec 100nM de dexaméthasone [= dex] et/ou 50mU/ml de bléomycine [= bleo] (apical), pour 24h. Les mesures sont faites en chambre de Ussing (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo, colonne blanche = dex, colonne blanche et grise = bleo dex ; $n=9-11$ par groupe).

C. Évaluation de l'influence du stress oxydant sur les processus de réparation épithéliale, *in vitro*

Le SDRA est un syndrome dont l'une des étapes majeures est le développement de lésions pulmonaires (voir Introduction § C). Au niveau alvéolaire, les AT II ont la charge de restaurer l'architecture normale des alvéoles (voir Introduction § B.2.1).

D'autre part, les patients SDRA montrent une augmentation du taux de stress oxydant (voir Introduction § C.7). En présence d'un stress oxydant tel le H₂O₂, le taux de prolifération des AT II augmente, signe probable d'une phase de régénération (Sigaud et al. 2005). Le modèle de stress oxydant bléomycine, nous permet de reprendre les caractéristiques du stress oxydant présent chez nos souris *in vivo* et chez les patients SDRA (voir Méthodologie § A.2.1). La bléomycine qui induit des lésions épithéliales *in vivo*, suite à un stress oxydant (Hay et al. 1991), va-t-elle augmenter ou diminuer les processus de réparation *in vitro*?

1. Réponse à la bléomycine

Nous avons donc choisi d'étudier plusieurs des phénomènes de réparation des AT II en présence de bléomycine, dont la fermeture des plaies dans un premier temps. [Figures 27 et 28]

La bléomycine inhibe la fermeture des plaies de façon dose et temps dépendants ($p < 0,0001$). En effet, des doses croissantes de bléomycine ralentissent de façon graduelle la fermeture des plaies. Une dose de 50mU/ml devient toxique à partir de 48h, tandis qu'une dose de 150mU/ml est toxique dès 24h (i.e. la courbe s'infléchit vers le bas). De même chaque dose de bléomycine prévient la fermeture des plaies au fur et à mesure du temps. [Figure 29 B]

La réparation est composée de plusieurs mécanismes (voir Introduction § B.2.1 et C.6), dont la migration et la prolifération cellulaires. Nous étudions d'abord la migration des AT II en présence de différentes doses de bléomycine.

La bléomycine inhibe la migration de façon dose-dépendante ($p < 0,0001$). Cette inhibition n'est pas accentuée dans le temps pour aucune des doses de bléomycine. [Figure 30]

Nous nous penchons ensuite sur le mécanisme de prolifération des AT II, en présence de différentes doses de bléomycine.

Le taux d'incorporation de thymidine ^3H est maximal à la dose de 50mU/ml de bléomycine (i.e. $p(\text{bleo50 vs bleo100}) = 0,0679$), donc l'inhibition semble être maximale suite à l'ajout de 50mU/ml de bléomycine. La bléomycine inhibe la prolifération des AT II de 75% environ ($p < 0,0001$). [Figure 31]

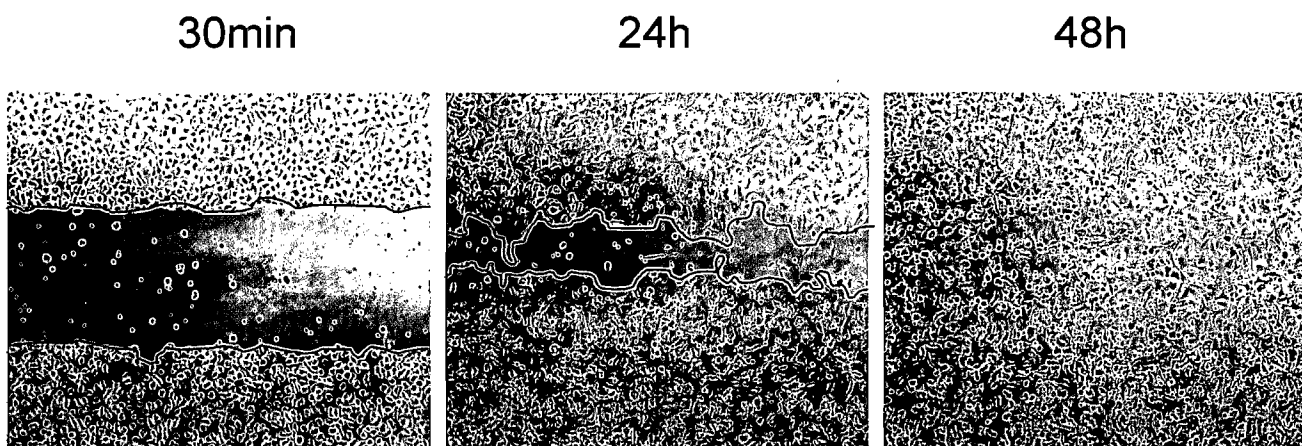


Figure 27 : Mise en place du modèle de fermeture de plaies sur une monocouche de AT II, en condition contrôlée, aux temps 30min, 24h et 48h

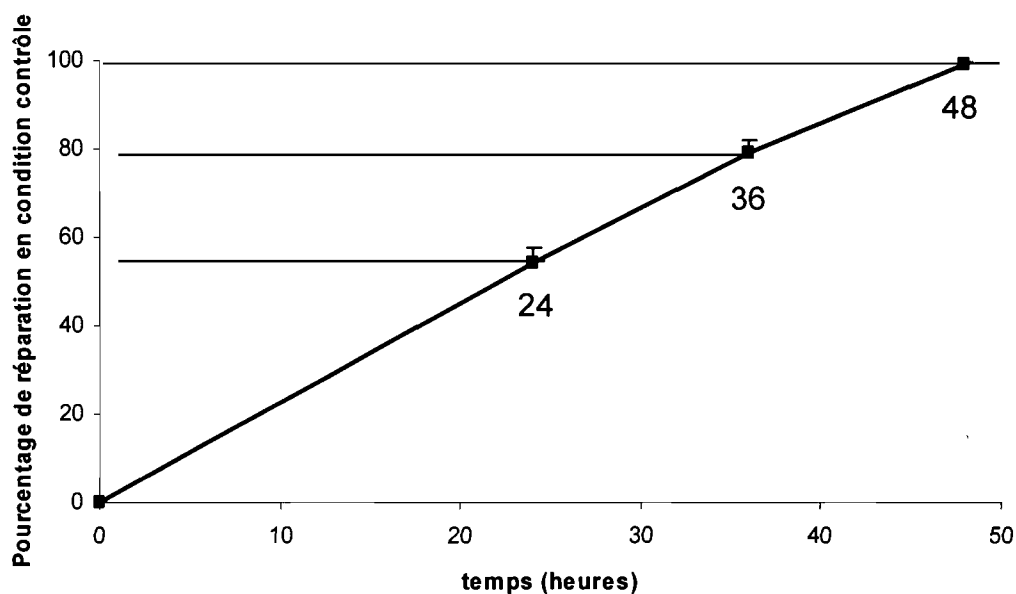


Figure 28 : Fermeture de plaies en condition contrôlée sur les AT II

À 24h, les cellules AT II ferment la plaie de 54%, et de 98% à 48h.

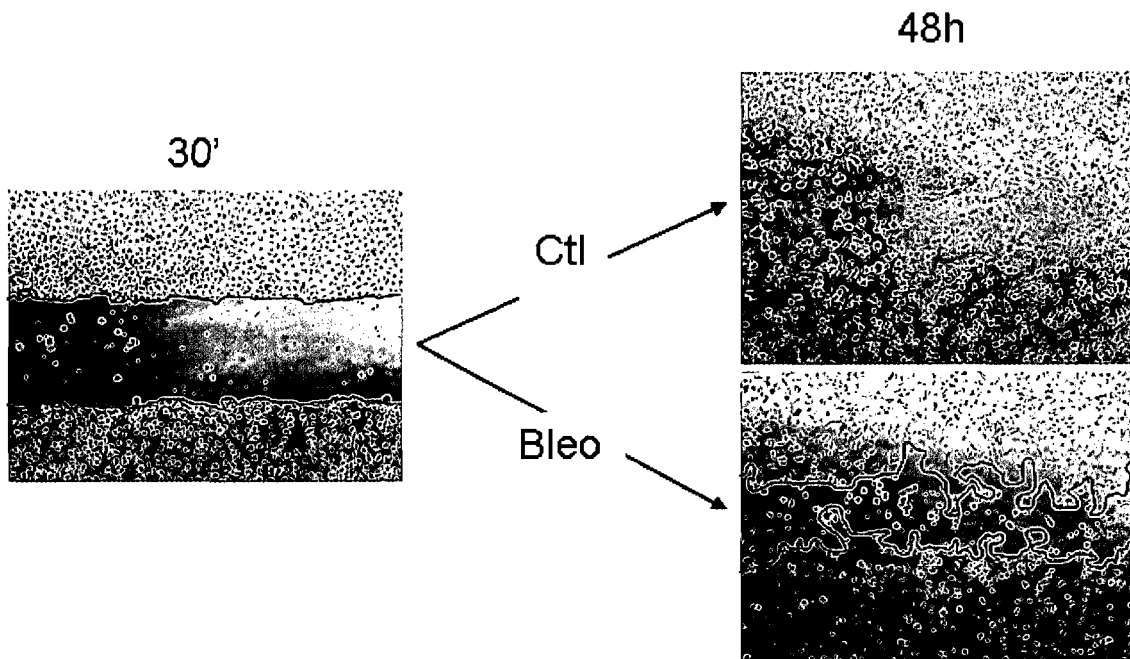


Figure 29 A : Effet de la bléomycine sur la fermeture de plaies, sur des AT II

Pourcentage de réparation

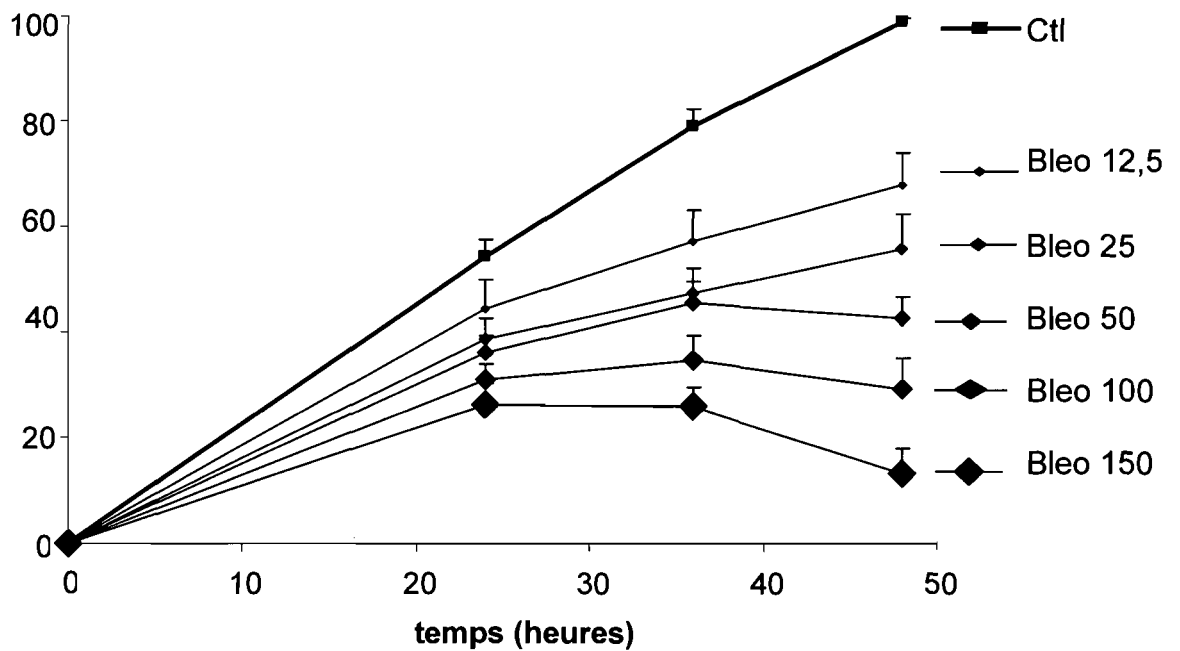


Figure 29 B : Effet de doses croissantes de bléomycine sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II

Une monocouche de AT II en culture primaire, a été lésée mécaniquement. Différentes doses de bléomycine [= bleo] ont été ajoutées au moment de la lésion (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 mU/ml). La réparation des plaies a été mesurée après 24, 36 et 48h ($n=8$ par groupe).

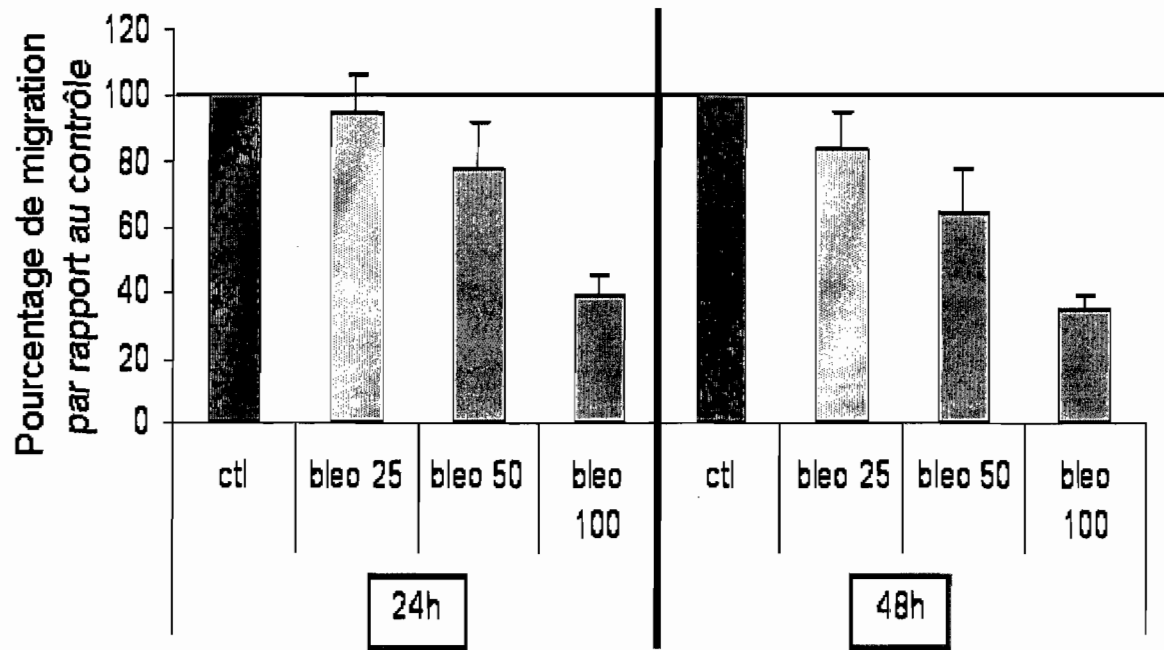


Figure 30 : Effet de la bléomycine sur la migration des AT II à 24 et 48h

Les AT II en culture primaire sont trypsinés, déposés dans une chambre de type Boyden (filtre, pores $8\mu\text{m}$), préalablement recouverts de gélatine sur la face inférieure. La migration est mesurée après 24 et 48h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [= ctl] et bléomycine [= bleo] (25 ; 50 ; $100\mu\text{U/ml}$). (colonne noire = ctl, colonne grise claire = bleo 25, colonne grise moyenne = bleo 50, colonne grise foncée = bleo 100 ; $n=8$ par groupe).

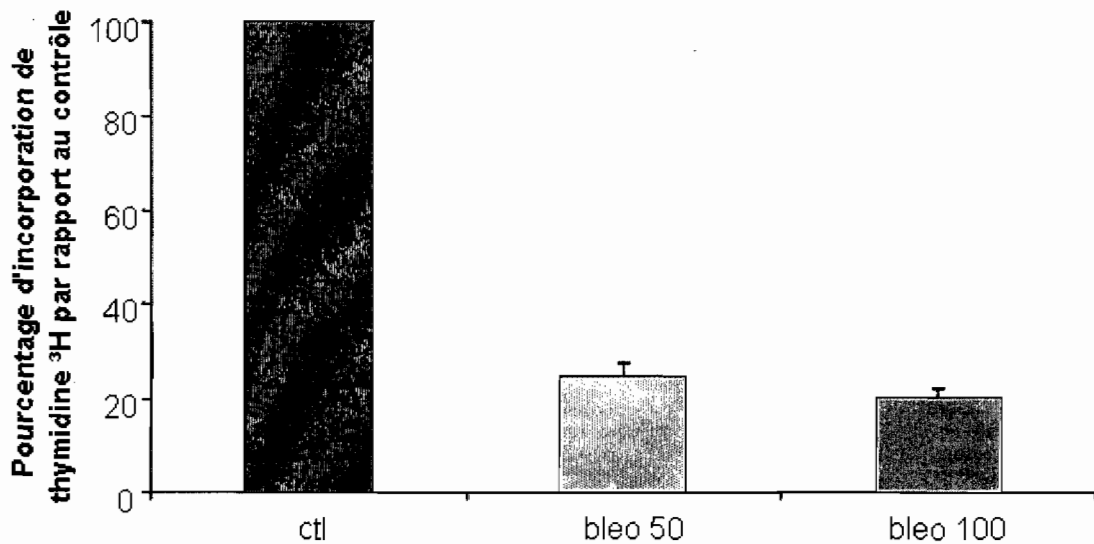


Figure 31 : Effet de la bléomycine sur la prolifération des AT II

La prolifération est estimée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans les AT II en culture primaire, sous-confluite. L'incorporation de thymidine ^3H est évaluée après 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [= ctl] et bléomycine [= bleo] (50 et $100\mu\text{U/ml}$). (colonne noire = ctl, colonne grise moyenne = bleo 50, colonne grise foncée = bleo 100 ; $n=14$ par groupe).

2. Réponse au DMNQ

Le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) produit un stress oxydant. Par la dérégulation de la chaîne respiratoire mitochondriale (voir Méthodologie § B.2.2). Le DMNQ nous permet de tester l'impact ce type de stress oxydant sur les mécanismes de réparation des AT II. Les doses croissantes de DMNQ ralentissent graduellement la fermeture des plaies. Une dose de 15 μ M est toxique dès 24h (i.e. la courbe s'infléchit vers le bas). D'autre part, chaque dose de DMNQ restreint la fermeture des plaies à mesure que le temps passe. Le DMNQ inhibe la fermeture des plaies de façon dose et temps dépendant ($p < 0,0001$). [Figure 32]

Comme pour l'étude des mécanismes de réparation en présence de bléomycine, nous évaluons ensuite les mécanismes de migration. Cette étude se fait en présence d'une dose de 10 μ M de DMNQ, choisie pour son effet inhibiteur sans toxicité (voir Figure 32).

Le pourcentage d'inhibition de la migration par le DMNQ à 10 μ M est maximal dès 24h (i.e. p (DMNQ10 24h vs DMNQ10 48h) non significatif). Le DMNQ inhibe la migration de 90% environ ($p < 0,0001$). [Figure 33]

Nous étudions ensuite sur le mécanisme de prolifération des AT II, en présence d'une dose de 2,5 μ M de DMNQ. En effet, les cellules AT II pour l'expérience de prolifération doivent être utilisées en condition sous-confluente, cela les rend très sensible aux agents ajoutés. Une dose de 10 μ M induit une mortalité de quasiment 100%.

Le DMNQ, à une dose de 2,5 μ M, qui a pas ou peu d'effet cytotoxique, inhibe la prolifération des AT II de 85% environ ($p < 0,0001$). [Figure 34]

Pourcentage de réparation

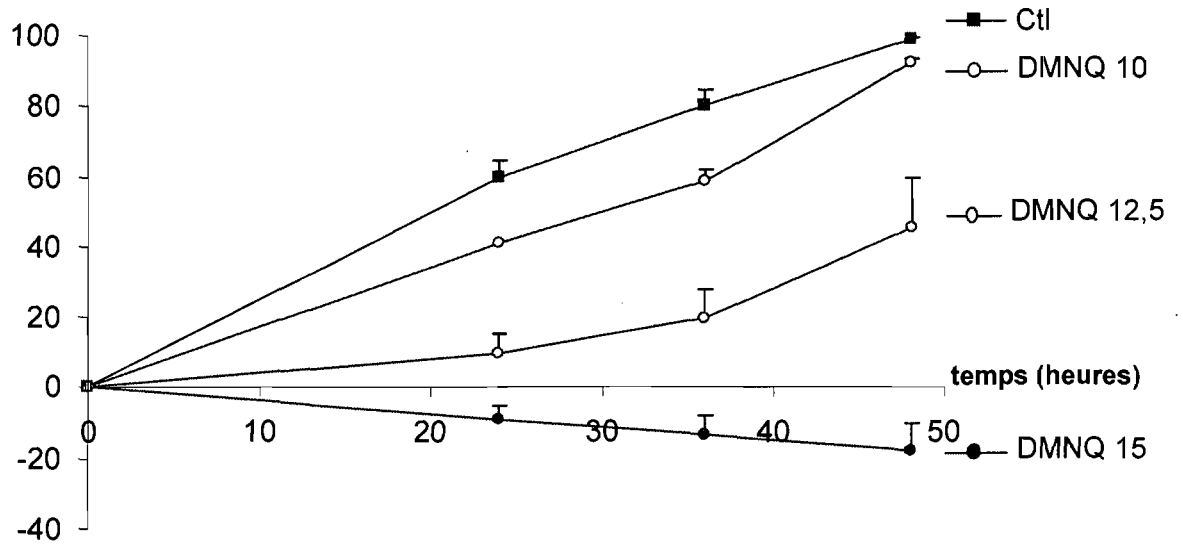


Figure 32 : Effet de doses croissantes de DMNQ sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II

Une monocouche de AT II en culture primaire, a été lésée mécaniquement. Différentes doses de DMNQ ont été ajoutées au moment de la lésion (10 ; 12,5 ; 15 μ M). La réparation des plaies a été mesurée après 24, 36 et 48h (n=5 par groupe).

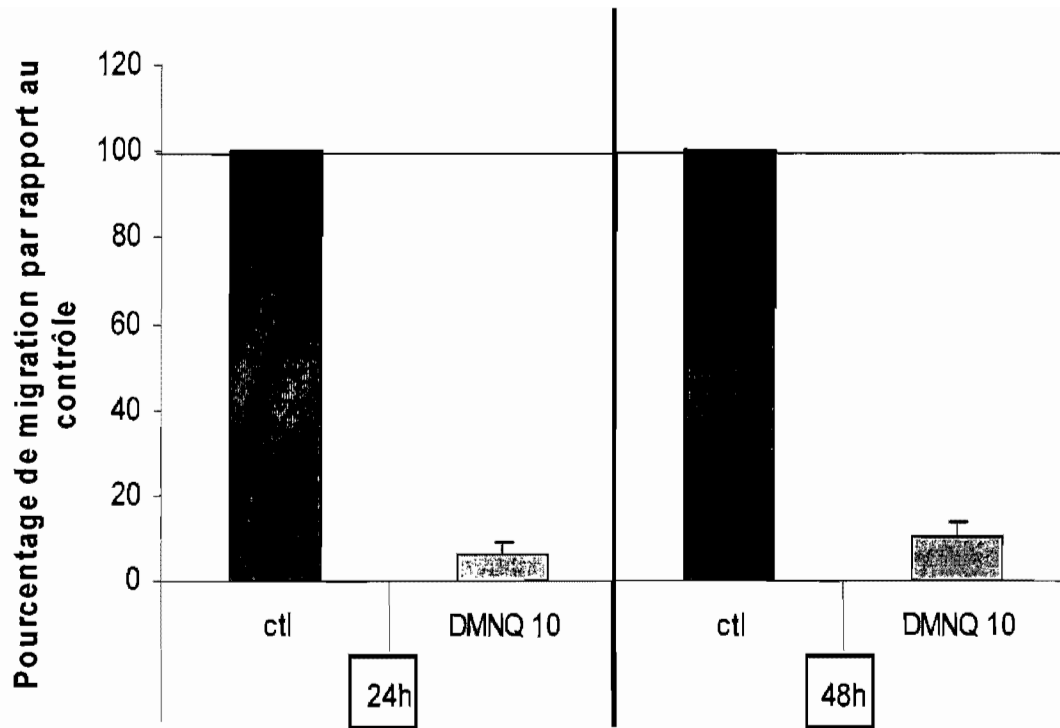


Figure 33 : Effet du DMNQ sur la migration des AT II à 24 et 48h

Les AT II en culture primaire sont séparées en présence de trypsine, déposées dans une chambre de type Boyden (filtre, pores $8\mu\text{m}$), préalablement recouverts de gélatine sur la face inférieure. La migration est mesurée après 24 et 48h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [= ctl] et DMNQ ($10\mu\text{M}$) [= DMNQ10]. (colonne noire = ctl, colonne grise = DMNQ10 ; $n=8$ par groupe).

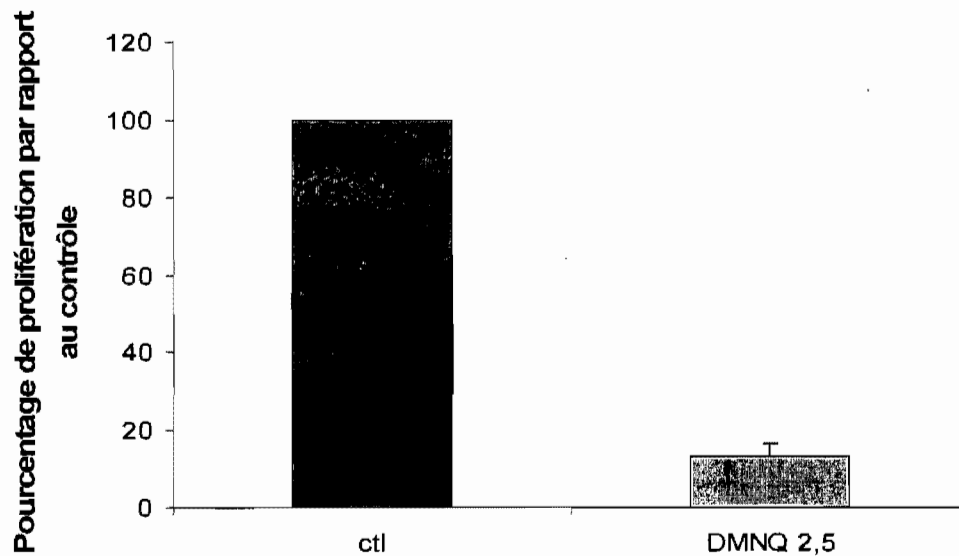


Figure 34 : Effet du DMNQ sur la prolifération des AT II

La prolifération est estimée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans les AT II en culture primaire, sous-confluente. L'incorporation de thymidine ^3H est évaluée après 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [= ctl] et DMNQ ($2,5\mu\text{M}$) [= DMNQ2,5]. (colonne noire = ctl, colonne grise = DMNQ2,5 ; $n=8$ par groupe).

3. Le modèle dexaméthasone

Le stress oxydant (Geiser et al. 2004), mais aussi les glucocorticoïdes (Nguyen and Simpson-Haidaris 2000 ; Wadsworth et al. 2006), influencent la reconstruction de l'épithélium lésé. *In vitro*, en pré-traitement sur AT II, le dexaméthasone permet de vérifier s'il est possible de contrecarrer l'effet néfaste de la bléomycine sur la réparation.

Dans cette série d'expériences, en condition contrôle [= ctl], la fermeture des plaies est de 75% à 24h et de 100% à 48h. Elle est donc croissante dans le temps ($p=0,0011$). La bléomycine inhibe la fermeture des plaies à 24 et 48h ($p=0,004$; $p=0,0003$). D'autre part, le dexaméthasone en présence de bléomycine augmente l'inhibition de fermeture due à la bléomycine, quelque soit le temps étudié ($p=0,0005$; $p<0,0001$). [Figure 35]

Nous abordons ensuite le mécanisme de prolifération des AT II. Nous évaluons l'effet de la bléomycine et/ou du dexaméthasone sur l'incorporation de thymidine ^3H .

Nous avons d'abord vérifié que la bléomycine inhibe la prolifération des AT II, en effet dans cette expérience l'inhibition est de 70% ($p<0,0001$). Par contre, le dexaméthasone augmente la prolifération des AT II de 41% ($p<0,0001$). Toutefois le dexaméthasone ne peut renverser l'effet inhibiteur de la bléomycine ($p=0,1192$). [Figure 36]

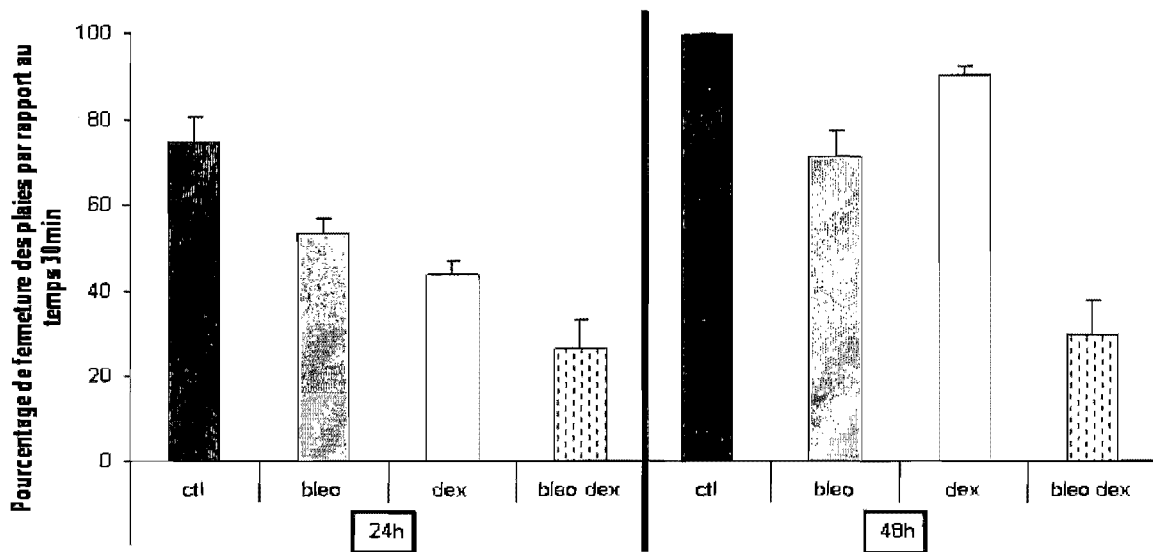


Figure 35 : Effet de la bléomycine et du dexaméthasone sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II

Une monocouche de AT II en culture primaire, a été lésée mécaniquement. Le dexaméthasone (100nM) [= dex] a été ajouté 24h avant les lésions et renouvelé le jours des lésions. La bléomycine (50 mU/ml) [= bleo] a été ajoutée au moment de la lésion. La réparation des plaies a été mesurée après 24 et 48h. (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo, colonne blanche = dex, colonne blanche et grise = bleo dex ; $n=6$ par groupe).

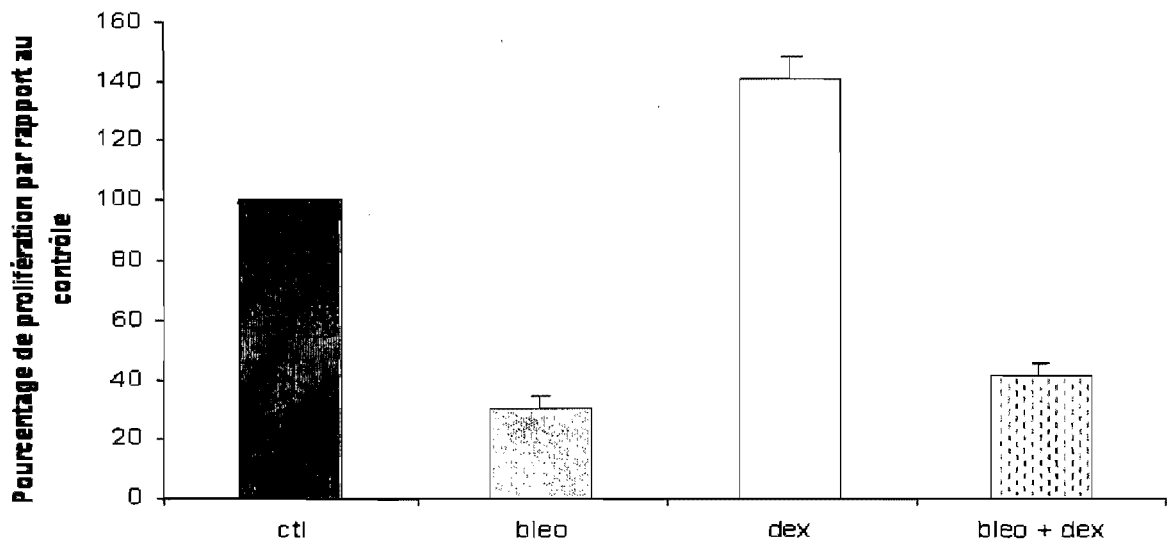


Figure 36 : Effet de la bléomycine et du dexaméthasone sur la prolifération des AT II

La prolifération est estimée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans les AT II en culture primaire, sous-confluente. L'incorporation de thymidine ^3H est dosée à 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [= ctl], bléomycine (50mU/ml) [= bleo] et dexaméthasone (100nM) [= dex]. (colonne noire = ctl, colonne grise = bleo, colonne blanche = dex, colonne blanche et grise = bleo dex ; $n=8$ par groupe).

CHAPITRE 4

DISCUSSION



Le syndrome de déficience respiratoire aiguë ou SDRA, se développe suite à diverses pathologies comme une septicémie ou un traumatisme thoracique. Il comprend trois phases. La première phase dite exsudative, est induite par des lésions de l'épithélium pulmonaire. Elle est caractérisée par un infiltrat neutrophilique, un œdème alvéolaire riche en protéines, une diminution de la synthèse et du renouvellement du surfactant et la présence de membranes hyalines. La barrière alvéolo-capillaire endommagée provoque une diminution de la régulation des flux ioniques et aqueux, induisant le développement d'un œdème, qui à son tour diminue les échanges gazeux. Tout ceci est associé à une inflammation. Les lésions et l'inflammation contribuent au dérèglement de l'équilibre oxydants / antioxydants en faveur des oxydants. En effet, plusieurs équipes ont mis en évidence ce déséquilibre, à la fois par une augmentation de la production de ROS (Kietzmann et al. 1993 ; Kumar et al. 2000 ; Lamb et al. 1999 ; Lenz et al. 1999 ; Mathru et al. 1994 ; Metnitz et al. 1999 ; Pacht et al. 1991) et la diminution du taux d'antioxydants (Haddad et al. 2000; Metnitz et al. 1999). La seconde phase dite proliférative, se met en place dans le but de réparer l'épithélium endommagé et d'endiguer l'efflux œdémateux. Elle consiste en une hyperplasie et métaplasie des pneumocytes II, une prolifération des myofibroblastes, des fibroblastes dans les septas interalvéolaires et les espaces alvéolaires, et des cellules endothéliales. Finalement la troisième phase dite fibrosante, montre une fibrose des zones inter-alvéolaires, alvéolo-capillaires, des alvéoles et des conduits alvéolaires. Ce « nouveau » tissu a été formé dans le but de réparer les dommages épithéliaux (phase 2), malheureusement les mécanismes permettant la création de ce tissu cicatriciel se dérèglent. Ce tissu fibreux s'il reforme la structure globale de l'alvéole, empêche la résolution de la fibrose intra-alvéolaire et interstitielle, entraînant des anomalies des échanges gazeux. (voir Introduction § C.4).

Nous avons souhaité étudier les mécanismes impliqués dans le développement de l'œdème et à la réparation des lésions épithéliales dans le syndrome SDRA. Pour se faire, nous avons mis en place un modèle murin avec instillation intra-trachéale d'un agent oxydant, la bléomycine. La bléomycine permet l'induction d'un stress oxydant occasionnant des lésions épithéliales associées au développement d'un œdème, puis à la mise en place d'une fibrose (Bellet-Barthas et al. 1983 ; Hay et al. 1991 ; Karmouty-Quintana et al. 2007 ; Thrall et al. 1979). Cela conduit au développement de phases comparables à celles retrouvées dans le SDRA (Holley et al. 2007 ; Shimabukuro et al. 2003).

D'autre part, souhaitant étudier les processus influençant la résolution de la clairance de l'œdème, nous nous sommes penchés plus particulièrement sur l'implication du canal ENaC. Il est connu que le canal ENaC est nécessaire à la réabsorption des fluides alvéolaires. En effet, les souriceaux dépourvus de ENaC (souris knock-out pour le gène ENaC), incapables d'éliminer le liquide alvéolaire à la naissance, décèdent après 40h (Hummler et al. 1996). De même, ENaC semble aussi indispensable chez le rat adulte afin d'éliminer le liquide alvéolaire exogène (Li and Folkesson 2006). Afin d'étudier le rôle du canal ENaC dans les pathologies où il pourrait être fortement impliqué, des souris transgéniques exprimant plus faiblement ENaC ont été créées par l'équipe du Dre Hummler (Hummler et al. 1997).

Ces animaux nous permettent d'évaluer l'impact d'une faible expression de ce canal, sur l'évolution des mécanismes liés à l'œdème (Matthay et al. 2002 ; Matthay et al. 2005) et à la réparation des lésions épithéliales (Chifflet et al. 2005 ; Grifoni et al. 2006), en présence d'un stress oxydant, *in vivo*. L'étude a été étendue *in vitro*, afin d'évaluer l'effet du stress oxydant sur les transports sodiques dont dépend la clairance alvéolaire (DuVall et al. 1998 ; Hu et al. 1994 ; Jovanovic et al. 2001 ; Xu and Chu 2007), et sur les processus de réparation de l'épithélium alvéolaire (Geiser et al. 2004 ; Sigaud et al. 2005).

A. Évaluation de l'importance du canal ENaC lors de l'évolution des lésions épithéliales et de l'œdème pulmonaire, suite à un stress oxydant, *in vivo*

SDRA et rôle du canal ENaC

L'étude du SDRA est rendue possible, *in vivo*, par l'instillation intra-trachéale de bléomycine à des souris. La bléomycine est une molécule qui en induisant le clivage de l'ADN (Kemsley et al. 2003), conduit à la formation de radicaux oxydants (Lee et al. 2005 ; Wallach-Dayana et al. 2006). La clairance du fluide alvéolaire (Egli et al. 2004 ; Modelska et al. 1999 ; Sakuma et al. 2000) et la création/entretien des lésions de l'épithélium (Janssen et al. 1993 ; Sigaud et al. 2005 ; Wallach-Dayana et al. 2006) pourraient être les cibles du stress oxydant produit par la bléomycine.

Nous avons souhaité savoir si une présence plus faible d'ENaC modifie la résolution de l'œdème. Nous avons utilisé les souris transgéniques de deuxième génération, du Dre Hummler. Le gène ENaC a été secondairement ajouté, aux souris KO pour ce gène, sous forme d'un transgène, sous contrôle du promoteur CMV. Ces souris, nommées ENaC $-/-$ Tg+, expriment faiblement le canal ENaC (Hummler et al. 1997).

Rôle du canal ENaC lors d'un stress oxydant

Les souris ENaC $-/-$ Tg+ nous fournissent donc un modèle d'étude du rôle du canal ENaC dans la clairance alvéolaire, en présence d'un stress oxydant (bléomycine).

La bléomycine instillée intra-trachéalement aux souris sauvages (WT) reproduit les premières étapes du SDRA. Les mesures de « wet/dry » nous permettent de constater la mise en place d'un œdème dès le septième jour ($p > 0,0001$) [Figure 19]. Des coupes histologiques de poumons issus de souris WT, traitées à la bléomycine pendant 9 jours, montrent la présence de l'épaississement de l'interstitium alvéolaire, une augmentation de l'infiltrat leucocytaire, ainsi que la présence d'un exsudat protéique, par rapport aux souris traitées en condition contrôle [Figure 20]. Chez les souris ENaC $-/-$ Tg+, l'on voit aussi le développement d'un œdème dès 7 jours, qui persiste à 9 jours et diminue au 16^{ème} jour [Figure 19].

Nous utilisons des souris mâles dont la maturité sexuelle arrive à 8 semaines. Il est donc possible que des variations dues au système hormonal interfère avec nos résultats. Je n'ai cependant, pas constaté de variation dans la réponse au traitement entre les souris âgées de 7 et 9 semaines. Des expériences à 6 et 10 semaines pourraient être faites afin de confirmer ces données.

Nous constatons premièrement que la bléomycine induit la formation d'un œdème chez les souris. Deuxièmement, contrairement à ce que nous pensions, les souris ayant une plus faible présence du canal ENaC initiale, non seulement ne sont pas plus sensibles que les souris WT, mais sont plus résistantes. Nous sommes donc particulièrement surpris par ces résultats, d'autant plus que deux équipes (Egli et al. 2004 ; Olivier et al. 2002) semblent montrer que les souris transgéniques, soumises à un stress oxydatif, ont un transport sodique diminué, une clairance alvéolaire insuffisante et une augmentation de l'œdème, persistant dans le temps. Ce qui vient immédiatement à l'esprit est que le profil oxydatif

induit par les différents stress oxydants, peut ne pas être le même. D'autre part, il peut y avoir eu, lors de la formation de notre colonie, une dérive génétique, impliquant une réponse au stress oxydant différente.

Nous avons testé ces hypothèses en utilisant le *thiourea*, stress oxydant employé par l'équipe du Dr Scherrer (Egli et al. 2004). Le *thiourea* agit premièrement sur la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Cela provoque sur le tissu pulmonaire, le développement d'un œdème par lésion de l'endothélium (Cunningham and Hurley 1972). En effet, le *thiourea* pris en charge par les enzymes mitochondriales, produit un réactif acide. Ce réactif peut ensuite réagir avec GSH (glutathione) pour former du GSSG (oxidized GSH) et régénérer le *thiourea*. En présence de GSH réductase, un cycle d'oxydo-réduction est induit, produisant un stress oxydant (Onderwater et al. 1998). Un des effets secondaires directs, est la formation de liaisons covalentes aux protéines, empêchant leur fonctionnement naturel (Onderwater et al. 1999).

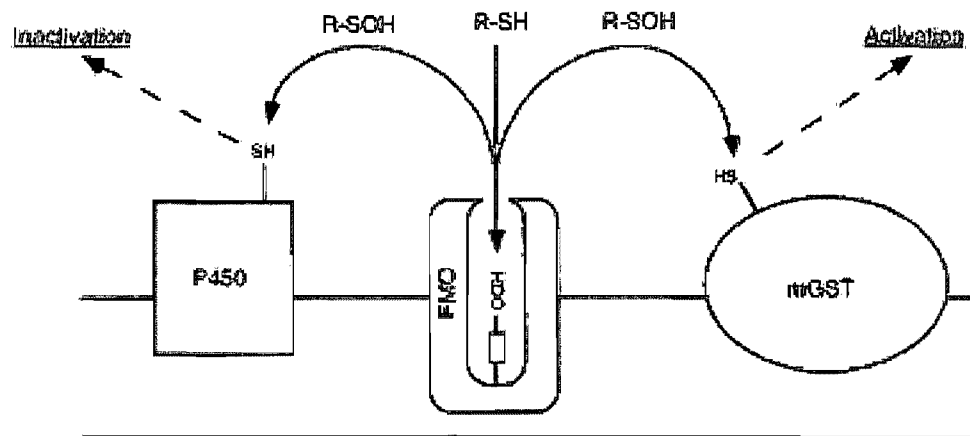


Figure 37 : Représentation schématique du concept de la bio-activation du *thiourea*, par le FMO (flavin-containing monooxygenases) et par la détection du potentiel alkylant des métabolites de ces composés (Onderwater et al. 1999)

Effectivement, dans notre expérience avec le *thiourea*, le stress oxydant provoque un œdème chez les souris ENaC $-/-$ Tg+, qui persiste dans le temps par rapport aux souris WT [Figure 21]. Ces résultats concordent avec ceux du Dr Scherrer, éliminant ainsi la possibilité d'une dérive génétique chez nos animaux. La persistance dans le temps a aussi été constatée à 9 jours, en présence de bléomycine. En effet, à J9, les souris WT montraient

une résorption de l'œdème par rapport au souris ENaC $-/-$ Tg+ [Figure 19]. Nous pouvons en déduire que le profil oxydatif induit par la bléomycine comme par le *thiouréa*, aboutit à la formation d'un œdème persistant chez les souris ENaC $-/-$ Tg+ par rapport aux souris WT.

Par ailleurs, il semble aussi que la résolution de l'œdème ne soit pas liée à la survie de l'animal, puisque les deux souches meurent suite à l'initiation de la résolution de l'œdème. En effet, les souris ENaC $-/-$ Tg+ commencent à décéder vers le 14^{ème} jour, alors que toutes les souris WT sont décédées dès le 10^{ème} jour [Figure 17]. Parallèlement à l'évolution du taux de mortalité, nous observons une perte de poids plus importante, suite à l'instillation de bléomycine, chez les souris WT [Figure 18]. Il a déjà été montré que l'instillation de bléomycine induit une perte de poids chez l'animal (Genovese et al. 2005).

Quelles autres hypothèses s'offrent à nous expliquant la meilleure survie des souris transgéniques ?

Il est tout d'abord possible de penser qu'une perte de poids plus faible chez les souris transgéniques, leur permet de supporter plus longtemps les maux provoqués par le stress oxydant [Figure 18]. Cette moindre perte de poids pourrait s'expliquer par une inflammation moins élevée. Il est possible que la bléomycine induise un stress oxydant moindre dans les souris transgéniques. Des expériences mesurant l'ampleur de ce stress seraient nécessaire afin de démontrer ce phénomène. L'évaluation de la quantité des protéines oxydées dans le lavage broncho-alvéolaire pourrait être faite par immunodétection. Il est aussi possible que les animaux soient plus résistants au stress oxydant. Ceci est plausible puisqu'il existe un biais de sélection à la naissance de ces souris. En effet, 50% des souris transgéniques meurent dans les 15 premiers jours. Une plus faible expression de ENaC induit une acidose métabolique, une élimination urinaire accrue des sels, et un retard de croissance. Seules les souris capables d'avoir une réponse régulatrice ré-équilibrante survivent (50%) (Hummler et al. 1997). Quelque soit la raison du différentiel en perte de poids, le niveau d'inflammation pourra être dosé localement et de façon systémique.

Il est également surprenant que les souris transgéniques n'aient pas une augmentation plus importante de l'œdème [Figure 19]. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par une absence de la modulation de l'expression du canal ENaC. En effet, nos résultats et ceux du Dr

Folkesson (Dagenais et al. 2004 ; Dagenais et al. 2005 ; Folkesson et al. 1998), ont démontré que le niveau des ARNm et protéine d'ENaC diminuent en présence de lésions et d'inflammation. Nous nous attendrions alors à ce que leur niveau diminue dans le poumon. Mais puisque le canal ENaC transgénique ne possède pas les séquences régulatrices 3'UTR du canal sauvage, il est possible que le stress oxydant induit par la bléomycine, ne puisse agir sur la régulation du transgène ENaC. Cela conduirait à une présence minimum, mais persistante du canal ENaC chez les souris ENaC $-/-$ Tg+, en présence d'un stress oxydant. Cette présence serait suffisante pour assurer une clairance des fluides œdémateux, liée à une survie plus longue des souris et une absence d'augmentation importante de l'œdème, par rapport aux souris WT. D'autre part les équipes des Drs Hummler et Scherrer (Egli et al. 2004;Olivier et al. 2002) montrent un transport sodique diminué par rapport aux souris WT. Donc, même si ENaC est impliqué dans la clairance des fluides alvéolaires, d'autres canaux sodiques sont très certainement touchés. L'absence de régulation du transgène ENaC est vérifiable en comparant les taux d'ARNm et de protéines d'ENaC présents dans les poumons des souris WT et transgéniques, en condition contrôle et bléomycine.

Comme nous l'avons signalé plus haut, d'autres transporteurs du sodium pourraient être régulés. Ce peut être à la membrane basolatérale : la pompe NaKATPase, le cotransporteur NaK2Cl et l'antiporteur Na^+/H^+ . Ce peut aussi être au niveau de la membrane apicale : canaux non-sélectifs aux cations, le canal CNG1 et les cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{glucose}$, $\text{Na}^+/\text{acide aminé}$ et $\text{Na}^+/\text{phosphate}$. L'hypothèse de la pompe NaKATPase a été étudiée par plusieurs équipes (Azzam et al. 2002 ; Factor et al. 1998 ; Factor et al. 2000 ; Looney et al. 2005) Il est même possible que des transporteurs non-sélectifs aux cations soient impliqués. D'autant que, *in vivo*, les canaux amiloride-sensibles hautement sélectifs au sodium (HSC) ne représentent que 13% du courant sodium entrant, tandis que les canaux amiloride-sensibles non-sélectifs au sodium (NSC), en représentent 50% dans les AT II de rat (Shlyonsky et al. 2008).

D'autre part, en reprenant l'hypothèse du biais de sélection des souris à la naissance, il est aussi possible que la résistance soit liée à un différentiel dans le bagage génétique concernant la régulation des flux. Ce nouveau « bagage » permettrait l'absorption du sodium et des fluides par d'autres mécanismes que le canal ENaC. Les souris ainsi obtenues, seraient donc plus capables que les souris WT, d'adapter la réponse ionique en cas de stress. Des inhibiteurs ou activateurs d'autres de transporteurs ioniques pourraient être utilisés, ainsi des modulateurs des transporteurs potassiques pourraient être utilisés.

Une dernière hypothèse soulevée est amenée par la constatation que l'inhibition du canal ENaC induit une hypertension, associée à l'augmentation de la concentration d'aldostérone chez les souris transgéniques (Hummler et al. 1997). L'aldostérone est activée par l'angiotensine II, le potassium, l'ACTH (adreno-cortico-trophic hormone hypophysaire) et l'endothéline 1. D'autre part, les patients SDRA ont une activité du système rénine-angiotensine (RAS) plus élevée dans le lavage broncho-alvéolaire, et plus faible dans le sang, que la norme (Idell et al. 1987b). Il est donc probable que nos souris transgéniques aient une modification de l'équilibre du RAS. De plus, les études portant sur le RAS semblent indiquer qu'il module le développement de l'ALI (acute lung injury) et du SDRA (Imai et al. 2005 ; Kiely et al. 1997 ; Kuba et al. 2005 ; Victorino et al. 2002 ; Wosten-van Asperen et al. 2008 ; Xu et al. 1998 ; Yamamoto et al. 1997). À la connaissance de ces données, il est possible de penser que la modification de la régulation du RAS chez les souris transgéniques soit en partie liée à leur résistance au développement d'œdème.

Une autre façon d'étudier le rôle du canal ENaC dans la clairance des fluides alvéolaires lors d'un stress oxydant, a été de tenter de moduler son expression. L'utilisation de stéroïdes semblait particulièrement intéressante car ils sont un puissant agent modulateur d'ENaC et possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Cela rend cette étude attrayante du point de vue d'un traitement potentiel du SDRA.

Les glucocorticoïdes agissent globalement en réduisant l'inflammation et les dommages cellulaires par deux mécanismes : directement en se liant au site consensus GRE (glucocorticoid response element) qui active la transcription génique, et indirectement par interaction avec d'autres protéines nucléaires (Tsai and O'Malley 1994). De façon plus spécifique, ils peuvent stimuler la clairance alvéolaire par l'augmentation du transport de sodium (Folkesson et al. 2000), ou prévenir l'effet négatif du stress oxydant sur la clairance (Guney et al. 2007a). Sans compter que les glucocorticoïdes agissent, en plus, précocement (augmentation du courant I_{sc} amiloride-sensible) et tardivement (augmentation de l'ARNm de α ENaC) sur la régulation du canal ENaC (Chow et al. 1999 ; Dagenais et al. 2001 ; Sayegh et al. 1999). Malheureusement, chez les deux groupes de souris, la dexaméthasone ne réduit pas l'œdème induit par la bléomycine [Figure 22]. Nos résultats sont en accord avec les essais cliniques effectués sur une cohorte de 180 patients. Essentiellement cette étude montre une amélioration des caractéristiques respiratoires et sanguines, mais pas du

taux de mortalité, en présence de stéroïdes. D'ailleurs, les stéroïdes augmentent ce taux pour les patients recrutés après le 15^{ème} jour de SDRA (Steinberg et al. 2006).

Il semble donc que soit (a) la dexaméthasone ne stimule pas assez la clairance, soit (b) que la stimulation de la clairance d'un épithélium lésé ne soit pas suffisante à la diminution de l'œdème. En effet, si l'épithélium est lésé, il y a un efflux continu d'exsudat plasmatique, que seule la réparation, et si possible la ré-épithélialisation peuvent endiguer.

Une trop faible stimulation de la clairance (a) semble peu vraisemblable car plusieurs études montrent l'efficacité au moins partielle de la dexaméthasone en présence d'un stress oxydant. D'une part, la dexaméthasone augmente la clairance alvéolaire, suite à la stimulation du courant sodique et de l'expression du transporteur NaKATPase et du canal ENaC, en conditions basales ou hypoxiques (Folkesson et al. 2000 ; Guney et al. 2007a). D'autre part, la dexaméthasone reverse partiellement l'effet inhibiteur du H₂O₂ sur l'expression des variantes α_1 et α_2 de ENaC (Xu and Chu 2007). La dexaméthasone atténue aussi l'œdème induit par l'ozone chez le cobaye (Toward and Broadley 2002).

Le fait que la réparation des lésions soit une nécessité afin de résorber ensuite l'œdème efficacement (b), semble plus plausible. En effet, si les cellules qui assurent la régulation des transports ioniques et donc la clairance des fluides alvéolaires, sont lésées, elles ne sont pas aptes à remplir leur fonction. D'autre part, les AT II progénitrices sont en charge de la réparation de l'épithélium. C'est à dire qu'elles sont différenciées afin de pouvoir assurer les mécanismes de migration et prolifération. Il semble alors difficile d'assumer en plus, la régulation du transport des ions et des fluides. Il aurait été possible de mesurer la perméabilité alvéolaire *in vivo* (Vivona et al. 2001). Nous aurions pu vérifier si en présence de lésions épithéliales dues à un stress oxydant, les efflux d'exsudat plasmatique se dirigeant vers l'espace alvéolaire, sont inversés par les mécanismes de clairance des cellules alvéolaires (mesure de la clairance alvéolaire *in vivo* par I¹²⁵ et I¹³¹).

In vivo, nous avons obtenu des résultats opposés à notre hypothèse. À savoir que lorsque ENaC est moins présent dans le poumon le taux de clairance alvéolaire est diminué en présence d'un stress oxydant. Nous avons alors décidé de faire des expériences *in vitro* afin de comprendre l'impact du stress oxydant sur les transports ioniques et sur la réparation. Tout d'abord, nous avons testé les transports ioniques, et en particulier les transports sodiques, qui sont impliqués dans la clairance des fluides alvéolaires, en présence d'un stress oxydant. Nous nous sommes aussi intéressés à l'étude des processus impliqués dans

la réparation d'un épithélium lésé, toujours en présence d'un stress oxydant. Et enfin, nous nous sommes demandés comment la dexaméthasone influence ces mécanismes.

B. Évaluation de l'importance du canal ENaC dans les transports ioniques dont dépend la clairance des fluides, suite à un stress oxydant, *in vitro*

Les patients SDRA présentent une augmentation du taux de stress oxydant (Kietzmann et al. 1993 ; Kumar et al. 2000 ; Lamb et al. 1999 ; Lenz et al. 1999 ; Mathru et al. 1994 ; Metnitz et al. 1999 ; Pacht et al. 1991). Le stress oxydant modifie les courants ioniques impliqués dans la clairance des fluides alvéolaires (Haskell et al. 1994 ; Wang et al. 2000 ; Yue et al. 1995).

Les AT II ont été choisies comme modèle cellulaire, de par leur fonction progénitrice, assumant la réparation de l'épithélium, puis la clairance alvéolaire (Guidot et al. 2006).

Le modèle bléomycine étant utilisé comme un outil d'étude *in vivo* du SDRA (Holley et al. 2007 ; Shimabukuro et al. 2003), il nous a semblé approprié de l'utiliser *in vitro*. Le stress oxydant modifie la clairance alvéolaire (Kim and Suh 1993 ; Tate et al. 1982) et les courants ioniques qui lui sont reliés (Clerici and Matthay 2000 ; Haskell et al. 1994 ; Jovanovic et al. 2001 ; Rafii et al. 1998 ; Sakuma et al. 2000 ; Sznajder et al. 1995 ; Yue et al. 1995) *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. D'autre part, il a été montré *in vitro*, que la présence d'un œdème (fluide alvéolaire de patients ALI (acute lung injury)) provoque la modification du transport des fluides alvéolaires chez les AT II. Cela serait occasionné par la modulation de plusieurs canaux ioniques (ARNm et protéines de α ENaC, α 1NaKATPase, et CFTR) (Lee et al. 2007).

Implication du canal ENaC dans les courants sodiques lors d'un stress oxydant

Nous avons donc voulu déterminer l'effet du stress oxydant, créé par la bléomycine, sur la régulation du courant et en particulier du canal ENaC, dans les AT II. Pour cette étude, une monocouche de cellules AT II polarisées, cultivées sur un filtre perméant a été utilisée en chambre de Ussing, en présence ou non, de bléomycine.

La bléomycine, aux doses utilisées, ne semble pas agir sur la régulation des flux ioniques. En effet, elle ne modifie ni le courant transépithélial ni le courant apical, qu'il soit total ou amiloride-sensible [Figure 24]. Il est possible que la concentration de bléomycine, utilisée, ne soit pas suffisante pour générer un stress oxydant qui influe sur les transports ioniques. Malheureusement, il est impossible d'augmenter la concentration, car elle induit un effet délétère sur la résistance de la monocouche de AT II.

Afin de vérifier si les données produites par le modèle de stress oxydant bléomycine sont spécifiques à la bléomycine, nous avons utilisé un autre modèle de stress oxydant. Le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) est une quinone modifiée, qui produit un stress oxydant en agissant sur la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Ross et al. 1986). Cela entraîne la coupure simple brin de l'ADN (Dyrbukt et al. 1990) et la formation d'anions superoxydes dans la cellule (Floreani and Carpenedo 1992). Nous avons constaté que le traitement au DMNQ inhibe les courants apicaux total et amiloride-sensible mais pas les courants transépithéliaux [Figure 25]. Cela indiquerait que le stress oxydant causé par le DMNQ, agit sur la régulation des flux ioniques, dus aux canaux sodium apicaux amiloride-sensibles, possiblement à travers le canal ENaC. Par contre, cet effet semble être équilibré par des canaux/transporteurs basolatéraux, car le DMNQ n'a pas d'influence sur les courants transépithéliaux, total ou amiloride-sensible. Donc le DMNQ pourrait aussi moduler d'autres transporteurs dont la pompe NaKATPase, l'échangeur NaK₂Cl, ou encore des canaux potassiques. La bléomycine ne produit pas les mêmes effets que le DMNQ. Le stress oxydant produit par la bléomycine semble donc atypique. Nous tendons à penser que ce stress oxydant n'est pas adéquat pour modifier la régulation des transports ioniques au niveau des AT II. Une solution envisageable serait l'emploi de cellules alvéolaires issues de souris traitées à la bléomycine (voir ci-dessous). D'autre part, ces résultats *in vitro*, corroboreraient l'hypothèse émise plus tôt *in vivo*, selon laquelle l'effet du stress oxydant pourrait être moindre sur les mécanismes liés à la clairance alvéolaire et plus important sur les processus de réparation.

Le modèle cellulaire nous permet d'étudier l'influence de différents éléments sur la régulation des transports ioniques, dont le transport de sodium assuré partiellement par le canal ENaC. Les différents éléments étudiés sont le stress oxydant et les glucocorticoïdes,

ils influencent tout deux, la conductance amiloride-sensible (Jovanovic et al. 2001 ; Wang et al. 2000).

A nouveau, dans cette série d'expérience, la bléomycine n'influence aucun des courants étudiés. La bléomycine n'ayant pas d'effet sur les courants mesurés, il est difficile de dire si la dexaméthasone a une influence sur l'impact de la bléomycine sur les courants sodiques. La dexaméthasone est capable d'agir même en présence de bléomycine, à l'exception de l'effet sur le courant sodique transépithélial amiloride-sensible. Il n'est modulé ni par la dexaméthasone, ni par la bléomycine.

La dexaméthasone augmente les courants totaux, transépithélial et apical, par rapport aux conditions contrôle [Figure 26 A]. De même, la dexaméthasone augmente le courant sodique apical sensible à l'amiloride [Figure 26 B]. Donc la dexaméthasone augmente le courant sodique apical, en partie par le biais d'un courant sodique apical amiloride-sensible, possiblement *via* le canal ENaC. Toutefois, la dexaméthasone ne parvient pas à augmenter le courant transépithélial amiloride-sensible [Figure 26 B]. Deux hypothèses s'offrent à nous, et ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Une première supposition serait que la pompe NaKATPase située en basolatéral, reste limitante pour l'activation du courant sodique transépithélial amiloride-sensible, malgré la stimulation des courants sodiques apicaux par la dexaméthasone (Dagenais et al. 2001 ; Dagenais et al. 2006). La seconde supposition serait que la dexaméthasone régule un canal/transporteur qui compenserait l'activation des courants sodiques apicaux amiloride-sensibles. Quelque soit l'hypothèse retenue, lors de la mesure du courant transépithélial amiloride-sensible, aucune modulation par la dexaméthasone ne serait visible, comme c'est le cas [Figure 26 B]. L'augmentation du courant sodique apical par la dexaméthasone semble aussi partiellement due à l'augmentation du courant sodique apical amiloride-insensible [Figure 26 A et B]. Le canal CNG1 (Junor et al. 1999 ; Schwiebert et al. 1997), les récepteurs purinergiques P₂X (Egan et al. 2006) et les cotransporteurs Na⁺/glucose, Na⁺/acides aminés et Na⁺/phosphate (Saumon and Basset 1993), sont des cibles potentielles pour des études plus approfondies de l'impact de la dexaméthasone sur les courants sodiques amiloride-insensibles.

Afin de déterminer la ou les cible(s) d'action de la dexaméthasone sur le courant, d'autres activateurs et inhibiteurs des canaux/transporteurs peuvent être testés. Ainsi la régulation de la pompe NaKATPase peut être testée par l'utilisation d'ouabaine.

Étant donné l'absence de résultats lors de la mesure des courants en présence de bléomycine, il est possible de se demander si une culture primaire de cellules alvéolaires

provenant d'animaux traités avec la bléomycine, et/ou avec des produits stimulant la clairance des fluides alvéolaires, pourrait être utilisée. Ce serait une alternative intéressante afin d'évaluer l'impact de ces produits stimulateurs, sur la résolution d'un œdème dû à un stress oxydant, en présence ou non d'un déficit du canal ENaC. Ce type d'expérimentation a déjà été conduite chez le rat, dans des conditions d'hyperoxie (Desai et al. 2007) et d'hypoxie (Guney et al. 2007b). Il serait possible de l'adapter aux souris en utilisant la méthode d'isolation des AT II de souris du Dr Weaver (Rice et al. 2002).

C. Déterminer l'influence du stress oxydant sur les processus de réparation épithéliale, *in vitro*

La responsabilité de la restauration de l'architecture des alvéoles et de la barrière alvéolo-capillaire revient à la sous-population des AT II progénitrices (Adamson et al. 1990 ; Adamson and Bowden 1974b ; Fehrenbach 2001 ; Reddy et al. 2004 ; Takaro et al. 1985).

D'autre part, le « taux de stress oxydant » est plus élevé chez les patients SDRA (Kietzmann et al. 1993 ; Kumar et al. 2000 ; Lamb et al. 1999 ; Lenz et al. 1999 ; Mathru et al. 1994 ; Metnitz et al. 1999 ; Pacht et al. 1991). Ce stress oxydant peut induire et/ou aggraver les lésions de l'épithélium alvéolaire chez les patients (Lang et al. 2002). *In vivo*, il a été démontré que dans les zones touchées par un stress oxydant, comme celui induit par le H₂O₂, le taux de prolifération des AT II augmente (Sigaud et al. 2005). Nous avons constaté lors de nos travaux, *in vivo*, que la bléomycine agirait possiblement sur les processus de réparation.

Impact du stress oxydant sur les processus de réparation

Les monocouches de AT II, lésées mécaniquement, nous permettent d'étudier le phénomène de réparation (Trinh et al. 2007) en présence d'un stress oxydant (bléomycine). La bléomycine inhibe la réparation de façon temps et dose dépendants [Figure 29 B]. Les mécanismes de migration et prolifération des AT II, qui sont deux des processus primordiaux lors de la réparation des lésions, sont sévèrement réduits en présence de

bléomycine [Figures 30 et 31]. Le stress oxydant produit par la bléomycine, est visiblement capable de restreindre les différents mécanismes participant à la réparation des lésions *in vitro*. Cela expliquerait partiellement, pourquoi les souris WT et ENaC $-/-$ Tg+, sont incapables de résoudre l'œdème et de survivre à la présence de bléomycine. Comme le stress oxydant produit par la bléomycine touche visiblement les mécanismes de réparation, la restauration de l'intégrité physique de l'épithélium alvéolaire ne peut avoir lieu. Nos résultats sont comparables à ceux du Dr Broaddus qui utilise des cellules distales pulmonaires humaines afin de montrer que le stress oxydant induit par le H₂O₂ inhibe le processus de fermeture de la plaie (Geiser et al. 2004). L'équipe du D^r Broaddus propose que l'inhibition induite par le H₂O₂ serait partiellement due à l'induction de l'apoptose. Nous avons fait une courbe dose-réponse lors de nos travaux portant sur le stress oxydant induit par la bléomycine. Nous avons pu déterminer des doses « seuils » pour lesquelles la bléomycine induit visiblement une mortalité cellulaire élevée (i.e. infléchissement de la courbe lié à l'«ouverture» de la plaie). Nous sommes restés en deçà de ces doses. Mais il reste possible, que la bléomycine induise une faible apoptose qui participerait à l'inhibition des processus de migration et de prolifération.

Le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) produit un stress oxydant dont la cible initiale est la chaîne respiratoire mitochondriale (Dypbukt et al. 1990 ; Floreani and Carpenedo 1992 ; Ross et al. 1986). Le modèle de stress oxydant DMNQ nous permet de comparer les données obtenues, avec celles produites par la bléomycine. Les mécanismes de réparation, de migration et de prolifération sont sévèrement inhibés en présence du DMNQ [Figure 32, 33 et 34]. Les effets de la bléomycine et du DMNQ allant de pairs, nous tendons à penser que le stress oxydant généré par la bléomycine est suffisant pour affecter la réparation de lésions par les AT II.

La première phase du SDRA présente un stress oxydant associé à la présence de lésions épithéliales pulmonaires (voir Introduction § C.6 et C.7). La réparation de l'épithélium alvéolaire se fait grâce aux cellules progénitrices AT II *in vivo* (Anderson and Thielen 1992 ; Fehrenbach et al. 1999 ; Tomashefski, Jr. 1990) et *in vitro* (Adamson and Bowden 1974b ; Reddy et al. 2004 ; Uhal 1997). Le stress oxydant (Geiser et al. 2004), mais aussi les glucocorticoïdes (Nguyen and Simpson-Haidaris 2000 ; Wadsworth et al. 2006), influent sur la reconstruction d'un épithélium lésé. *In vitro*, nous avons voulu évaluer si la présence

de la dexaméthasone, permet de contrecarrer l'effet néfaste de la bléomycine sur la réparation. En effet, une étude a montré que la dexaméthasone peut influencer positivement sur la réparation (Nguyen and Simpson-Haidaris 2000). Dans notre étude, nos résultats montrent que la dexaméthasone possède des effets contradictoires sur les mécanismes liés à la réparation. Utilisé seul, il semble inhiber la fermeture des plaies et activer la prolifération des AT II. La dexaméthasone augmente l'effet néfaste de la bléomycine lors de la réparation et ne reverse pas l'effet délétère de la bléomycine lors de la prolifération [Figures 35 et 36]. Donc le glucocorticoïde dexaméthasone ne favorise pas la réparation de lésions épithéliales en présence d'un stress oxydant, voir augmente son effet toxique. D'autres équipes, montrent comme nos travaux que la dexaméthasone inhibe non seulement la prolifération des cellules parenchymales, mais aussi des cellules inflammatoires, *in vivo*, chez le rat lors d'un traitement à la bléomycine (Dik et al. 2003 ; Li et al. 2004). D'autre part, l'équipe du Dr Hall montre que la dexaméthasone est inefficace à augmenter la fermeture de plaies mécaniques, lors de leur première apparition. Par contre, il devient efficace lorsque le tapis épithélial a subi plusieurs cycles de lésions-réparations (Wadsworth et al. 2006). Dans un modèle de cellules en culture primaire, il est malheureusement impossible d'effectuer ce type de travail.

D. Sommaire

		œdème (Wet/Dry)	lésions épithéliales	infiltrat leucocytaire	mortalité
souris WT	salin	non	non	non	non
	bléomycine	oui +	oui	oui	oui (J10)
	<i>thiourea</i> dexaméthasone + bléomycine	oui + oui			
Souris ENaC -/- Tg+	salin	non	non	non	non
	bléomycine	oui -	oui	oui	oui (J14)
	<i>thiourea</i> dexaméthasone + bléomycine	oui - oui			

Figure 38 : Tableau récapitulatif des résultats *in vivo*

Le modèle animal bléomycine que nous avons développé, présente bien les caractéristiques des premiers stades du SDRA. En effet, le stress oxydant produit par la bléomycine provoque le développement d'un œdème, de lésions alvéolaires et d'un infiltrat leucocytaire. L'effet œdémateux est reproduit par le *thiourea*, indiquant que le stress oxydant induit cet effet de manière générale.

D'autre part, il n'a pas encore été possible de déterminer si le stress oxydant, induit par la bléomycine ou le *thiourea*, a pour cible majeure, le canal ENaC.

		courants sodiques				Réparation		
		total		amiloride-sensible		fermeture	migration	prolifération
		Trans-épithélial	apical	Trans-épithélial	apical			
AT II	bléomycine*	= ctl	= ctl	= ctl	= ctl	inhibe	inhibe	inhibe
	DMNQ*	= ctl	inhibe	= ctl	inhibe	inhibe	inhibe	inhibe
	dexaméthasone + bléomycine**	augmente	augmente	idem bleo	augmente	inhibe		inhibe

* comparaison par rapport au contrôle (ctl)

** comparaison par rapport à la bléomycine (bleo)

Figure 39 : Tableau récapitulatif des résultats *in vitro*

La bléomycine, à la dose utilisée, ne modifie pas les courants étudiés. Par contre, le DMNQ inhibe les courants apicaux, total et amiloride-sensible. Il est donc plausible que l'impact du profil oxydatif induit par le DMNQ, sur les canaux/transporteurs sodiques apicaux amiloride-sensibles, passe par le canal ENaC. D'autre part, l'impact du DMNQ est soit absent sur la pompe NaKATPase, soit compensé par la modulation d'autres canaux/transporteurs, puisqu'il n'est pas visible lors de l'étude du courant transépithélial. L'effet de la dexaméthasone est complexe. Il augmente en présence de bléomycine ou non, les courants totaux transépithélial et apical, et amiloride-sensible apical. Par contre il n'a aucun effet sur le courant amiloride-sensible transépithélial. La dexaméthasone augmenterait possiblement les courants apicaux amiloride-insensibles.

Le stress oxydant généré par la bléomycine, induit un effet négatif sur les mécanismes de réparation. Cet effet se trouve reproduit en présence de DMNQ. Donc quelque soit le profil oxydatif induit, celui-ci inhibe les processus de réparation. D'autre part, la dexaméthasone accentue les effets délétères de la bléomycine sur ces-mêmes mécanismes.

E.Conclusion - Perspectives

L'ensemble de nos résultats indique que le stress oxydant, induit par la bléomycine, entraînerait la formation d'un œdème, mais que ce serait une atteinte des mécanismes de réparation qui provoqueraient la mort des souris. Cette hypothèse s'appuie sur deux argumentations :

-1- Le stress oxydant induit la formation d'un œdème *in vivo*. Il est à noter que les deux groupes génétiques de souris développent un œdème, commencent à le résorber, et meurent. Il semble que la différence se situe dans la résistance temporelle. Il est difficile de déterminer si l'œdème est lié à l'impact du stress oxydant sur ENaC. En effet, les souris ENaC $-/-$ Tg $+$ sont non seulement moins sensibles que les souris WT, elles semblent même plus résistantes. Cette résistance s'expliquerait possiblement par deux raisons.

La première est que les souris ENaC $-/-$ Tg $+$ ont développé un mécanisme de résistance permettant de suppléer à la faible présence d'ENaC et de faire partie des 50% des souris survivant à un pseudo-hypoaldostéronisme de type 1. Ce mécanisme pourrait ne pas être régulé par le stress oxydant, permettant donc une survie plus longue. Si ce mécanisme est lié à d'autres canaux/transporteurs, cela pourra être testé par l'ajout de modulateurs *in vivo*. Si l'hypothèse est correcte, alors cette expérience montrerait qu'une partie de l'œdème induit et prorogé par le stress oxydant, serait liée à une inhibition de l'activité d'un canal/transporteur autre que ENaC.

L'autre possibilité est l'absence de la région 3'UTR régulatrice sur le transgène ENaC. Le stress oxydant ne peut alors moduler l'ARNm d'ENaC que chez les souris WT. Cela pourrait être vérifié par le dosage des ARNm et des protéines d'ENaC présents dans les poumons en présence ou non de stress oxydant chez les deux types de souris. Si l'hypothèse s'avère exacte, notre expérience prouve qu'une partie de l'œdème induit et prorogé par le stress oxydant, serait liée à une régulation de l'ARNm d'ENaC chez les souris WT.

In vitro, le fait que le courant sodique des cellules AT II ne soit pas modifié par le stress oxydant induit par la bléomycine, pourrait être expliqué par l'inadaptation du modèle utilisé. Cette supposition serait à confirmer par la mesure des courants sodiques de cellules AT II provenant d'animaux traités ou non à la bléomycine. Si ce nouveau modèle produit

des résultats identiques alors le courant apical amiloride-sensible n'est pas régulé par le profil oxydatif induit par la bléomycine.

-2- D'autre part, le stress oxydant inhibe les mécanismes de réparation de lésions épithéliales, *in vitro*. En se rappelant que malgré la résorption de l'œdème, les deux types de souris décèdent, il est possible que cette mortalité soit liée à un autre mécanisme. L'effet principal du stress oxydant sur la persistance de l'œdème, *in vivo*, pourrait être une absence ou une mauvaise régulation des mécanismes de réparation. Corrélé, *in vivo*, le fait que la clairance alvéolaire est absente en présence de lésions de l'épithélium lors d'un stress oxydant, étoufferait cette hypothèse. Les facteurs de croissances tels que l'EGF, HGF, KGF (Atabai et al. 2002 ; Borok et al. 1998 ; Gazdhar et al. 2007 ; Prince et al. 2001), pourraient être utilisés pour stimuler la réparation, et vérifier l'impact de la réparation sur la progression de l'œdème, toujours par la mesure de la clairance alvéolaire.

Par ailleurs, la dexaméthasone, glucocorticoïde anti-inflammatoire, régulant à la hausse le courant sodique partiellement par l'activation du canal ENaC, génère un effet globalement néfaste. Nos résultats semblent aller dans le même sens que les études cliniques menées dans le cadre du SDRA. Ces études montrent que les glucocorticoïdes n'augmentent pas la survie des patients, et que pris dans des conditions inadéquates, ils peuvent augmenter la mortalité (Steinberg et al. 2006).

Bibliographie

A

- Adamson, I. Y. and Bakowska, J.** (1999). Relationship of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor levels in rat lung lavage fluid to epithelial cell regeneration after bleomycin. *Am J Pathol.* **155**, 949-954.
- Adamson, I. Y. and Bowden, D. H.** (1974a). The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol.* **77**, 185-197.
- Adamson, I. Y. and Bowden, D. H.** (1974b). The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* **30**, 35-42.
- Adamson, I. Y., Hedgecock, C., and Bowden, D. H.** (1990). Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol.* **137**, 385-392.
- Adebamiro, A., Cheng, Y., Johnson, J. P., and Bridges, R. J.** (2005). Endogenous protease activation of ENaC: effect of serine protease inhibition on ENaC single channel properties. *J Gen. Physiol* **126**, 339-352.
- Aida, S., Tamai, S., Sekiguchi, S., and Shimizu, N.** (1994). Distribution of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human lung: immunohistochemical and immunoelectron-microscopic studies. *Respiration* **61**, 161-166.
- Alton, E. W., Manning, S. D., Schlatter, P. J., Geddes, D. M., and Williams, A. J.** (1991). Characterization of a Ca(2+)-dependent anion channel from sheep tracheal epithelium incorporated into planar bilayers. *J Physiol* **443**, 137-159.
- Anderson, W. R. and Thielen, K.** (1992). Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastruct. Pathol.* **16**, 615-628.
- Arensman, J. B., Dominik, J. W., and Hilmas, D. E.** (1977). Effects of small-particle aerosols of rimantadine and ribavirin on arterial blood pH and gas tensions and lung water content of A2 influenza-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**, 40-46.
- Arroliga, A. C., Ghamra, Z. W., Perez, T. A., Perez, T. P., Komara, J. J., Jr., Smith, A., and Wiedemann, H. P.** (2002). Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. *Chest* **121**, 1972-1976.
- Ashbaugh, D. G., Bigelow, D. B., Petty, T. L., and Levine, B. E.** (1967). Acute respiratory distress in adults. *Lancet* **2**, 319-323.
- Atabai, K., Ishigaki, M., Geiser, T., Ueki, I., Matthay, M. A., and Ware, L. B.** (2002). Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **283**, L163-L169.
- Azzam, Z. S., Dumasius, V., Saldias, F. J., Adir, Y., Sznajder, J. I., and Factor, P.** (2002). Na,K-ATPase overexpression improves alveolar fluid clearance in a rat model of elevated left atrial pressure. *Circulation* **105**, 497-501.

B

- Bachofen, M. and Weibel, E. R.** (1982). Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* **3**, 35-56.
- Baker, C. S., Evans, T. W., Randle, B. J., and Haslam, P. L.** (1999). Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* **353**, 1232-1237.
- BANG, F. B.** (1961). Mucociliary function as protective mechanism in upper respiratory tract. *Bacteriol. Rev* **25**, 228-236.
- Basset, G., Bouchonnet, F., Crone, C., and Saumon, G.** (1988). Potassium transport across rat alveolar epithelium: evidence for an apical Na⁺-K⁺ pump. *J Physiol* **400**, 529-543.

- Basset, G., Crone, C., and Saumon, G.** (1987). Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol* **384**, 325-345.
- Bellet-Barthas, M., Le Roy, J. P., Barthelemy, L., and Bellet, M.** (1983). [Pulmonary toxicity of bleomycin in the rabbit: histophysiological and anatomo-radiological correlations]. *Toxicol.Eur.Res* **5**, 113-116.
- Berdiev, B. K., Jovov, B., Tucker, W. C., Naren, A. P., Fuller, C. M., Chapman, E. R., and Benos, D. J.** (2004). ENaC subunit-subunit interactions and inhibition by syntaxin 1A. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F1100-F1106.
- Berthiaume, Y., Lesur, O., and Dagenais, A.** (1999). Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax* **54**, 150-160.
- Berthiaume, Y., Staub, N. C., and Matthay, M. A.** (1987). Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest* **79**, 335-343.
- Bindl, L., Dresbach, K., and Lentze, M. J.** (2005). Incidence of acute respiratory distress syndrome in German children and adolescents: a population-based study. *Crit Care Med.* **33**, 209-312.
- Bishop, A. E.** (2004). Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif.* **37**, 89-96.
- Borok, Z., Danto, S. I., Dimen, L. L., Zhang, X. L., and Lubman, R. L.** (1998). Na(+)-K(+)-ATPase expression in alveolar epithelial cells: upregulation of active ion transport by KGF. *Am J Physiol* **274**, L149-L158.
- Borok, Z., Liebler, J. M., Lubman, R. L., Foster, M. J., Zhou, B., Li, X., Zabski, S. M., Kim, K. J., and Crandall, E. D.** (2002). Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **282**, L599-L608.
- Boucher, R. C.** (1994). Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir.Crit Care Med.* **150**, 271-281.
- Boucher, R. C. and Gatzky, J. T.** (1983). Characteristics of sodium transport by excised rabbit trachea. *J Appl.Physiol* **55**, 1877-1883.
- Bourke, S., Mason, H. S., Borok, Z., Kim, K. J., Crandall, E. D., and Kemp, P. J.** (2005). Development of a lung slice preparation for recording ion channel activity in alveolar epithelial type I cells. *Respir.Res* **6**, 40.
- Bowden, D. H.** (1984). The alveolar macrophage. *Environ.Health Perspect.* **55**, 327-341.
- Brochiero, E., Dagenais, A., Prive, A., Berthiaume, Y., and Grygorczyk, R.** (2004). Evidence of a functional CFTR Cl(-) channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **287**, L382-L392.
- Brun-Buisson, C., Minelli, C., Bertolini, G., Brazzi, L., Pimentel, J., Lewandowski, K., Bion, J., Romand, J. A., Villar, J., Thorsteinsson, A., Damas, P., Armaganidis, A., and Lemaire, F.** (2004). Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med.* **30**, 51-61.

C

- Caldwell, R. A., Boucher, R. C., and Stutts, M. J.** (2004). Serine protease activation of near-silent epithelial Na⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C190-C194.
- Canessa, C. M., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C.** (1993). Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361**, 467-470.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C.** (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463-467.
- Cavanaugh, K. J., Jr., Oswari, J., and Margulies, S. S.** (2001). Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells. *Am J Respir.Cell Mol.Biol* **25**, 584-591.
- Chambers, L. A., Rollins, B. M., and Tarran, R.** (2007). Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respir.Physiol Neurobiol.*

- Champigny, G., Voilley, N., Lingueglia, E., Friend, V., Barbry, P., and Lazdunski, M.** (1994). Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na⁺ channel by steroid hormones. *EMBO J* **13**, 2177-2181.
- Chen, X. J., Eaton, D. C., and Jain, L.** (2002). Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **282**, L609-L620.
- Chifflet, S., Hernandez, J. A., and Grasso, S.** (2005). A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1420-C1430.
- Chow, Y. H., Wang, Y., Plumb, J., O'Brodovich, H., and Hu, J.** (1999). Hormonal regulation and genomic organization of the human amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha subunit gene. *Pediatr. Res* **46**, 208-214.
- Clements, J. A.** (1997). Lung surfactant: a personal perspective. *Annu. Rev Physiol* **59**, 1-21.
- Clerici, C., Couette, S., Loiseau, A., Herman, P., and Amiel, C.** (1995). Evidence for Na-K-Cl cotransport in alveolar epithelial cells: effect of phorbol ester and osmotic stress. *J Membr. Biol* **147**, 295-304.
- Clerici, C. and Matthay, M. A.** (2000). Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins. *J Appl. Physiol* **88**, 1890-1896.
- Crim, C. and Longmore, W. J.** (1995). Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am J Physiol* **268**, L129-L135.
- Crouch, E., Parghi, D., Kuan, S. F., and Persson, A.** (1992). Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am J Physiol* **263**, L60-L66.
- Cunningham, A. L. and Hurley, J. V.** (1972). Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study. *J Pathol.* **106**, 25-35.

D

- Dagenais, A., Denis, C., Vives, M. F., Girouard, S., Masse, C., Nguyen, T., Yamagata, T., Grygorczyk, C., Kothary, R., and Berthiaume, Y.** (2001). Modulation of alpha-ENaC and alpha-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **281**, L217-L230.
- Dagenais, A., Frechette, R., Clermont, M. E., Masse, C., Prive, A., Brochiero, E., and Berthiaume, Y.** (2006). Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **291**, L1220-L1231.
- Dagenais, A., Frechette, R., Yamagata, Y., Yamagata, T., Carmel, J. F., Clermont, M. E., Brochiero, E., Masse, C., and Berthiaume, Y.** (2004). Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **286**, L301-L311.
- Dagenais, A., Gosselin, D., Guilbault, C., Radzioch, D., and Berthiaume, Y.** (2005). Modulation of epithelial sodium channel (ENaC) expression in mouse lung infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir. Res.* **6**, 2.
- DalleDonne, I., Milzani, A., and Colombo, R.** (1995). H₂O₂-treated actin: assembly and polymer interactions with cross-linking proteins. *Biophys. J* **69**, 2710-2719.
- Danto, S. I., Shannon, J. M., Borok, Z., Zabski, S. M., and Crandall, E. D.** (1995). Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **12**, 497-502.
- Davis, B., Marin, M. G., Olver, R. E., and Nadel, J. A.** (1975). Active ion transport across canine tracheal epithelium: a possible control system for mucociliary transport. *Chest* **67**, 57S-59S.
- DeCoursey, T. E., Jacobs, E. R., and Silver, M. R.** (1988). Potassium currents in rat type II alveolar epithelial cells. *J Physiol* **395**, 487-505.
- Desai, L. P., Sinclair, S. E., Chapman, K. E., Hassid, A., and Waters, C. M.** (2007). High tidal volume mechanical ventilation with hyperoxia alters alveolar type II cell adhesion. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **293**, L769-L778.
- Dierynck, I., Bernard, A., Roels, H., and De Ley, M.** (1996). The human Clara cell protein: biochemical and biological characterisation of a natural immunosuppressor. *Mult. Scler.* **1**, 385-387.

- Dik, W. A., McAnulty, R. J., Versnel, M. A., Naber, B. A., Zimmermann, L. J., Laurent, G. J., and Mutsaers, S. E.** (2003). Short course dexamethasone treatment following injury inhibits bleomycin induced fibrosis in rats. *Thorax* **58**, 765-771.
- Dimova, S., Hoet, P. H., and Nemery, B.** (2001). Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in primary cultures of rat type II pneumocytes and alveolar macrophages. *Drug Metab Dispos.* **29**, 1349-1354.
- Dobbs, L. G., Gonzalez, R., and Williams, M. C.** (1986). An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir. Dis.* **134**, 141-145.
- Donaldson, S. H., Hirsh, A., Li, D. C., Holloway, G., Chao, J., Boucher, R. C., and Gabriel, S. E.** (2002). Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *J Biol Chem.* **277**, 8338-8345.
- Douglas, D., Chen, G., and Khalil, N.** (2002). Increase in the beta chain of hepatocyte growth factor (HGF beta) precedes c-met expression after bleomycin-induced lung injury in the rat. *Exp. Lung Res* **28**, 301-314.
- DuVall, M. D., Zhu, S., Fuller, C. M., and Matalon, S.** (1998). Peroxynitrite inhibits amiloride-sensitive Na⁺ currents in *Xenopus* oocytes expressing alpha beta gamma-rENaC. *Am J Physiol* **274**, C1417-C1423.
- Dypbukt, J. M., Thor, H., and Nicotera, P.** (1990). Intracellular Ca²⁺ chelators prevent DNA damage and protect hepatoma 1C1C7 cells from quinone-induced cell killing. *Free Radic. Res Commun.* **8**, 347-354.

E

- Eaton, D. C., Chen, J., Ramosevac, S., Matalon, S., and Jain, L.** (2004). Regulation of Na⁺ channels in lung alveolar type II epithelial cells. *Proc Am Thorac. Soc.* **1**, 10-16.
- Ecelbarger, C. A. and Tiwari, S.** (2006). Sodium transporters in the distal nephron and disease implications. *Curr. Hypertens. Rep.* **8**, 158-165.
- Effros, R. M., Darin, C., Jacobs, E. R., Rogers, R. A., Krenz, G., and Schneeberger, E. E.** (1997). Water transport and the distribution of aquaporin-1 in pulmonary air spaces. *J Appl. Physiol* **83**, 1002-1016.
- Egan, T. M., Samways, D. S., and Li, Z.** (2006). Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**, 501-512.
- Egli, M., Duplain, H., Lepori, M., Cook, S., Nicod, P., Hummler, E., Sartori, C., and Scherrer, U.** (2004). Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol* **560**, 857-865.
- Estenssoro, E., Dubin, A., Laffaire, E., Canales, H., Saenz, G., Moseinco, M., Pozo, M., Gomez, A., Baredes, N., Jannello, G., and Osatnik, J.** (2002). Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* **30**, 2450-2456.

F

- Factor, P., Dumasius, V., Saldias, F., Brown, L. A., and Sznajder, J. I.** (2000). Adenovirus-mediated transfer of an Na⁺/K⁺-ATPase beta1 subunit gene improves alveolar fluid clearance and survival in hyperoxic rats. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2231-2242.
- Factor, P., Saldias, F., Ridge, K., Dumasius, V., Zabner, J., Jaffe, H. A., Blanco, G., Barnard, M., Mercer, R., Perrin, R., and Sznajder, J. I.** (1998). Augmentation of lung liquid clearance via adenovirus-mediated transfer of a Na,K-ATPase beta1 subunit gene. *J. Clin. Invest* **102**, 1421-1430.
- Fang, X., Fukuda, N., Barbry, P., Sartori, C., Verkman, A. S., and Matthay, M. A.** (2002). Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen. Physiol* **119**, 199-207.

- Farman, N., Talbot, C. R., Boucher, R., Fay, M., Canessa, C., Rossier, B., and Bonvalet, J. P.** (1997). Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract. *Am J Physiol* **272**, C131-C141.
- Fehrenbach, H.** (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res* **2**, 33-46.
- Fehrenbach, H., Kasper, M., Koslowski, R., Pan, T., Schuh, D., Muller, M., and Mason, R. J.** (2000). Alveolar epithelial type II cell apoptosis in vivo during resolution of keratinocyte growth factor-induced hyperplasia in the rat. *Histochem. Cell Biol* **114**, 49-61.
- Fehrenbach, H., Kasper, M., Tschernig, T., Pan, T., Schuh, D., Shannon, J. M., Muller, M., and Mason, R. J.** (1999). Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur. Respir. J* **14**, 534-544.
- Feng, Z. P., Clark, R. B., and Berthiaume, Y.** (1993). Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **9**, 248-254.
- Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P.** (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* **42**, 153-64.
- Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A. M., Rossier, B. C., and Schild, L.** (1998). The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* **17**, 344-352.
- Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A. M., Schneeberger, E., and Rossier, B. C.** (1996). Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc Natl Acad Sci US A* **93**, 15370-15375.
- Floreani, M. and Carpenedo, F.** (1992). The catecholamine-mediated positive inotropic effect of simple quinones is related to superoxide anion generation. *J Pharmacol Exp. Ther.* **260**, 468-473.
- Folkesson, H. G., Matthay, M. A., Frigeri, A., and Verkman, A. S.** (1996). Transepithelial water permeability in microperfused distal airways. Evidence for channel-mediated water transport. *J Clin Invest* **97**, 664-671.
- Folkesson, H. G., Nitenberg, G., Oliver, B. L., Jayr, C., Albertine, K. H., and Matthay, M. A.** (1998). Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin. *Am J Physiol* **275**, L478-L490.
- Folkesson, H. G., Norlin, A., Wang, Y., Abedinpour, P., and Matthay, M. A.** (2000). Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats. *J Appl. Physiol* **88**, 416-424.
- Fotia, A. B., Dinudom, A., Shearwin, K. E., Koch, J. P., Korbmacher, C., Cook, D. I., and Kumar, S.** (2003). The role of individual Nedd4-2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB J* **17**, 70-72.
- Fowler, A. A., Hyers, T. M., Fisher, B. J., Bechard, D. E., Centor, R. M., and Webster, R. O.** (1987). The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk. *Am Rev Respir. Dis.* **136**, 1225-1231.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D.** (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412-426.
- Freeman, B. A., Mason, R. J., Williams, M. C., and Crapo, J. D.** (1986). Antioxidant enzyme activity in alveolar type II cells after exposure of rats to hyperoxia. *Exp. Lung Res* **10**, 203-222.
- Fyfe, G. K. and Canessa, C. M.** (1998). Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel. *J Gen. Physiol* **112**, 423-432.

G

- Garty, H. and Benos, D. J.** (1988). Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev* **68**, 309-373.

- Gazdhar, A., Fachinger, P., van Leer, C., Pierog, J., Gugger, M., Friis, R., Schmid, R. A., and Geiser, T.** (2007). Gene transfer of hepatocyte growth factor by electroporation reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **292**, L529-L536.
- Geiser, T.** (2003). Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss. Med. Wkly.* **133**, 586-590.
- Geiser, T., Ishigaki, M., van Leer, C., Matthay, M. A., and Broaddus, V. C.** (2004). H₂O₂ inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**, L448-L453.
- Geiser, T., Jarreau, P. H., Atabai, K., and Matthay, M. A.** (2000). Interleukin-1 β augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **279**, L1184-L1190.
- Genovese, T., Mazzon, E., Di Paola, R., Muia, C., Threadgill, M. D., Caputi, A. P., Thiemermann, C., and Cuzzocrea, S.** (2005). Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and the development of bleomycin-induced lung injury. *J Pharmacol Exp. Ther.* **313**, 529-538.
- Goodman, B. E., Brown, S. E., and Crandall, E. D.** (1984). Regulation of transport across pulmonary alveolar epithelial cell monolayers. *J Appl. Physiol* **57**, 703-710.
- Grahammer, F., Warth, R., Barhanin, J., Bleich, M., and Hug, M. J.** (2001). The small conductance K⁺ channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J Biol Chem.* **276**, 42268-42275.
- Gregory, T. J., Longmore, W. J., Moxley, M. A., Whitsett, J. A., Reed, C. R., Fowler, A. A., III, Hudson, L. D., Maunder, R. J., Crim, C., and Hyers, T. M.** (1991). Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **88**, 1976-1981.
- Grifoni, S. C., Gannon, K. P., Stec, D. E., and Drummond, H. A.** (2006). ENaC proteins contribute to VSMC migration. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* **291**, H3076-H3086.
- Guglani, L., Jain, S., and Lodha, R.** (2006). Methylprednisolone therapy in a child with unresolving ARDS. *Indian Pediatr.* **43**, 639-642.
- Guidot, D. M., Folkesson, H. G., Jain, L., Sznajder, J. I., Pittet, J. F., and Matthay, M. A.** (2006). Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **291**, L301-L306.
- Guney, S., Schuler, A., Ott, A., Hoschele, S., Zugel, S., Baloglu, E., Bartsch, P., and Mairbaur, H.** (2007a). Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na⁺-K⁺-ATPase and epithelial Na⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **293**, L1332-L1338.
- Guney, S., Schuler, A., Ott, A., Hoschele, S., Zugel, S., Baloglu, E., Bartsch, P., and Mairbaur, H.** (2007b). Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na⁺-K⁺-ATPase and epithelial Na⁺ channels. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **293**, L1332-L1338.

H

- Haddad, J. J., Olver, R. E., and Land, S. C.** (2000). Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* **275**, 21130-21139.
- Haskell, J. F., Yue, G., Benos, D. J., and Matalon, S.** (1994). Upregulation of sodium conductive pathways in alveolar type II cells in sublethal hyperoxia. *Am J Physiol* **266**, L30-L37.
- Hay, J., Shahzeidi, S., and Laurent, G.** (1991). Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* **65**, 81-94.
- HEBB, C. O. and NIMMO-SMITH, R. H.** (1949). Water, chloride and potassium exchanges in isolated blood-perfused dog lungs. *J Physiol* **110**, 468-481.
- Heberlein, W., Wodopia, R., Bartsch, P., and Mairbaur, H.** (2000). Possible role of ROS as mediators of hypoxia-induced ion transport inhibition of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **278**, L640-L648.

- Held, H. D., Boettcher, S., Hamann, L., and Uhlig, S.** (2001). Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir. Crit Care Med.* **163**, 711-716.
- Helms, M. N., Chen, X. J., Ramosevac, S., Eaton, D. C., and Jain, L.** (2006a). Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **290**, L710-L722.
- Helms, M. N., Self, J., Bao, H. F., Job, L. C., Jain, L., and Eaton, D. C.** (2006b). Dopamine activates amiloride-sensitive sodium channels in alveolar type I cells in lung slice preparations. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **291**, L610-L618.
- Henderson, M. C., Krueger, S. K., Stevens, J. F., and Williams, D. E.** (2004). Human flavin-containing monooxygenase form 2 S-oxygenation: sulfenic acid formation from thioureas and oxidation of glutathione. *Chem. Res Toxicol.* **17**, 633-640.
- Holland, J. A., Pritchard, K. A., Pappolla, M. A., Wolin, M. S., Rogers, N. J., and Stemerman, M. B.** (1990). Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* **143**, 21-25.
- Holley, A., Cartner, M., and Lipman, J.** (2007). Acute respiratory distress in a bleomycin primed patient: a new use for nitric oxide. *Anaesth. Intensive Care* **35**, 86-90.
- Hong, K. U., Reynolds, S. D., Giangreco, A., Hurley, C. M., and Stripp, B. R.** (2001). Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **24**, 671-681.
- Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., Fuchs, E., and Stripp, B. R.** (2004). In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **286**, L643-L649.
- Hu, P., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S., and Matalon, S.** (1994). Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. *Am J Physiol* **266**, L628-L634.
- Hughes, M., MacKirdy, F. N., Ross, J., Norrie, J., and Grant, I. S.** (2003). Acute respiratory distress syndrome: an audit of incidence and outcome in Scottish intensive care units. *Anaesthesia* **58**, 838-845.
- Hughey, R. P., Bruns, J. B., Kinlough, C. L., Harkleroad, K. L., Tong, Q., Carattino, M. D., Johnson, J. P., Stockand, J. D., and Kleyman, T. R.** (2004a). Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J Biol Chem.* **279**, 18111-18114.
- Hughey, R. P., Bruns, J. B., Kinlough, C. L., and Kleyman, T. R.** (2004b). Distinct pools of epithelial sodium channels are expressed at the plasma membrane. *J Biol Chem.* **279**, 48491-48494.
- Hughey, R. P., Mueller, G. M., Bruns, J. B., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Harkleroad, K. L., Carattino, M. D., and Kleyman, T. R.** (2003). Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem.* **278**, 37073-37082.
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., and Rossier, B. C.** (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* **12**, 325-328.
- Hummler, E., Barker, P., Talbot, C., Wang, Q., Verdumo, C., Grubb, B., Gatzky, J., Burnier, M., Horisberger, J. D., Beermann, F., Boucher, R., and Rossier, B. C.** (1997). A mouse model for the renal salt-wasting syndrome pseudohypoaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11710-11715.
- Hung, C. H., Chen, L. C., Zhang, Z., Chowdhury, B., Lee, W. L., Plunkett, B., Chen, C. H., Myers, A. C., and Huang, S. K.** (2004). Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. *J Allergy Clin Immunol.* **114**, 664-670.

- Idell, S., Gonzalez, K., Bradford, H., MacArthur, C. K., Fein, A. M., Maunder, R. J., Garcia, J. G., Griffith, D. E., Weiland, J., Martin, T. R., and .** (1987a). Procoagulant activity in bronchoalveolar lavage in the adult respiratory distress syndrome. Contribution of tissue factor associated with factor VII. *Am Rev Respir. Dis.* **136**, 1466-1474.
- Idell, S., Kueppers, F., Lippmann, M., Rosen, H., Niederman, M., and Fein, A.** (1987b). Angiotensin converting enzyme in bronchoalveolar lavage in ARDS. *Chest* **91**, 52-56.
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M. A., Fukamizu, A., Hui, C. C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A. S., Jiang, C., and Penninger, J. M.** (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* **436**, 112-116.
- Iovine, N.M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M.J., Weinrauch, Y.** (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* **76**, 986-93.

J

- Janssen, Y. M., Van Houten, B., Borm, P. J., and Mossman, B. T.** (1993). Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* **69**, 261-274.
- Jeong, J. S., Lee, H. J., Jung, J. S., Shin, S. H., Son, Y. J., Yoon, J. H., Lee, S. H., Lee, H. S., Yun, I., and Hwang, T. H.** (2001). Characterization of inwardly rectifying K(+) conductance across the basolateral membrane of rat tracheal epithelia. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **288**, 914-920.
- Ji, H. L., Bishop, L. R., Anderson, S. J., Fuller, C. M., and Benos, D. J.** (2004). The role of Pre-H2 domains of alpha- and delta-epithelial Na⁺ channels in ion permeation, conductance, and amiloride sensitivity. *J Biol Chem.* **279**, 8428-8440.
- Jiang, X., Ingbar, D. H., and O'Grady, S. M.** (1998). Adrenergic stimulation of Na⁺ transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl⁻ channels. *Am J Physiol* **275**, C1610-C1620.
- Johansson, S., Wennergren, G., Aberg, N., and Rudin, A.** (2007). Clara cell 16-kd protein downregulates T(H)2 differentiation of human naive neonatal T cells. *J Allergy Clin Immunol.* **120**, 308-314.
- Johnson, M. D.** (2007). Ion transport in alveolar type I cells. *Mol. Biosyst.* **3**, 178-186.
- Johnson, M. D., Bao, H. F., Helms, M. N., Chen, X. J., Tigue, Z., Jain, L., Dobbs, L. G., and Eaton, D. C.** (2006). Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4964-4969.
- Johnson, M. D., Widdicombe, J. H., Allen, L., Barbry, P., and Dobbs, L. G.** (2002). Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1966-1971.
- Jones, G. S., Miles, P. R., Lantz, R. C., Hinton, D. E., and Castranova, V.** (1982). Ionic content and regulation of cellular volume in rat alveolar type II cells. *J Appl. Physiol* **53**, 258-266.
- Jorens, P. G., Sibille, Y., Goulding, N. J., van Overveld, F. J., Herman, A. G., Bossaert, L., De Backer, W. A., Lauwerys, R., Flower, R. J., and Bernard, A.** (1995). Potential role of Clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury. *Eur. Respir. J* **8**, 1647-1653.
- Jovanovic, S., Land, S. C., Olver, R. E., and Wilson, S. M.** (2001). Hypoxic activation of an amiloride-sensitive cation conductance in alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **286**, 622-627.
- Jules-Elysee, K. and White, D. A.** (1990). Bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Clin Chest Med.* **11**, 1-20.
- Junor, R. W., Benjamin, A. R., Alexandrou, D., Guggino, S. E., and Walters, D. V.** (1999). A novel role for cyclic nucleotide-gated cation channels in lung liquid homeostasis in sheep. *J Physiol* **520 Pt 1**, 255-260.

K

- Karmouty-Quintana, H., Cannet, C., Zurbruegg, S., Ble, F. X., Fozard, J. R., Page, C. P., and Beckmann, N.** (2007). Bleomycin-induced lung injury assessed noninvasively and in spontaneously breathing rats by proton MRI. *J Magn Reson. Imaging* **26**, 941-949.
- Kellenberger, S., Gautschi, I., Rossier, B. C., and Schild, L.** (1998). Mutations causing Liddle syndrome reduce sodium-dependent downregulation of the epithelial sodium channel in the *Xenopus* oocyte expression system. *J Clin Invest* **101**, 2741-2750.
- Kellenberger, S., Gautschi, I., and Schild, L.** (2003). Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. *Mol. Pharmacol* **64**, 848-856.
- Kellenberger, S. and Schild, L.** (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* **82**, 735-767.
- Kemp, P. J., MacGregor, G. G., and Olver, R. E.** (1993). G protein-regulated large-conductance chloride channels in freshly isolated fetal type II alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **265**, L323-L329.
- Kemp, P. J., Roberts, G. C., and Boyd, C. A.** (1994). Identification and properties of pathways for K⁺ transport in guinea-pig and rat alveolar epithelial type II cells. *J Physiol* **476**, 79-88.
- Kemsley, J. N., Zaleski, K. L., Chow, M. S., Decker, A., Shishova, E. Y., Wasinger, E. C., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I.** (2003). Spectroscopic studies of the interaction of ferrous bleomycin with DNA. *J Am Chem. Soc.* **125**, 10810-10821.
- Kerem, E., Bistritzer, T., Hanukoglu, A., Hofmann, T., Zhou, Z., Bennett, W., MacLaughlin, E., Barker, P., Nash, M., Quittell, L., Boucher, R., and Knowles, M. R.** (1999). Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. *N.Engl.J Med.* **341**, 156-162.
- Kiely, D. G., Cargill, R. I., Wheeldon, N. M., Coutie, W. J., and Lipworth, B. J.** (1997). Haemodynamic and endocrine effects of type 1 angiotensin II receptor blockade in patients with hypoxaemic cor pulmonale. *Cardiovasc. Res.* **33**, 201-208.
- Kietzmann, D., Kahl, R., Muller, M., Burchardi, H., and Kettler, D.** (1993). Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* **19**, 78-81.
- Kim, K. J. and Suh, D. J.** (1993). Asymmetric effects of H₂O₂ on alveolar epithelial barrier properties. *Am J Physiol* **264**, L308-L315.
- King, M.** (1987). Role of mucus viscoelasticity in clearance by cough. *Eur. J Respir. Dis. Suppl* **153**, 165-172.
- Kinnula, V. L., Chang, L., Everitt, J. I., and Crapo, J. D.** (1992a). Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol* **262**, L69-L77.
- Kinnula, V. L., Chang, L. Y., Ho, Y. S., and Crapo, J. D.** (1992b). Hydrogen peroxide release from alveolar macrophages and alveolar type II cells during adaptation to hyperoxia in vivo. *Exp. Lung Res* **18**, 655-673.
- Kleyman, T. R., Kraehenbuhl, J. P., and Ernst, S. A.** (1991). Characterization and cellular localization of the epithelial Na⁺ channel. Studies using an anti-Na⁺ channel antibody raised by an antiidiotypic route. *J Biol Chem.* **266**, 3907-3915.
- Knowles, M., Murray, G., Shallal, J., Askin, F., Ranga, V., Gatzky, J., and Boucher, R.** (1984). Bioelectric properties and ion flow across excised human bronchi. *J Appl. Physiol* **56**, 868-877.

- Koontz, C. S., Higdon, K. K., Ploger, T. L., Dart, B. W., Richart, C. M., and Maxwell, R. A.** (2006). Glucocorticoid rescue for late-phase acute respiratory distress syndrome in trauma/surgical critical care patients. *Am Surg* **72**, 644-648.
- Kopprasch, S., Gatzweiler, A., Graessler, J., and Schroder, H. E.** (1997). Beta-adrenergic modulation of FMLP- and zymosan-induced intracellular and extracellular oxidant production by polymorphonuclear leukocytes. *Mol.Cell Biochem* **168**, 133-139.
- Kreda, S. M., Gynn, M. C., Fenstermacher, D. A., Boucher, R. C., and Gabriel, S. E.** (2001). Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir.Cell Mol.Biol* **24**, 224-234.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., Slutsky, A. S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C., and Penninger, J. M.** (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat.Med.* **11**, 875-879.
- Kumar, K. V., Rao, S. M., Gayani, R., Mohan, I. K., and Naidu, M. U.** (2000). Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin Chim.Acta* **298**, 111-120.

L

- Lamb, N. J., Gutteridge, J. M., Baker, C., Evans, T. W., and Quinlan, G. J.** (1999). Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med* **27**, 1738-1744.
- Lang, J. D., McArde, P. J., O'Reilly, P. J., and Matalon, S.** (2002). Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* **122**, 314S-320S.
- Langridge-Smith, J. E.** (1986). Interaction between sodium and chloride transport in bovine tracheal epithelium. *J Physiol* **376**, 299-319.
- Lazrak, A. and Matalon, S.** (2003). cAMP-induced changes of apical membrane potentials of confluent H441 monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **285**, L443-L450.
- Lee, J. W., Fang, X., Dolganov, G., Fremont, R. D., Bastarache, J. A., Ware, L. B., and Matthay, M. A.** (2007). Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells. *J Biol Chem* **282**, 24109-24119.
- Lee, S. Y., Maniak, P. J., Ingbar, D. H., and O'Grady, S. M.** (2003a). Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K⁺ channels that are located in apical membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1614-C1624.
- Lee, S. Y., Maniak, P. J., Rhodes, R., Ingbar, D. H., and O'Grady, S. M.** (2003b). Basolateral Cl⁻ transport is stimulated by terbutaline in adult rat alveolar epithelial cells. *J Membr.Biol* **191**, 133-139.
- Lee, V. Y., Schroedl, C., Brunelle, J. K., Buccellato, L. J., Akinci, O. I., Kaneto, H., Snyder, C., Eisenbart, J., Budinger, G. R., and Chandel, N. S.** (2005). Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **289**, L521-L528.
- Lee, Y. C., Yellowley, C. E., Li, Z., Donahue, H. J., and Rannels, D. E.** (1997). Expression of functional gap junctions in cultured pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **272**, L1105-L1114.
- Lenz, A. G., Jorens, P. G., Meyer, B., De Backer, W., Van Overveld, F., Bossaert, L., and Maier, K. L.** (1999). Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur.Respir.J* **13**, 169-174.
- Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., and Brochiero, E.** (2004). Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **286**, L1027-L1037.

- Leroy, C., Privé, A., Bourret, J. C., Berthiaume, Y., Ferraro, P., and Brochiero, E.** (2006). Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L1207-19.
- Lesur, O., Arsalane, K., and Lane, D.** (1996). Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *Am J Physiol* **270**, L311-L319.
- Li, H. P., Li, X., He, G. J., Yi, X. H., and Kaplan, A. P.** (2004). The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respirology* **9**, 25-32.
- Li, T. and Folkesson, H. G.** (2006). RNA interference for alpha-ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **290**, L649-L660.
- Liley, H. G., Ertsey, R., Gonzales, L. W., Odom, M. W., Hawgood, S., Dobbs, L. G., and Ballard, P. L.** (1988). Synthesis of surfactant components by cultured type II cells from human lung. *Biochim. Biophys. Acta* **961**, 86-95.
- Lin, H. H., Zentner, M. D., Ho, H. L., Kim, K. J., and Ann, D. K.** (1999). The gene expression of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is regulated by antagonistic effects between glucocorticoid hormone and ras pathways in salivary epithelial cells. *J Biol Chem.* **274**, 21544-21554.
- Lindert, J., Perlman, C. E., Parthasarathi, K., and Bhattacharya, J.** (2007). Chloride-dependent secretion of alveolar wall liquid determined by optical-sectioning microscopy. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **36**, 688-696.
- Lock, H. and Valverde, M. A.** (2000). Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J Biol Chem.* **275**, 34849-34852.
- Looney, M. R., Sartori, C., Chakraborty, S., James, P. F., Lingrel, J. B., and Matthay, M. A.** (2005). Decreased expression of both the alpha1- and alpha2-subunits of the Na-K-ATPase reduces maximal alveolar epithelial fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **289**, L104-L110.
- Lu, Y., Song, Z., Zhou, X., Huang, S., Zhu, D., Yang, C. B., X, Sun, B., and Spragg, R.** (2004). A 12-month clinical survey of incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in Shanghai intensive care units. *Intensive Care Med.* **30**, 2197-2203.
- Lubman, R. L. and Crandall, E. D.** (1994). Polarized distribution of Na(+)-H⁺ antiport activity in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **266**, L138-L147.
- Lubman, R. L., Danto, S. I., Chao, D. C., Fricks, C. E., and Crandall, E. D.** (1995). Cl(-)-HCO₃⁻ exchanger isoform AE2 is restricted to the basolateral surface of alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **12**, 211-219.
- Lum, H. and Roebuck, K. A.** (2001). Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C719-C741.

M

- MacVinish, L. J., Hickman, M. E., Mufti, D. A., Durrington, H. J., and Cuthbert, A. W.** (1998). Importance of basolateral K⁺ conductance in maintaining Cl⁻ secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol* **510** (Pt 1), 237-247.
- Madtes, D. K., Busby, H. K., Strandjord, T. P., and Clark, J. G.** (1994). Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **11**, 540-551.
- Maina, J. N. and West, J. B.** (2005). Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol Rev* **85**, 811-844.
- Mall, M., Grubb, B.R., Harkema, J.R., O'Neal, W.K., Boucher, R.C.** (2004). Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* **10**, 487-93.

- Mansour, H., Levacher, M., Azoulay-Dupuis, E., Moreau, J., Marquetty, C., and Gougerot-Pocidalò, M. A.** (1988). Genetic differences in response to pulmonary cytochrome P-450 inducers and oxygen toxicity. *J Appl. Physiol* **64**, 1376-1381.
- Manzano, F., Yuste, E., Colmenero, M., Aranda, A., Garcia-Horcajadas, A., Rivera, R., and Fernandez-Mondejar, E.** (2005). Incidence of acute respiratory distress syndrome and its relation to age. *J Crit Care* **20**, 274-280.
- Mason, R. J., Leslie, C. C., McCormick-Shannon, K., Deterding, R. R., Nakamura, T., Rubin, J. S., and Shannon, J. M.** (1994). Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **11**, 561-567.
- Mason, R. J., Williams, M. C., Widdicombe, J. H., Sanders, M. J., Misfeldt, D. S., and Berry, L. C., Jr.** (1982). Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6033-6037.
- Matalon, S., Benos, D. J., and Jackson, R. M.** (1996). Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na⁺ channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **271**, L1-22.
- Mathru, M., Rooney, M. W., Dries, D. J., Hirsch, L. J., Barnes, L., and Tobin, M. J.** (1994). Urine hydrogen peroxide during adult respiratory distress syndrome in patients with and without sepsis. *Chest* **105**, 232-236.
- Matsushita, K., McCray, P. B., Jr., Sigmund, R. D., Welsh, M. J., and Stokes, J. B.** (1996). Localization of epithelial sodium channel subunit mRNAs in adult rat lung by in situ hybridization. *Am J Physiol* **271**, L332-L339.
- Matthay, M. A.** (2002). Alveolar fluid clearance in patients with ARDS: does it make a difference? *Chest* **122**, 340S-343S.
- Matthay, M. A., Flori, H. R., Conner, E. R., and Ware, L. B.** (1998). Alveolar epithelial fluid transport: basic mechanisms and clinical relevance. *Proc Assoc. Am Physicians* **110**, 496-505.
- Matthay, M. A., Folkesson, H. G., and Clerici, C.** (2002). Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* **82**, 569-600.
- Matthay, M. A., Folkesson, H. G., and Verkman, A. S.** (1996). Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am J Physiol* **270**, L487-L503.
- Matthay, M. A., Robriquet, L., and Fang, X.** (2005). Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proc Am Thorac. Soc.* **2**, 206-213.
- Matthay, M. A. and Wiener-Kronish, J. P.** (1990). Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir. Dis.* **142**, 1250-1257.
- McNicholas, C. M. and Canessa, C. M.** (1997). Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *J Gen. Physiol* **109**, 681-692.
- Meban, C.** (1987). Cytochemistry of the gas-exchange area in vertebrate lungs. *Prog. Histochem. Cytochem.* **17**, 1-54.
- Meduri, G. U., Golden, E., Freire, A. X., Taylor, E., Zaman, M., Carson, S. J., Gibson, M., and Umberger, R.** (2007). Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial. *Chest* **131**, 954-963.
- Meduri, G. U., Muthiah, M. P., Carratu, P., Eltorkey, M., and Chrousos, G. P.** (2005). Nuclear factor-kappaB- and glucocorticoid receptor alpha- mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome. Evidence for inflammation-induced target tissue resistance to glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation.* **12**, 321-338.
- Metnitz, P. G., Bartens, C., Fischer, M., Fridrich, P., Steltzer, H., and Druml, W.** (1999). Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **25**, 180-185.
- Mies, F., Spriet, C., Heliot, L., and Sariban-Sohraby, S.** (2007). Epithelial Na⁺ channel stimulation by n-3 fatty acids requires proximity to a membrane-bound A-kinase-anchoring protein complexed with protein kinase A and phosphodiesterase. *J Biol Chem.* **282**, 18339-18347.

- Minakata, Y., Suzuki, S., Grygorczyk, C., Dagenais, A., and Berthiaume, Y.** (1998). Impact of beta-adrenergic agonist on Na⁺ channel and Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am J Physiol* **275**, L414-L422.
- Modelska, K., Matthay, M. A., Brown, L. A., Deutch, E., Lu, L. N., and Pittet, J. F.** (1999). Inhibition of beta-adrenergic-dependent alveolar epithelial clearance by oxidant mechanisms after hemorrhagic shock. *Am J Physiol* **276**, L844-L857.
- Murray, J. F., Matthay, M. A., Luce, J. M., and Flick, M. R.** (1988). An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir. Dis.* **138**, 720-723.
- Myerburg, M. M., Butterworth, M. B., McKenna, E. E., Peters, K. W., Frizzell, R. A., Kleyman, T. R., and Pilewski, J. M.** (2006). Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: a mechanism for sodium hyperabsorption in cystic fibrosis. *J Biol Chem.* **281**, 27942-27949.

N

- Nakamura, J., La, D. K., and Swenberg, J. A.** (2000). 5'-nicked apurinic/aprimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *J Biol Chem.* **275**, 5323-5328.
- Nakamura, T.** (1994). Hepatocyte growth factor as mitogen, motogen and morphogen, and its roles in organ regeneration. *Princess Takamatsu Symp.* **24**, 195-213.
- Nguyen, M. D. and Simpson-Haidaris, P. J.** (2000). Cell type-specific regulation of fibrinogen expression in lung epithelial cells by dexamethasone and interleukin-1beta. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **22**, 209-217.
- Norlin, A., Baines, D. L., and Folkesson, H. G.** (1999). Role of endogenous cortisol in basal liquid clearance from distal air spaces in adult guinea-pigs. *J Physiol* **519 Pt 1**, 261-272.
- Norlin, A., Lu, L. N., Guggino, S. E., Matthay, M. A., and Folkesson, H. G.** (2001). Contribution of amiloride-insensitive pathways to alveolar fluid clearance in adult rats. *J Appl. Physiol* **90**, 1489-1496.

O

- O'Dowd, Y. M., El Benna, J., Perianin, A., and Newsholme, P.** (2004). Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. *Biochem. Pharmacol* **67**, 183-190.
- O'Grady, S. M. and Lee, S. Y.** (2003). Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **284**, L689-L700.
- Oliveira, R. H. and Basille, F. A.** (2006). Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. *J Bras. Pneumol.* **32**, 35-42.
- Olivier, R., Scherrer, U., Horisberger, J. D., Rossier, B. C., and Hummler, E.** (2002). Selected contribution: limiting Na(+) transport rate in airway epithelia from alpha-ENaC transgenic mice: a model for pulmonary edema. *J. Appl. Physiol* **93**, 1881-1887.
- Onderwater, R. C., Commandeur, J. N., Groot, E. J., Sitters, A., Menge, W. M., and Vermeulen, N. P.** (1998). Cytotoxicity of a series of mono- and di-substituted thiourea in freshly isolated rat hepatocytes: a preliminary structure-toxicity relationship study. *Toxicology* **125**, 117-129.
- Onderwater, R. C., Commandeur, J. N., Menge, W. M., and Vermeulen, N. P.** (1999). Activation of microsomal glutathione S-transferase and inhibition of cytochrome P450 1A1 activity as a model system for detecting protein alkylation by thiourea-containing compounds in rat liver microsomes. *Chem. Res Toxicol.* **12**, 396-402.

- Otto, W. R.** (2002). Lung epithelial stem cells. *J Pathol.* **197**, 527-535.
- Otulakowski, G., Duan, W., Gandhi, S., and O'Brodovich, H.** (2007). Steroid and oxygen effects on eIF4F complex, mTOR, and ENaC translation in fetal lung epithelia. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **37**, 457-466.
- Otulakowski, G., Freywald, T., Wen, Y., and O'Brodovich, H.** (2001). Translational activation and repression by distinct elements within the 5'-UTR of ENaC alpha-subunit mRNA. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **281**, L1219-L1231.
- Otulakowski, G., Rafii, B., Harris, M., and O'Brodovich, H.** (2006). Oxygen and glucocorticoids modulate alphaENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **34**, 204-212.
- Otulakowski, G., Rafii, B., and O'Brodovich, H.** (2004). Differential translational efficiency of ENaC subunits during lung development. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **30**, 862-870.

P

- Pacht, E. R., Timerman, A. P., Lykens, M. G., and Merola, A. J.** (1991). Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **100**, 1397-1403.
- Panus, P. C., Matalon, S., and Freeman, B. A.** (1989). Responses of type II pneumocyte antioxidant enzymes to normoxic and hyperoxic culture. *In Vitro Cell Dev. Biol* **25**, 821-829.
- Phalen, R. F. and Oldham, M. J.** (1983). Tracheobronchial airway structure as revealed by casting techniques. *Am Rev Respir. Dis.* **128**, S1-S4.
- Pitkanen, O. M., Smith, D., O'Brodovich, H., and Otulakowski, G.** (2001). Expression of alpha-, beta-, and gamma-hENaC mRNA in the human nasal, bronchial, and distal lung epithelium. *Am J Respir. Crit Care Med.* **163**, 273-276.
- Planes, C., Blot-Chabaud, M., Matthay, M. A., Couette, S., Uchida, T., and Clerici, C.** (2002). 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.
- Planes, C., Leyvraz, C., Uchida, T., Angelova, M. A., Vuagniaux, G., Hummler, E., Matthay, M., Clerici, C., and Rossier, B.** (2005). In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **288**, L1099-L1109.
- Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., and Rotin, D.** (1997). The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization. *J Biol Chem.* **272**, 32329-32336.
- Prince, L. S., Karp, P. H., Moninger, T. O., and Welsh, M. J.** (2001). KGF alters gene expression in human airway epithelia: potential regulation of the inflammatory response. *Physiol Genomics* **6**, 81-89.
- Pugin, J., Verghese, G., Widmer, M. C., and Matthay, M. A.** (1999). The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* **27**, 304-312.

Q

- Qi, J., Peters, K. W., Liu, C., Wang, J. M., Edinger, R. S., Johnson, J. P., Watkins, S. C., and Frizzell, R. A.** (1999). Regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by syntaxin 1A. *J Biol Chem.* **274**, 30345-30348.
- Qiao, R., Yan, W., Clavijo, C., Mehrian-Shai, R., Zhong, Q., Kim, K. J., Ann, D., Crandall, E. D., and Borok, Z.** (2008). Effects of KGF on alveolar epithelial cell transdifferentiation are mediated by JNK signaling. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **38**, 239-246.

Qiu, H. B., Sun, H. M., Yang, Y., Zhuang, Y. G., Chen, Y., and Chen, Y. M. (2006). [Effect of beta-adrenergic agonist on alveolar fluid clearance in acute lung injury: an experiment with rats]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* **86**, 187-191.

R

- Raaberg, L., Nexø, E., Buckley, S., Luo, W., Snead, M. L., and Warburton, D.** (1992). Epidermal growth factor transcription, translation, and signal transduction by rat type II pneumocytes in culture. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **6**, 44-49.
- Rafii, B., Tanswell, A. K., Otulakowski, G., Pitkanen, O., Belcastro-Taylor, R., and O'Brodoovich, H.** (1998). O₂-induced ENaC expression is associated with NF-kappaB activation and blocked by superoxide scavenger. *Am J Physiol* **275**, L764-L770.
- Randrianarison, N. H., Clerici, C., Ferreira, C., Fontayne, A., Pradervand, S., Fowler-Jaeger, N., Hummler, E., Rossier, B. C., and Planes, C. I.** (2007). Low expression of the {beta}-ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol.*
- Reddy, R., Buckley, S., Doerken, M., Barsky, L., Weinberg, K., Anderson, K. D., Warburton, D., and Driscoll, B.** (2004). Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **286**, L658-L667.
- Reynolds, S. D., Giangreco, A., Hong, K. U., McGrath, K. E., Ortiz, L. A., and Stripp, B. R.** (2004). Airway injury in lung disease pathophysiology: selective depletion of airway stem and progenitor cell pools potentiates lung inflammation and alveolar dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**, L1256-L1265.
- Reynolds, S. D., Reynolds, P. R., Snyder, J. C., Whyte, F., Paavola, K. J., and Stripp, B. R.** (2007). CCSP regulates cross talk between secretory cells and both ciliated cells and macrophages of the conducting airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **293**, L114-L123.
- Rice, W. R., Conkright, J. J., Na, C. L., Ikegami, M., Shannon, J. M., and Weaver, T. E.** (2002). Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **283**, L256-L264.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and .** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
- Rochelle, L. G., Li, D. C., Ye, H., Lee, E., Talbot, C. R., and Boucher, R. C.** (2000). Distribution of ion transport mRNAs throughout murine nose and lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **279**, L14-L24.
- Ropke, M., Carstens, S., Holm, M., and Frederiksen, O.** (1996). Ion transport mechanisms in native rabbit nasal airway epithelium. *Am J Physiol* **271**, L637-L645.
- Ross, D., Thor, H., Threadgill, M. D., Sandy, M. S., Smith, M. T., Moldeus, P., and Orrenius, S.** (1986). The role of oxidative processes in the cytotoxicity of substituted 1,4-naphthoquinones in isolated hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **248**, 460-466.
- Rotin, D.** (2000). Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9**, 529-534.

S

- Sagnella, G. A. and Swift, P. A.** (2006). The renal epithelial sodium channel: genetic heterogeneity and implications for the treatment of high blood pressure. *Curr. Pharm. Des* **12**, 2221-2234.
- Sakka, S. G., Klein, M., Reinhart, K., and Meier-Hellmann, A.** (2002). Prognostic value of extravascular lung water in critically ill patients. *Chest* **122**, 2080-2086.
- Sakuma, T., Gu, X., Sugita, M., Sagawa, M., Sakuda, M., and Toga, H.** (2005). Catecholamine clearance from alveolar spaces of rat and human lungs. *Respiration* **72**, 189-196.

- Sakuma, T., Takahashi, K., Ohya, N., Nakada, T., and Matthay, M. A.** (1998). Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol Toxicol.* **83**, 16-22.
- Sakuma, T., Tsukano, C., Ishigaki, M., Nambu, Y., Osanai, K., Toga, H., Takahashi, K., Ohya, N., Kurihara, T., Nishio, M., and Matthay, M. A.** (2000). Lung deflation impairs alveolar epithelial fluid transport in ischemic rabbit and rat lungs. *Transplantation* **69**, 1785-1793.
- Saumon, G. and Basset, G.** (1993). Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium. *J Appl. Physiol* **74**, 1-15.
- Saumon, G., Seigne, E., and Clerici, C.** (1990). Evidence for a sodium-dependent sugar transport in rat tracheal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 313-318.
- Saxena, S., Quick, M. W., Tousson, A., Oh, Y., and Warnock, D. G.** (1999). Interaction of syntaxins with the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* **274**, 20812-20817.
- Saxena, S. K., George, C. M., Pinskiy, V., and McConnell, B.** (2006). Epithelial sodium channel is regulated by SNAP-23/syntaxin 1A interplay. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **343**, 1279-1285.
- Saxena, S. K., Singh, M., Kaur, S., and George, C.** (2007). Distinct domain-dependent effect of syntaxin1A on amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) currents in HT-29 colonic epithelial cells. *Int J Biol Sci* **3**, 47-56.
- Sayegh, R., Auerbach, S. D., Li, X., Loftus, R. W., Husted, R. F., Stokes, J. B., and Thomas, C. P.** (1999). Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene. *J Biol Chem.* **274**, 12431-12437.
- Schild, L., Schneeberger, E., Gautschi, I., and Firsov, D.** (1997). Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen. Physiol* **109**, 15-26.
- Schnackenberg, B. J., Jones, S. M., Pate, C., Shank, B., Sessions, L., Pittman, L. M., Cornett, L. E., and Kurten, R. C.** (2006). The beta-agonist isoproterenol attenuates EGF-stimulated wound closure in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **290**, L485-L491.
- Schneeberger, E. E., Walters, D. V., and Olver, R. E.** (1978). Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb. *J Cell Sci* **32**, 307-324.
- Schneider, G. T., Cook, D. I., Gage, P. W., and Young, J. A.** (1985). Voltage sensitive, high-conductance chloride channels in the luminal membrane of cultured pulmonary alveolar (type II) cells. *Pflugers Arch.* **404**, 354-357.
- Schwarz, M. A.** (2001). Acute lung injury: cellular mechanisms and derangements. *Paediatr. Respir. Rev* **2**, 3-9.
- Schwiebert, E. M., Flotte, T., Cutting, G. R., and Guggino, W. B.** (1994). Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am J Physiol* **266**, C1464-C1477.
- Schwiebert, E. M., Potter, E. D., Hwang, T. H., Woo, J. S., Ding, C., Qiu, W., Guggino, W. B., Levine, M. A., and Guggino, S. E.** (1997). cGMP stimulates sodium and chloride currents in rat tracheal airway epithelia. *Am J Physiol* **272**, C911-C922.
- Seeger, W., Elssner, A., Gunther, A., Kramer, H. J., and Kalinowski, H. O.** (1993a). Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **9**, 213-220.
- Seeger, W., Gunther, A., Walmrath, H. D., Grimminger, F., and Lasch, H. G.** (1993b). Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects. *Clin Investig.* **71**, 177-190.

- Senyk, O., Ismailov, I., Bradford, A. L., Baker, R. R., Matalon, S., and Benos, D. J. (1995). Reconstitution of immunopurified alveolar type II cell Na⁺ channel protein into planar lipid bilayers. *Am J Physiol* **268**, C1148-C1156.
- Shimabukuro, D. W., Sawa, T., and Gropper, M. A. (2003). Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med*. **31**, S524-S531.
- Shimkets, R. A., Lifton, R. P., Canessa, C. M. (1997). The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* **272**, 25537-25541.
- Shlyonsky, V., Goolaerts, A., Mies, F., and Naeije, R. (2008). Electrophysiological Characterization of Rat Type II Pneumocytes in situ. *Am J Respir. Cell Mol. Biol.*
- Shu, L. H., Wei, K. L., Xue, X. D., Han, X. H., Shang, Y. X., Cai, X. X., Liu, C. F., Li, J. J., and Wang, L. J. (2007a). Effects of dexamethasone on the ultrastructure of alveolar type II cells in young rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Zhongguo Dang.Dai Er.Ke.Za Zhi.* **9**, 521-525.
- Shu, L. H., Xue, X. D., Shu, L. H., Liu, C. F., Han, X. H., Wu, H. M., Shang, Y. X., Cai, X. X., and Wei, K. L. (2007b). Effect of dexamethasone on the content of pulmonary surfactant protein D in young rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Zhongguo Dang.Dai Er.Ke.Za Zhi.* **9**, 155-158.
- Sigaud, S., Evelson, P., and Gonzalez-Flecha, B. (2005). H₂O₂-induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAP kinases. *Antioxid.Redox.Signal.* **7**, 6-13.
- Sigvaldason, K., Thornormar, K., Bergmann, J. B., Reynisson, K., Magnusdottir, H., Stefansson, T. S., and Jonsson, S. (2006). [The incidence and mortality of ARDS in Icelandic intensive care units 1988-1997]. *Laeknabladid.* **92**, 201-207.
- Sleigh, M. A., Blake, J. R., and Liron, N. (1988). The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir.Dis.* **137**, 726-741.
- Snyder, P. M. (2000). Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na(+) channel to the cell surface. *J Clin Invest* **105**, 45-53.
- Snyder, P. M. (2002). The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺-homeostasis and hypertension. *Endocr Rev* **23**, 258-275.
- Snyder, P. M., Cheng, C., Prince, L. S., Rogers, J. C., and Welsh, M. J. (1998). Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem.* **273**, 681-684.
- Song, Y., Fukuda, N., Bai, C., Ma, T., Matthay, M. A., and Verkman, A. S. (2000). Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *J Physiol* **525 Pt 3**, 771-779.
- Sostman, H. D., Matthay, R. A., and Putman, C. E. (1977). Cytotoxic drug-induced lung disease. *Am J Med.* **62**, 608-615.
- Steel, D. M., Graham, A., Geddes, D. M., and Alton, E. W. (1994). Characterization and comparison of ion transport across sheep and human airway epithelium. *Epithelial Cell Biol* **3**, 24-31.
- Steinberg, K. P., Hudson, L. D., Goodman, R. B., Hough, C. L., Lancken, P. N., Hyzy, R., Thompson, B. T., and Ancukiewicz, M. (2006). Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J Med.* **354**, 1671-1684.
- Stern, J. B., Fierobe, L., Paugam, C., Rolland, C., Dehoux, M., Petiet, A., Dombret, M. C., Mantz, J., Aubier, M., and Crestani, B. (2000). Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med.* **28**, 2326-2333.
- Stripp, B. R., Reynolds, S. D., Boe, I. M., Lund, J., Power, J. H., Coppens, J. T., Wong, V., Reynolds, P. R., and Plopper, C. G. (2002). Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **27**, 170-178.
- Stutts, M. J., Gatzky, J. T., and Boucher, R. C. (1988). Activation of chloride conductance induced by potassium in tracheal epithelium. *Pflugers Arch.* **411**, 252-258.

- Sznajder, J. I.** (1999). Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. *Am J Respir. Crit Care Med.* **160**, 1441-1442.
- Sznajder, J. I., Olivera, W. G., Ridge, K. M., and Rutschman, D. H.** (1995). Mechanisms of lung liquid clearance during hyperoxia in isolated rat lungs. *Am J Respir. Crit Care Med.* **151**, 1519-1525.

T

- Takaro, T., Parra, S. C., and Peduzzi, P. N.** (1985). Anatomical relationships between type II pneumocytes and alveolar septal gaps in the human lung. *Anat. Rec.* **213**, 540-550.
- Tarran, R.** (2004). Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac. Soc.* **1**, 42-46.
- Tarran, R., Grubb, B. R., Gatzky, J. T., Davis, C. W., and Boucher, R. C.** (2001). The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen. Physiol* **118**, 223-236.
- Tate, R. M., Vanbenthuyzen, K. M., Shasby, D. M., McMurtry, I. F., and Repine, J. E.** (1982). Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir. Dis.* **126**, 802-806.
- Tchepichev, S., Ueda, J., Canessa, C., Rossier, B. C., and O'Brodivich, H.** (1995). Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *Am J Physiol* **269**, C805-C812.
- Teiwes, J. and Toto, R. D.** (2007). Epithelial sodium channel inhibition in cardiovascular disease. A potential role for amiloride. *Am J Hypertens.* **20**, 109-117.
- Tesfaigzi, J., Johnson, N. F., and Lechner, J. F.** (1996). Induction of EGF receptor and erbB-2 during endotoxin-induced alveolar type II cell proliferation in the rat lung. *Int J Exp. Pathol.* **77**, 143-154.
- Thomas, C. P., Auerbach, S., Stokes, J. B., and Volk, K. A.** (1998). 5' heterogeneity in epithelial sodium channel alpha-subunit mRNA leads to distinct NH2-terminal variant proteins. *Am J Physiol* **274**, C1312-C1323.
- Thomas, C. P., Campbell, J. R., Wright, P. J., and Husted, R. F.** (2004). cAMP-stimulated Na⁺ transport in H441 distal lung epithelial cells: role of PKA, phosphatidylinositol 3-kinase, and sgk1. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**, L843-L851.
- Thomsen, G. E. and Morris, A. H.** (1995). Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. *Am J Respir. Crit Care Med.* **152**, 965-971.
- Thrall, R. S., McCormick, J. R., Jack, R. M., McReynolds, R. A., and Ward, P. A.** (1979). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol.* **95**, 117-130.
- Tomashefski, J. F., Jr.** (1990). Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* **11**, 593-619.
- Toward, T. J. and Broadley, K. J.** (2002). Airway function, oedema, cell infiltration and nitric oxide generation in conscious ozone-exposed guinea-pigs: effects of dexamethasone and rolipram. *Br J Pharmacol* **136**, 735-745.
- Trapnell, B. C., Chu, C. S., Paakko, P. K., Banks, T. C., Yoshimura, K., Ferrans, V. J., Chernick, M. S., and Crystal, R. G.** (1991). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6565-6569.
- Trinh, N. T., Prive, A., Kheir, L., Bourret, J. C., Hijazi, T., Amraei, M. G., Noel, J., and Brochiero, E.** (2007). Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol.*
- Tsai, M. J. and O'Malley, B. W.** (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev Biochem.* **63**, 451-486.

U

- Uhal, B. D.** (1997). Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol* **272**, L1031-L1045.
- Umezawa, H.** (1965). Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrobial Agents Chemother. (Bethesda.)* **5**, 1079-1085.

V

- Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C.** (1997). An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* **389**, 607-610.
- Vallet, V., Pfister, C., Loffing, J., and Rossier, B. C.** (2002). Cell-surface expression of the channel activating protease xCAP-1 is required for activation of ENaC in the Xenopus oocyte. *J Am Soc. Nephrol.* **13**, 588-594.
- Venkatesh, V. C. and Katzberg, H. D.** (1997). Glucocorticoid regulation of epithelial sodium channel genes in human fetal lung. *Am J Physiol* **273**, L227-L233.
- Verkman, A. S.** (2007). Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir. Physiol Neurobiol.*
- Vermeer, P. D., Panko, L., Karp, P., Lee, J. H., and Zabner, J.** (2006). Differentiation of human airway epithelia is dependent on erbB2. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **291**, L175-L180.
- Victorino, G. P., Newton, C. R., and Curran, B.** (2002). Effect of angiotensin II on microvascular permeability. *J. Surg. Res.* **104**, 77-81.
- Villar, J. and Slutsky, A. S.** (1989). The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir. Dis.* **140**, 814-816.
- Vivona, M. L., Matthay, M., Chabaud, M. B., Friedlander, G., and Clerici, C.** (2001). 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.
- Voilley, N., Bassilana, F., Mignon, C., Merscher, S., Mattei, M. G., Carle, G. F., Lazdunski, M., and Barbry, P.** (1995). Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *Genomics* **28**, 560-565.
- Voilley, N., Lingueglia, E., Champigny, G., Mattei, M. G., Waldmann, R., Lazdunski, M., and Barbry, P.** (1994). The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci US A* **91**, 247-251.

W

- Wadsworth, S. J., Nijmeh, H. S., and Hall, I. P.** (2006). Glucocorticoids increase repair potential in a novel in vitro human airway epithelial wounding model. *J Clin Immunol.* **26**, 376-387.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N., and Lazdunski, M.** (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem.* **270**, 27411-27414.
- Wallach-Dayana, S. B., Izbicki, G., Cohen, P. Y., Gerstl-Golan, R., Fine, A., and Breuer, R.** (2006). Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **290**, L790-L796.
- Wang, H. C., Zentner, M. D., Deng, H. T., Kim, K. J., Wu, R., Yang, P. C., and Ann, D. K.** (2000). Oxidative stress disrupts glucocorticoid hormone-dependent transcription of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit in lung epithelial cells through ERK-dependent and thioredoxin-sensitive pathways. *J Biol Chem.* **275**, 8600-8609.
- Wang, Y., Folkesson, H. G., Jayr, C., Ware, L. B., and Matthay, M. A.** (1999a). Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy. *J Appl. Physiol* **87**, 1852-1860.

- Wang, Y., Jayr, C., Folkesson, H. G., and Matthay, M. A.** (1999b). Alveolar epithelial fluid transport can be upregulated simultaneously in rats by two different mechanisms. *Chest* **116**, 98S-100S.
- Ware, L. B. and Matthay, M. A.** (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J Med.* **342**, 1334-1349.
- Ware, L. B. and Matthay, M. A.** (2001). 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.
- Webster, N. R., Cohen, A. T., and Nunn, J. F.** (1988). Adult respiratory distress syndrome--how many cases in the UK? *Anaesthesia* **43**, 923-926.
- Weinacker, A. B. and Vaszar, L. T.** (2001). Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Annu.Rev Med.* **52**, 221-237.
- Weiss, S. J.** (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J Med.* **320**, 365-376.
- Widdicombe, J. H.** (1989). Airway diseases: role of epithelium and inflammatory peptides. *Am J Physiol* **257**, L144-L146.
- Widdicombe, J. H.** (2001). Altered NaCl concentration of airway surface liquid in cystic fibrosis. *Pflugers Arch.* **443 Suppl 1**, S8-10.
- Widdicombe, J. H., Basbaum, C. B., and Yee, J. Y.** (1979). Localization of Na pumps in the tracheal epithelium of the dog. *J Cell Biol* **82**, 380-390.
- Williams, M. C.** (2003). Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu.Rev Physiol* **65**, 669-695.
- Willumsen, N. J. and Boucher, R. C.** (1991). Sodium transport and intracellular sodium activity in cultured human nasal epithelium. *Am J Physiol* **261**, C319-C331.
- Willumsen, N. J., Davis, C. W., and Boucher, R. C.** (1989). Intracellular Cl⁻ activity and cellular Cl⁻ pathways in cultured human airway epithelium. *Am J Physiol* **256**, C1033-C1044.
- Wosten-van Asperen, R. M., Lutter, R., Haitzma, J. J., Merkus, M. P., van Woensel, J. B., van der Loos, C. M., Florquin, S., Lachmann, B., and Bos, A. P.** (2008). ACE mediates ventilator-induced lung injury in rats via angiotensin II but not bradykinin. *Eur.Respir.J.* **31**, 363-371.
- Wright, J. R.** (1997). Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* **77**, 931-962.

X - Y - Z

- Xu, H. and Chu, S.** (2007). ENaC {alpha}-subunit variants are expressed in lung epithelial cells and are suppressed by oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol.*
- Xu, Z. H., Shimakura, K., Yamamoto, T., Wang, L. M., and Mineshita, S.** (1998). Pulmonary edema induced by angiotensin I in rats. *Jpn.J.Pharmacol.* **76**, 51-56.
- Yamamoto, T., Wang, L., Shimakura, K., Sanaka, M., Koike, Y., and Mineshita, S.** (1997). Angiotensin II-induced pulmonary edema in a rabbit model. *Jpn.J.Pharmacol.* **73**, 33-40.
- Yu, J. X., Chao, L., and Chao, J.** (1995). Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostaticin mRNA. *J Biol Chem.* **270**, 13483-13489.
- Yue, G., Russell, W. J., Benos, D. J., Jackson, R. M., Olman, M. A., and Matalon, S.** (1995). Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8418-8422.
- Zahm, J. M., Debordeaux, C., Raby, B., Klossek, J. M., Bonnet, N., and Puchelle, E.** (2000). Motogenic effect of recombinant HGF on airway epithelial cells during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *J Cell Physiol* **185**, 447-453.