

Mucoviscidose : vers quelles cellules pulmonaires faut-il orienter la recherche fondamentale et clinique ?

La mucoviscidose, ou *cystic fibrosis* (CF) dans la terminologie anglo-saxonne, est la maladie génétique autosomique récessive la plus commune dans les populations européennes [1]. La mucoviscidose affecte spécifiquement les glandes exocrines de l'organisme humain, où des mutations du gène *CF* [2] provoquent des altérations de la fonction du canal chlorure CFTR (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [3]. Le transport électrolytique devient alors anormal et conduit à une insuffisance pancréatique, à une infertilité masculine (*m/s* n°3, vol. 9, p. 344) et, surtout, à des troubles obstructifs chroniques pulmonaires suivis d'infections bactériennes, ces deux phénomènes s'exacerbant mutuellement.

Les derniers progrès des techniques de biologie moléculaire rendent actuellement possible l'utilisation de la thérapie génique dans le but de guérir cette maladie. Les développements les plus récents concernent le transfert du gène *CFTR* recombinant grâce à des vecteurs liposomiques ou adénoviraux inactivés dans l'épithélium bronchique des patients (*m/s* n°3, vol. 9, p. 348). Toutefois, malgré les avancées actuelles considérables, il restait à déterminer avec précision quelles cellules, parmi le complexe épithélium pulmonaire, synthétisent la protéine CFTR et seraient, dès lors, les cibles privilégiées à guérir. Notre propos ici est de replacer les connaissances récemment acquises sur la biologie moléculaire et sur la caractérisation électrophysiologique de la protéine CFTR dans son contexte pulmonaire cellulaire et de faire le point sur différentes données montrant l'importance des cellules séreuses des glandes trachéo-bronchiques dans la physiopathologie de la mucoviscidose.

L'arbre trachéo-bronchique

L'arbre trachéo-bronchique, outre sa fonction de conduire l'air extérieur aux poumons, a développé des fonctions originales et complexes, toutes liées à la décontamination de l'air intrapulmonaire inspiré, jouant ainsi un rôle important dans la défense de l'organisme. A part les fonctions assurées par le système lymphoïde bronchique, toutes les autres fonctions sont le fait du mucus bronchique sécrété par l'épithélium de surface et de la sous-muqueuse bronchique où se trouvent les glandes (*figure 1*). Le mucus bronchique agit tel un piège à poussières, bactéries et micro-organismes inhalés. Les mucines contiennent un nombre énorme de sites potentiels de fixation des micro-organismes qui sont ensuite bloqués ou détruits par les protéines à activité antibactérienne et les IgA sécrétoires, ou phagocytés par les cellules migratoires (macrophages et neutrophiles). Ainsi, la sécrétion du mucus bronchique permet-elle de faire parvenir un air stérile, propre et sans particules et saturé en eau aux alvéoles pulmonaires. La sécrétion de mucus a lieu dans les voies aériennes de gros diamètre. Les cellules caliciformes à mucus et les glandes bronchiques sont abondamment présentes dans les voies qui contiennent du cartilage et leur nombre décroît avec le diamètre des bronches. Elles sont rares ou inexistantes dans les bronchioles.

Chez l'homme adulte, le volume glandulaire de l'arbre trachéo-bronchique est évalué à environ 4 ml, le volume des cellules caliciformes à mucus étant le quarantième de cette valeur [4]. Ainsi, potentiellement, les glandes sous-muqueuses sont à l'origine de la majeure partie de la pro-

duction de mucus dans le tractus respiratoire humain. Ces glandes sont reliées à la lumière bronchique par des canaux collecteurs qui contiennent des cellules éosinophiles, au niveau desquelles les sécrétions glandulaires subissent des modifications hydro-électrolytiques. Les glandes sont composées de deux types de cellules (*figure 1*): les cellules muqueuses qui sécrètent les mucines et les cellules séreuses impliquées dans la défense pulmonaire. Les cellules séreuses sont un élément essentiel des glandes sous-muqueuses, tant par leur quantité (61 % du volume total) que par leur rôle dans la défense antibactérienne et antiprotéasique de l'arbre trachéo-bronchique [5]. Ce sont ces cellules qui sont responsables de la synthèse et de la sécrétion de lactoferrine, protéine bactériostatique grâce à son action ferriprive sur les germes inhalés, du lysozyme attaquant la paroi bactérienne, de peroxydase qui est bactériolytique, et d'une antiprotéase : l'inhibiteur bronchique. Ces cellules sont, en outre, le siège privilégié de la transcytose des IgA sécrétoires au niveau pulmonaire. Toutes ces substances forment le mucus qui, une fois déversé dans la lumière bronchique, sera évacué grâce au battement ciliaire jusqu'au larynx où il sera ensuite dégluti.

Identification de la cellule glandulaire trachéale séreuse en tant que cible privilégiée de l'atteinte pulmonaire primaire dans la mucoviscidose

• *Les glandes sont le lieu de troubles sécrétoires importants*

L'hypothèse suggérant que les glandes de l'arbre trachéo-bronchique joueraient un rôle primordial dans la physiopathologie de la muco-

viscidose avait déjà été étayée par différents résultats : les canaux collecteurs de ces glandes sont déjà obstrués à la naissance par des sécrétions hyperconcentrées et déshydratées de mucus, bien avant même l'émergence de complications dues aux infections chroniques respiratoires [6]. Par ailleurs, nous avons montré que les cellules trachéales glandulaires CF en culture sécrètent de 10 à 50 fois plus de macromolécules que les cellules normales et qu'elles ne répondaient pas aux agents sécrétagogues [7]. Cette dernière observation montre que, parallèlement à un défaut de transport ionique, il peut aussi y avoir une altération de la sécrétion protéique, suggérant l'idée d'un défaut plus général dans les processus sécrétoires.

Un argument indirect de l'importance de ce type cellulaire dans le transport de chlorure fut donné par Dwyer et Farley [8]. Ils montrèrent l'existence d'une accumulation anormale de chlorure dans le cytoplasme des cellules glandulaires CF. Ce résultat fut interprété comme le témoin probable d'une imperméabilité ionique apicale de ces cellules. Plus directement, le groupe de Widdicombe [9] montra par des mesures de potentiel transépithélial que les cellules glandulaires CF avaient un transport ionique très réduit après stimulation de la voie AMPc.

• *La CFTR est intensément synthétisée dans les cellules séreuses des glandes*

En décembre 1992, Engelhardt *et al.* [10], utilisant des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie, mirent en évidence une très faible synthèse de la protéine CFTR dans l'épithélium de surface et dans les cellules canalaire des glandes et démontrèrent que les cellules cibles dans la mucoviscidose étaient les cellules séreuses glandulaires et aussi, à une moindre échelle, une sous-population de cellules canalaire. Cette sous-population de cellules canalaire (probablement les cellules éosinophiles, voir figure 1) compte pour 1% à 3% des cellules canalaire totales. Celles-ci, riches en mitochondries, sont du même type que celles rencontrées dans l'épiderme des batraciens et qui possèdent l'entière char-

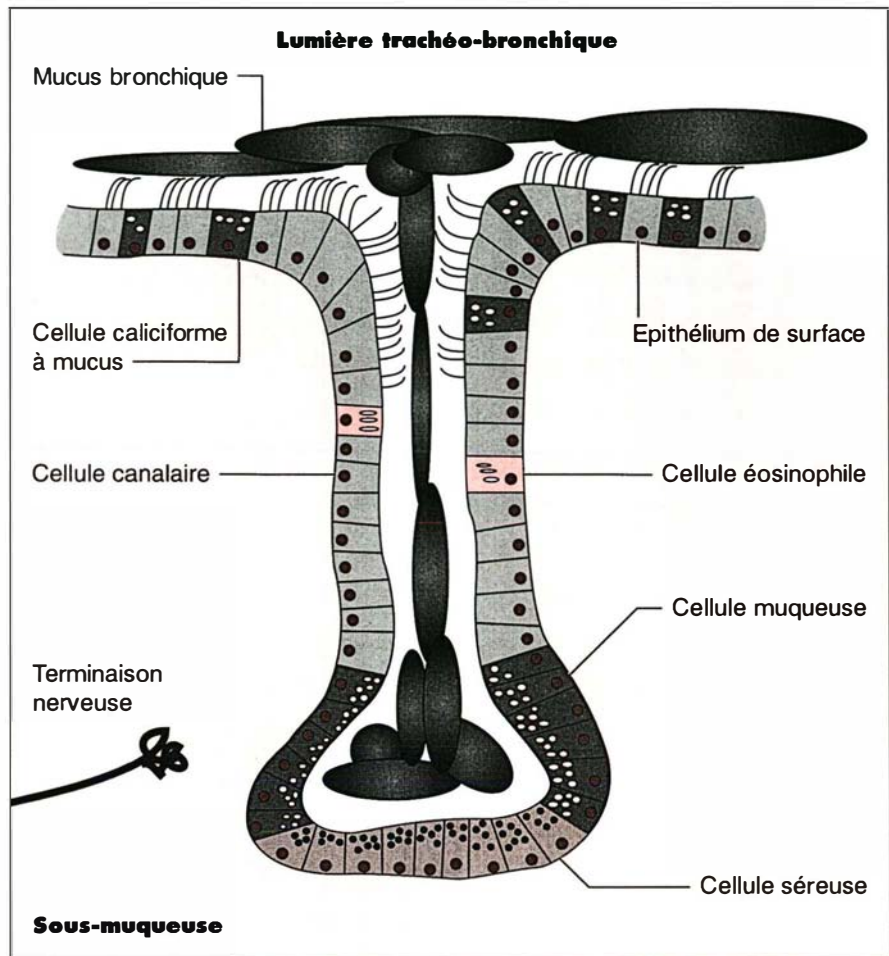


Figure 1. Les glandes trachéo-bronchiques constituent la principale structure sécrétoire de la trachée et des bronches et sont profondément enfoncées dans la muqueuse. Elles sont constituées de cellules muqueuses qui sécrètent les mucines (principal constituant du mucus) et de cellules séreuses qui sont spécialisées dans la synthèse de protéines de défense (lactoferrine, lysozyme, peroxydase et inhibiteur bronchique) et dans la transcytose des IgA sécrétoires. La protéine CFTR s'exprime principalement dans les cellules séreuses des glandes ainsi que dans une sous-population de cellules canalaire.

ge de la conductance chlorure, dépendante de l'AMPc et contrôlant l'hydratation du mucus cutané. Quant aux cellules glandulaires séreuses, à la fois la très forte présence du gène et de la protéine CFTR et aussi leur importance quantitative indiqueraient que, non seulement

elles participent intensément à l'équilibre osmo-ionique du mucus bronchique, mais aussi, par conséquent, qu'elles sont pour une grande part à l'origine de la physiopathologie de la maladie.

Par ailleurs, l'équipe de Puchelle *et al.* [11] a montré une synthèse de la

protéine CFTR aussi bien dans les cellules séreuses que dans les cellules muqueuses des glandes, avec toutefois une localisation différente dans les deux types de cellules puisque les auteurs retrouvent la protéine CFTR localisée dans la membrane apicale et basolatérale des cellules muqueuses et dans la membrane des granules sécrétoires des cellules séreuses. Cette localisation diffère de celle observée dans d'autres types cellulaires précédemment étudiés mais aussi de celle décrite par Engelhardt [10]. Toutefois, malgré ces divergences, peut-être dues aux différents anticorps monoclonaux et polyclonaux utilisés par ces deux équipes, leurs résultats suggèrent, sinon un rôle important des cellules des glandes, au moins une participation active de ces cellules à la physiopathologie de la mucoviscidose.

Cependant, il existe aussi une atteinte sévère des voies aériennes distales qui sont pourtant exemptes de glandes. Récemment, Engelhardt *et al.* ont recherché la présence du gène *CFTR* dans les bronchioles [12]. Ils ont observé que la protéine CFTR est fortement synthétisée dans environ 5% des cellules de l'épithélium bronchiolaire. Malheureusement, les auteurs n'ont pu identifier la sous-population cellulaire produisant la CFTR; il ne s'agit, ni des cellules ciliées, ni des cellules de Clara, ces deux types de cellules formant la majorité des cellules de l'épithélium bronchiolaire. En outre, si on admet une implication majeure de l'altération de la rhéologie du mucus dans la physiopathologie de la maladie, ce phénomène s'applique mal aux voies aériennes distales car celles-ci contiennent très peu de cellules sécrétant du mucus. Peut-être, à ce niveau, pourrait-on alors invoquer des réactions secondaires à l'inflammation de la trachée et des bronches lors des infections chroniques, très courantes chez ces patients, ou encore une autre fonction de la protéine CFTR non encore définie dans le poumon distal ?

• *Les souris transgéniques (ne synthétisant pas la CFTR) n'ont pas de symptomatologie pulmonaire*

L'hypothèse d'une implication majeure des glandes dans la physiopathologie de la mucoviscidose a récemment été confortée par l'obtention de souris transgéniques déficientes en CFTR. Les souris n'ont que très peu de glandes séromuqueuses dans leur arbre trachéobronchique, localisées à la jonction de la trachée et du larynx [13]. La trachée et les bronches de souris sont en fait composées de 50% de cellules de Clara et d'un tiers de cellules ciliées, alors que les cellules caliciformes à mucus représentent 0,1% des cellules [13]. Or, les souris déficientes en CFTR n'ont pas [14, 15] ou peu [16] souffert de complications pulmonaires et sont toutes décédées d'occlusions intestinales (*m/s n° 8, vol. 8, p. 879, m/s n° 3, vol. 11, p. 492*). Il apparaîtrait donc d'après ces résultats qu'une sécrétion active de mucus soit nécessaire au déclenchement de la maladie. Cela pose de nouveau la question du rôle de la CFTR dans les voies aériennes de petit diamètre comme la trachée de souris ou les bronchioles chez l'homme. Il serait maintenant intéressant de développer des modèles d'animaux transgéniques plus appropriés comme le furet, dont la trachée est très riche en glandes, ou l'oie, dont la trachée ne contient pas de glandes mais est riche en cellules caliciformes à mucus.

Caractérisation électrophysiologique de l'activité canal chlorure associée à la protéine CFTR dans les cellules glandulaires trachéales séreuses

La convergence des études physiopathologiques et moléculaires de la mucoviscidose a permis de montrer que l'un des défauts primaires se situe au niveau du transport transépithélial de chlorure. C'est à ce titre que les techniques de l'électrophysiologie moléculaire ou *patch-clamp*, permettant l'investigation des transports au niveau du canal ionique unitaire, ont été privilégiées pour l'étude des déterminants moléculaires de l'atteinte pathologique.

Peu de données électrophysiolo-

giques sont réellement disponibles pour les différents types de cellules pulmonaires et la majorité des études portent sur des cellules de l'épithélium de surface; malheureusement ni le type ni même la nature exacte de ces cellules n'ont été décrits. Les premières données électrophysiologiques remontent à 1986-1988, lorsque des études de *patch-clamp* montrèrent l'existence d'un canal chlorure rectifiant sortant de conductance unitaire 50 picoSiemens dans des cellules pulmonaires humaines [17]. Ces travaux avaient montré que ce canal, activé par l'AMPc, ne l'est pas dans une cellule *CF*. Dès lors, ce canal ionique fut désigné comme cible moléculaire probable de l'atteinte pathologique. A la suite de la découverte du gène *CF* [18-20], l'étude des caractéristiques moléculaires de la protéine CFTR montra que la molécule impliquée n'était pas le canal rectifiant sortant. Par la suite, il fut clairement établi que la production de la protéine CFTR n'était pas corrélée à la présence de ce canal au niveau pulmonaire [21]. Notre groupe vient d'identifier et de caractériser l'activité canal chlorure associée à la synthèse de la protéine CFTR dans la membrane apicale des cellules trachéales glandulaires séreuses humaines en culture [22]. Des études similaires ont permis de décrire le canal CFTR dans deux lignées pulmonaires transformées [23, 24]. La signature électrophysiologique de ce canal est semblable à celle décrite dans d'autres types cellulaires synthétisant la protéine CFTR [25, 26]. Dans les cellules trachéales glandulaires séreuses, le canal CFTR possède une conductance unitaire de 7 picoSiemens et est activé par l'AMPc, faisant intervenir des protéine kinases cytosoliques. Son activité ne dépend ni du potentiel membranaire de la cellule, ni du calcium intracellulaire [22].

Si, aujourd'hui, les caractéristiques du canal CFTR ainsi que ses mécanismes de régulation sont bien connus, il reste un certain nombre de points importants à résoudre. En particulier, si le défaut de transport de chlorure observé est attribué à la déficience du canal CFTR, il ne

semble pas compensé par les autres canaux chlorure également présents dans les cellules épithéliales pulmonaires (canal rectifiant sortant, canal chlorure de large conductance ou canal chlorure dépendant du calcium). Il sera donc important, parallèlement à l'étude de la protéine CFTR, de rechercher les mécanismes de régulation des autres canaux chlorure pour déterminer la part jouée par chacun d'eux dans le transport global de chlorure. Une réévaluation des propriétés électrophysiologiques des cellules pulmonaires de surface sera peut-être également nécessaire. Il est important de noter que certains sites cellulaires de synthèse ne sont pas clairement impliqués dans la mucoviscidose. C'est le cas par exemple des cellules cardiaques [27]. Ainsi, même si le spectre d'expression pulmonaire du gène *CFTR* n'est pas restreint aux seules cellules glandulaires séreuses, il reste à déterminer la signification physiologique et les conséquences pathologiques d'une synthèse de la protéine CFTR dans les autres types cellulaires pulmonaires.

Conséquences pour la thérapie génique

Les progrès récents et très rapides de la biologie moléculaire ont permis d'insérer le gène normal codant pour la protéine CFTR en place et lieu de gènes pathogènes de certains virus infectant habituellement les bronches. La caractéristique de ces virus est d'avoir un tropisme particulier pour les cellules épithéliales et d'y insérer leur matériel génétique. Les biologistes disposent donc d'un outil performant pour envisager la thérapie génique puisque disposant d'un moyen simple et efficace d'introduire uniquement le gène *CFTR* normal dans des cellules pathologiques [28]. Cependant, si effectivement la synthèse de la CFTR normale dans les glandes trachéo-bronchiques se révélait nécessaire pour aboutir à la guérison des patients, alors l'utilisation par voie aérosol des vecteurs classiques [29] comme les adénovirus, les rétrovirus, les liposomes, ne pourrait être envisagée à cause de la faible acces-

sibilité des glandes. Dans ce cas, la voie sanguine nous paraît plus appropriée. Il existe en effet une alternative prometteuse qui pourrait avoir des développements futurs intéressants. Il s'agit de la technique de transfert de gène par endocytose relayée par récepteur [30]. Dans cette technique, le gène *CFTR* est complexé à un anticorps dirigé contre les récepteurs des immunoglobulines polymériques. Le complexe fixé à son récepteur est ensuite internalisé dans les cellules. Le gène est alors libéré dans la cellule et s'y exprime correctement. Le grand intérêt de cette technique réside dans le fait que les organes dont les cellules présentent à leur surface ce récepteur sont ceux touchés spécifiquement par la maladie, à savoir le poumon, le pancréas, l'intestin et le foie. Au niveau de la paroi bronchique, ce sont les cellules séreuses des glandes bronchiques qui ont pour charge la transcytose des IgA sécrétoires et qui donc synthétisent à leur surface cellulaire le récepteur des immunoglobulines polymériques. Ainsi, par cette technique, non seulement tous les organes cibles sont susceptibles d'être effectivement et spécifiquement ciblés mais aussi le type cellulaire adéquat dans ces organes. Toutefois, un grand nombre de données relatives tant à la stabilité du complexe gène *CFTR*-anticorps qu'à l'efficacité du transfert du gène dans les cellules et aussi du délai d'expression du gène normal transféré dans les cellules restent à être étudiées et déterminées plus précisément.

Conclusion

Des arguments génétiques, moléculaires et électrophysiologiques suggèrent maintenant que la cellule trachéale glandulaire séreuse est une des cibles privilégiées de la mucoviscidose. Le fait que ces cellules se trouvent profondément enfouies dans la muqueuse (figure 1) et non dans l'épithélium de surface, et aussi qu'elles possèdent une fonction dans le transport d'électrolytes mais surtout dans la défense pulmonaire, soulève deux questions: (1) comment cibler les cellules glandulaires

séreuses avec les vecteurs utilisés dans le cadre de la thérapie génique? (2) quel est le rôle exact de la protéine CFTR dans les fonctions d'équilibre ionique et de défense anti-infectieuse attribuées à ces cellules? Ces deux questions devront être abordées dans le cadre de la recherche fondamentale et clinique sur la mucoviscidose ■

Remerciements

Les laboratoires de neurobiologie cellulaire du Cnrs et du Groupe de recherche sur les glandes exocrines (GRGE) de Marseille bénéficient du soutien financier de l'AFLM (Association française de lutte contre la mucoviscidose). Marc Merten est en stage post-doctoral bénéficiant d'une bourse de recherche de Synthélabo et de la Fondation pour la Recherche médicale. Frédéric Becq bénéficie d'une bourse post-doctorale de l'AFLM. Les auteurs remercient chaleureusement C. Figarella (GRGE, Marseille) pour son aide fructueuse dans la discussion et la rédaction de cet article et M. Gola (Cnrs, Marseille) pour son soutien.

Marc Merten

Docteur ès sciences. Groupe de recherche sur les glandes exocrines, faculté de médecine, 27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Frédéric Becq

Docteur ès sciences. Laboratoire de neurobiologie cellulaire, Cnrs, LNB4, 31 chemin J. Aiguier, 13402 Marseille, France.

TIRÉS À PART

M. Merten.

RÉFÉRENCES

1. Goossens M. La découverte du gène de la mucoviscidose. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 589-91.
2. Férec C, Mercier B, Audrézet M. Les mutations de la mucoviscidose : du génotype au phénotype. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 631-9.
3. Puchelle E. CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) : une protéine à multiples fonctions. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 627-9.
4. Reid L. Measurements of the bronchial mucus gland layer : a diagnostic yardstick in chronic bronchitis. *Thorax* 1960 ; 15 : 132-41.
5. Basbaum CB, Jany B, Finkbeiner WE. The serous cell. *Annu Rev Physiol* 1990 ; 52 : 97-113.
6. Oppenheimer EH, Esterly JR. Pathology of cystic fibrosis : review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. In : Rosenberg HS, Bolland RPN, eds. *Perspectives in pediatric pathology* 2. New York : Year Book Medical Publishers 1975 : 241-278.
7. Merten MD, Figarella C. Constitutive hypersecretion and insensitivity to neurotransmitters by cystic fibrosis tracheal gland cells. *Am J Physiol* 1993 ; 264 : L93-9.
8. Dwyer TM, Farley JM. Intracellular chloride in submucosal gland cells. *Life Sci* 1991 ; 48 : 2119-27.
9. Yamaya M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Altered ion transport by tracheal gland cells in cystic fibrosis. *Am J Physiol* 1991 ; 261 : L491-L4.
10. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang YP, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in human bronchus. *Nature Genet* 1992 ; 2 : 240-6.
11. Jacquot J, Puchelle E, Hinrasky J, Fuchey C, Bettinger C, Spilmont C, Bonnet N, Dieterle A, Dreyer D, Pavirani A, Dalemans W. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway secretory glands. *Eur Respir J* 1993 ; 6 : 169-76.
12. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang YP, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 737-49.
13. Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG. The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 1980 ; 208 : 65-84.
14. Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Trezise AE, McVish LJ, Cuthbert AW, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 1993 ; 362 : 250-5.
15. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf N, Boucher RC, Smithies O, Koller BH. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 1992 ; 257 : 1083-8.
16. Dorin JR, Dickinson P, Alton EFW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteus DJ. Cystic fibrosis in the mouse by targeting insertional mutagenesis. *Nature* 1992 ; 359 : 211-5.
17. Li M, McCann JD, Lietdke CM, Nairn AC, Greengard P, Welsh MJ. Cyclic AMP dependent-protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature* 1988 ; 331 : 358-60.
18. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Sziga M, MBBuchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. *Science* 1989 ; 245 : 1059-65.
19. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 ; 245 : 1066-73.
20. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science* 1989 ; 245 : 1073-80.
21. Ward CL, Krouse ME, Gruenert DC, Kopto RR, Wine JJ. Cystic fibrosis gene expression is not correlated with rectifying Cl⁻ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5277-81.
22. Becq F, Merten MD, Voelckel MA, Gola M, Figarella C. Characterization of cAMP-dependent CFTR-chloride channels in human tracheal gland cells. *FEBS Lett* 1993 ; 321 : 73-8.
23. Haws C, Krouse ME, Xia Y, Gruenert D, Wine JJ. CFTR channels in immortalized human airway cells. *Am J Physiol* 1992 ; L692-707.
24. Haws C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Wine JJ. CFTR in Calu-3 human airway cells : channel properties and role in cAMP-activated Cl⁻ conductance. *Am J Physiol* 1994 ; L502-12.
25. Champigny G, Verrier B, Gerard C, Mauchamp J, Lazdunski M. Small conductance chloride channels in the apical membrane of thyroid cells. *FEBS Lett* 1990 ; 259 : 263-8.
26. Tabcharani JA, Low W, Elie D, Hanrahan J.W. Low conductance chloride channels activated by cAMP in the epithelial cell line T84. *FEBS Lett* 1990 ; 270 : 157-64.
27. Hwang TC, Nagel G, Nairn AC, Gadsby DC. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4698-702.
28. Bout A, Perricaudet M, Baskin G, Imler JL, Scholte BJ, Pavirani A, Valerio D. Lung gene therapy -In Vivo adenovirus mediated gene transfer to rhesus monkey airway epithelium. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 3-10.
29. O'Neal WK, Beaudet AL. Somatic gene therapy for cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 1994 ; 3 : 1497-502.
30. Curiel DL, Agarwal S, Romer MU, Wagner E, Cotten M, Birnstiel ML, Boucher RC. Gene transfer to respiratory epithelial cells via the receptor mediated endocytosis pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 ; 6 : 247-53.