

**Académie de Créteil
Université Paris XII-Val de Marne**

Thèse de doctorat

Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par

Laurent Plantier

**Réparation alvéolaire et emphysème pulmonaire :
Rôle des systèmes d'alvéologénèse**

**Thèse dirigée par le
Dr Jorge Boczkowski et le Pr Bruno Crestani**

Soutenue le 29 octobre 2008

**Rapporteurs : Pr Guy Brusselle
Dr Jean-Michel Sallenave**

**Examineurs : Dr Azzaq Belaaouaj
Dr Jacques Bourbon
Pr Christine Clérici
Pr Bernard Maître**

Cette thèse est dédiée à Béatrice, Claire et Aline.

Remerciements

A Azzaq Belaaouaj, Jacques Bourbon, Guy Brusselle, Christine Clérici, Bernard Maître et Jean-Michel Sallenave, qui ont accepté de participer au jury de cette thèse en tant que rapporteurs ou examinateurs. Qu'ils soient remerciés pour leur disponibilité.

A Jorge Boczkowski et Bruno Crestani, mes directeurs de thèse, qui ont orienté et encouragé mes efforts. Je leur dois l'essentiel de ma formation scientifique.

Au Pr Michel Fournier, qui m'a orienté il y a quelques années vers la réalisation d'un DEA, ce dont je peux le remercier chaque jour.

Au Pr Hervé Mal et aux Drs Giuseppina Biondi, Olivier Brugière, Gaëlle Dauriat, Gilles Jebrak, Anne-Cécile Métivier ainsi qu'aux autres membres passés ou présents du service de pneumologie de Beaujon puis de Bichat.

A Joëlle Marchal, pivot de l'unité INSERM 700, sans l'aide de qui un dixième peut-être des résultats présentés dans ce mémoire n'aurait jamais vu le jour...

A tous les autres membres de l'unité INSERM 700, qui ont partagé avec moi la vie trépidante de la recherche biomédicale, alternance de moments de noir découragement, d'insouciance tranquille et d'euphorie absolue. Citons, dans le désordre et en essayant de n'oublier personne, Sophie Lanone, Séverine Létuvé, Delphine Goven, Fabienne Prost, Mathieu Desmard, Christophe Quesnel, Laurent Nardelli, Raphaël Borie, Delphine El Mehdi, Anne Druihle, Rafik Bachoual, Sophie Pégorier, Marielle Maret, Nassim Arouche, Nadia Amara, Camille Taillé, Arnaud Mailleux, Paul Soler, Monique Dehoux. Merci à Sylvain Marchand-Adam qui m'a mis le pied à l'étrier au laboratoire. Mention spéciale à Laurent Boyer !

Aux directeurs de l'unité INSERM 408 puis 700, le Pr Michel Aubier et le Dr Marina Pretolani, qui m'ont accueilli dans leur département.

A Cécile Rochette-Egly, pour son aide indispensable, épistolaire et matérielle.

Au Pr Juan-Jose Poderoso et aux Drs Maria Cecilia Carreras et Valeria Antico, collègues antipodaux, pour des conversations si riches et une démonstration brillante d'ouverture d'esprit, d'inspiration scientifique, de rigueur analytique et d'esprit latin.

Table des matières

1. Introduction
 - 1.1. Définition de l'emphysème pulmonaire
 - 1.2. Evolution spontanée, épidémiologie
 - 1.3. Absence de traitement curatif
 - 1.4. Présentation du texte d'introduction
2. Première partie : Etiologie de l'emphysème pulmonaire
 - 2.1. Facteurs exogènes
 - 2.1.1. Toxiques inhalés
 - 2.1.1.1. Fumée de cigarette
 - 2.1.1.2. Autres toxiques inhalés : Particules métalliques
 - 2.1.2. Toxicomanie intraveineuse
 - 2.1.3. Infection par le VIH
 - 2.1.4. Malnutrition
 - 2.2. Facteurs endogènes
 - 2.2.1. Pathologies génétiques directement associées à l'emphysème
 - 2.2.1.1. Pathologies des inhibiteurs des sérine protéases : Déficit en alpha-1-antitrypsine
 - 2.2.1.2. Pathologies du tissu conjonctif
 - 2.2.1.2.1. Syndrome de Marfan
 - 2.2.1.2.2. syndrome d'Ehlers-Danlos
 - 2.2.1.2.3. Cutis Laxa
 - 2.2.1.3. Vascularite urticariante hypocomplémentémique
 - 2.2.2. Polymorphismes génétiques associés au développement de l'emphysème chez les fumeurs
 - 2.2.2.1. Polymorphismes associés à la BPCO
 - 2.2.2.2. Polymorphismes directement associés à l'emphysème
3. Deuxième partie : Mécanismes physiopathologiques concourant à la destruction des structures alvéolaires au cours de l'emphysème
 - 3.1. Déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases
 - 3.1.1. Protéases
 - 3.1.1.1. Sérine protéases
 - 3.1.1.1.1. Elastase leucocytaire
 - 3.1.1.1.2. Protéinase 3

3.1.1.2.Cystéine protéases : Cathepsines

3.1.1.3.Métallo protéases matricielles

3.1.1.3.1.MMP-1

3.1.1.3.2.MMP-2

3.1.1.3.3.MMP-9

3.1.1.3.4.MMP-12

3.1.1.3.5.Inhibiteurs des MMP

TIMP

α -2-macroglobuline

3.2. Réaction inflammatoire chronique

3.2.1.Cellules impliquées

3.2.1.1.Macrophages

3.2.1.2.Polynucléaires neutrophiles

3.2.1.3.Lymphocytes T et B

3.2.1.4.Cellules dendritiques

3.2.2.Auto-entretien de la réaction inflammatoire

3.2.2.1.Activité chimiotactique des fragments d'élastine

3.2.2.2.Auto-immunité

3.2.2.3.Diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs dans le poumon
emphysémateux

3.2.2.4.Nitrosylation de l'histone déacétylase

3.3. Excès d'espèces réactives de l'oxygène dans le poumon

3.3.1.Nature et source des espèces réactives de l'oxygène dans le poumon
emphysémateux

3.3.1.1.Sources cellulaires de l'anion superoxyde au niveau pulmonaire

3.3.1.2.Sources moléculaire de l'anion superoxyde dans la cellule

3.3.2.Participation des radicaux libres de l'oxygène au développement de
l'emphysème

3.3.2.1.Excès d'espèces réactives de l'oxygène dans le poumon au cours de la
BPCO

3.3.2.2.Expression pulmonaires des systèmes antioxydants dans l'emphysème :
Données contradictoires

3.3.2.3.Rôle de l'excès d'espèces réactives de l'oxygène dans l'emphysème

3.3.2.3.1.L'excès d'espèces réactives de l'oxygène contribue au
développement de l'emphysème

3.3.2.3.2.Données contradictoires

3.4. Modifications de la viabilité des cellules résidentes de l'alvéole

3.4.1. Apoptose

3.4.1.1. Détection de cellules apoptotiques dans le poumon emphysémateux

3.4.1.2. Rôle discuté de l'apoptose des cellules alvéolaires

3.4.1.2.1. L'apoptose des cellules de l'alvéole pourrait jouer un rôle central au cours de l'emphysème

3.4.1.2.2. Mécanismes de l'apoptose dans le poumon emphysémateux humain : Rôle du Placenta Growth Factor

3.4.1.2.3. L'apoptose des cellules de l'alvéole pourrait être un épiphénomène au cours de l'emphysème

L'apoptose n'est pas spécifique de l'emphysème

Rôle de l'anoïkis

Excès d'apoptose ou défaut d'efférocytose ?

3.4.2. Sénescence des cellules résidentes de l'alvéole

3.5. Emphysème centro-lobulaire : Continuité des lésions entre les territoires bronchiolaire et alvéolaire

4. Troisième partie : Défaut de régénération alvéolaire au cours de l'emphysème

4.1. La régénération alvéolaire est possible chez les mammifères adultes

4.1.1. Alvéologénèse à l'âge adulte dans les espèces à croissance continue

4.1.1.1. Alvéologénèse après déplétion alvéolaire diffuse

4.1.1.2. Alvéologénèse après résection chirurgicale de parenchyme pulmonaire

4.1.2. Alvéologénèse dans les espèces à croissance interrompue

4.1.2.1. Alvéologénèse post-pneumonectomie chez le chien

4.1.2.2. Alvéologénèse post-pneumonectomie chez l'homme

4.1.3. Mécanismes de la régénération alvéolaire, rôle des fibroblastes

4.1.3.1. Cellules impliquées

4.1.3.1.1. Cellules d'origine extra-pulmonaire : Cellules souches d'origine hématopoïétique

4.1.3.1.2. Cellules d'origine locale

Cellules épithéliales et endothéliales

Cellules souches locales

Pneumocytes de type 2

Sous-populations de cellules de Clara, cellules souches bronchiolo-alvéolaires

Fibroblastes alvéolaires

Les fibroblastes alvéolaires produisent la matrice extracellulaire du poumon

Les fibroblastes alvéolaires participent aux interactions intercellulaires dans le poumon

4.1.3.2. Stimulus et inhibiteurs de l'alvéologénèse dans le poumon adulte

4.1.3.2.1. Facteurs mécaniques

4.1.3.2.2. Facteurs solubles

Facteurs de croissance

Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Keratinocyte Growth Factor (KGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Ligands des récepteurs nucléaires

Hormones corticotropes

Oestrogènes

Acide rétinoïque

Rôle de la NO synthase endothéliale

4.1.3.2.3. Facteurs de transcription, rôle de HIF-1 α

4.1.3.3. Mécanismes structuraux de l'alvéologénèse dans le poumon mature :

Hypothèses

4.1.3.3.1. Alvéologénèse avant la maturation microvasculaire du poumon

4.1.3.3.2. Alvéologénèse faisant suite à la maturation microvasculaire du poumon

4.2. La fumée de cigarette réprime des fonctions fibroblastiques impliquées dans la régénération alvéolaire

4.2.1. La fumée de cigarette est cytotoxique envers les fibroblastes pulmonaires et induit leur sénescence précoce

4.2.2. Altérations fonctionnelles des fibroblastes pulmonaires induites par la fumée de cigarette

4.2.3. L'exposition à la fumée de cigarette inhibe-t-elle l'alvéologénèse *in vivo* ?

4.3. Phénotype anormal des fibroblastes dans le poumon emphysémateux humain

4.3.1. Données *in vivo*

4.3.2. Données *in vitro*

4.3.2.1. Sénescence précoce des fibroblastes alvéolaires

4.3.2.2. Altérations fonctionnelles

4.4. Perte de la capacité d'alvéologénèse chez le rat dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase

4.5. L'activation des systèmes d'alvéologénèse est un objectif thérapeutique envisageable dans le poumon emphysémateux

4.5.1. Régénération alvéolaire induite par l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA)

4.5.2. Régénération alvéolaire induite par la simvastatine

4.5.3. Régénération alvéolaire induite par le HGF

4.5.4. Régénération alvéolaire induite par l'adrénomédulline

4.5.5. Thérapie cellulaire

5. Hypothèses et objectifs du travail

5.1. Hypothèses

5.2. Objectifs

5.2.1. Etude *ex vivo*

5.2.2. Etude *in vivo*

6. Résultats *ex vivo*

6.1. Défaut de production d'HGF par les fibroblastes d'emphysème

6.1.1. Objectifs et méthodes

6.1.2. Résultat complémentaire : Aspect en culture des fibroblastes de poumon sain et de poumon emphysémateux

6.1.3. Discussion

6.1.3.1. Discussion des méthodes

6.1.3.2. Discussion des résultats

6.2. Dérégulation de l'expression de l'élastine par les fibroblastes d'emphysème : Rôle de Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2

6.2.1. Objectifs et méthodes

6.2.2. Résultats complémentaires

6.2.2.1. Expression de CRABP2 dans les fibroblastes de poumon atteint de fibrose pulmonaire idiopathique

6.2.2.2. Expression de CRABP2 dans le poumon *in vivo*

6.2.2.2.1. Expression de l'ARNm de CRABP2 dans l'homogénat de poumon total

6.2.2.2.2. Détection de la protéine CRABP2 par immunohistochimie dans le poumon

6.2.3. Discussion

6.2.3.1. Discussion des méthodes

6.2.3.2. Discussion des résultats

6.2.3.2.1.Synthèse des résultats

6.2.3.2.2.CRABP2 est nécessaire à l'induction par l'ATRA de l'expression de l'élastine mais non de RAR- β dans les fibroblastes pulmonaires

6.2.3.2.3.Faible expression de CRABP2 dans les fibroblastes de poumon emphysémateux

6.2.3.2.4.La faible expression de CRABP2 était limitée aux fibroblastes cultivés *in vitro* à partir de poumon emphysémateux

7. Résultats *in vivo*

7.1. Le KGF prévient l'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase chez la souris

7.1.1.Objectifs et méthodes

7.1.2.Résultats complémentaires

7.1.2.1.Souris traitées par le KGF de J0 à J8 post-instillation

7.1.2.2.Contenu pulmonaire en malone dialdéhyde

7.1.2.3.Expression pulmonaire de l'ARNm du KGF

7.1.2.4.Expression pulmonaire des ARNm des NO synthases

7.1.3.Discussion

7.1.3.1.Discussion des méthodes : Modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase

7.1.3.2.Discussion des résultats

7.1.3.2.1.Synthèse des résultats

7.1.3.2.2.Le KGF protège de l'emphysème induit par l'élastase mais n'induit pas d'alvéologénèse compensatoire

7.1.3.2.3.Absence d'augmentation de l'expression pulmonaire du KGF dans le poumon emphysémateux

7.1.3.2.4.Absence d'apoptose des cellules de l'alvéole après instillation d'élastase

7.2. Rôle de CRABP2 *in vivo* dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase

7.2.1.Objectifs

7.2.2.Méthodes

7.2.3.Résultats

7.2.3.1.L'expression pulmonaire de CRABP2 est durablement diminuée après une instillation trachéale d'élastase chez les souris sauvages

7.2.3.2.L'emphysème induit par l'élastase n'était pas aggravé chez les souris de génotype CRABP2-/-

7.2.4.Discussion

7.2.4.1. Diminution de l'expression pulmonaire de CRABP2 dans le poumon des souris exposées à l'élastase

7.2.4.2. Absence d'inactivation conditionnelle de CRABP2 dans les fibroblastes pulmonaires

7.2.4.3. Absence de traitement par l'acide rétinoïque exogène

8. Discussion générale, perspectives

8.1. Altération des systèmes d'alvéologénèse impliquant les fibroblastes pulmonaires dans le poumon emphysémateux humain

8.2. Implication du KGF et de CRABP2 dans le poumon adulte emphysémateux *in vivo* chez l'animal

8.2.1. Implication du KGF ?

8.2.2. Implication de CRABP2 ?

8.3. Conséquences en termes de projets thérapeutiques pour l'homme

8.3.1. Les cibles potentielles pour un traitement régénérateur ne sont pas présentes dans le poumon emphysémateux

8.3.2. Hypothèses pour le rétablissement d'une population de fibroblastes ayant le potentiel de régénérer le tissu alvéolaire

8.3.2.1. Apport de cellules mésenchymateuses d'origine extra-pulmonaire : Fibrocytes

8.3.2.1.1. Les fibrocytes

8.3.2.1.2. Rôle des fibrocytes dans le poumon : Modèle des pneumopathies interstitielles fibrosantes

8.3.2.2. Utilisation de cellules d'origine locale

8.3.2.2.1. Cellules souches mésenchymateuses pulmonaires

8.3.2.2.2. Transition épithélio-mésenchymateuse ou endothélio-mésenchymateuse

Transition épithélio-mésenchymateuse

Transition endothélio-mésenchymateuse

8.3.3. Problèmes thérapeutiques

8.3.3.1. Problèmes liés à l'utilisation thérapeutique de facteurs de croissance

8.3.3.1.1. Risque de cancer

8.3.3.1.2. Risque de fibrose pulmonaire

8.3.3.2. Problématique des interactions paroi-poumon dans une cage thoracique de taille fixe

8.3.3.3. Une compréhension plus complète des mécanismes du développement pulmonaire est nécessaire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques

9. Conclusion

10. Annexes

10.1. Annexe 1 : Defect of alveolar regeneration in pulmonary emphysema : role of lung fibroblasts

10.2. Annexe 2 : Role of the inducible nitric oxide synthase in elastase-induced emphysema

11. Références

1. Introduction

L'emphysème pulmonaire est une pathologie fréquente, incurable et irréversible, caractérisée par la destruction progressive du parenchyme pulmonaire, fin lacis d'alvéoles dont la structure s'est formée de façon définitive au cours de la phase terminale, dite d'alvéologénèse, du développement pulmonaire. Cette dernière est caractérisée par l'éruption, à partir des cloisons intersacculaires ou septums primaires formés au terme de la phase précédente du développement, des cloisons alvéolaires ou septums secondaires délimitant les espaces aériens distaux du poumon mature.

La conception actuelle de la physiopathologie de cette maladie repose essentiellement sur la notion d'une agression chronique du tissu alvéolaire aboutissant à sa destruction. L'hypothèse générale défendue par ce mémoire est qu'il existe une défaillance des systèmes de réparation alvéolaire et d'alvéologénèse au cours de cette maladie, et que le déséquilibre entre d'une part une destruction excessive et d'autre part un défaut de réparation du tissu alvéolaire explique la constitution des lésions d'emphysème. Ce travail visant à préciser les mécanismes du défaut de régénération pulmonaire au cours de l'emphysème a la vocation de s'inscrire dans le cadre de l'effort de recherche mené vers la mise au point de thérapies pouvant induire l'alvéologénèse, et donc la régénération du tissu alvéolaire.

1.1.Définition de l'emphysème pulmonaire

L'emphysème pulmonaire est une pathologie pulmonaire chronique définie histologiquement par la distension permanente des espaces aériens distaux du poumon en rapport avec une destruction des cloisons alvéolaires. L'absence de lésions significatives de fibrose pulmonaire est nécessaire pour parler d'emphysème. L'emphysème représente la composante alvéolaire de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) qui est une des maladies les plus répandues dans le monde¹. La principale cause de la BPCO est le tabagisme, 10 à 15% des fumeurs développant cette maladie.

1.2.Evolution spontanée, épidémiologie

L'évolution naturelle de l'emphysème se fait vers l'aggravation progressive des lésions, aboutissant à la réduction progressive de la surface d'échange alvéolo-capillaire et au développement d'un trouble ventilatoire obstructif. Ces éléments sont responsables d'une insuffisance respiratoire chronique conduisant à un handicap sévère et au décès dans un

grand nombre de cas. En France, la mortalité directement attribuable à la BPCO est estimée à 7352 décès par an, cette valeur correspondant vraisemblablement à une sous-évaluation². Le poids de l'emphysème pulmonaire en termes de santé publique est d'autant plus important que son incidence est actuellement en augmentation de part le monde du fait de la large diffusion de son principal facteur étiologique, le tabagisme. Dans les pays développés, et à cause de la diffusion plus récente du tabagisme parmi les femmes, l'augmentation de l'incidence de la BPCO est observée de façon particulièrement saillante chez les femmes³.

1.3.Absence de traitement curatif

A ce jour, l'emphysème pulmonaire est une maladie incurable dont la prise en charge est pour l'essentiel palliative. Les seules interventions susceptibles de prolonger la survie des patients atteints sont l'arrêt du tabagisme, qui obtient par ailleurs un ralentissement du déclin de la fonction respiratoire, ainsi que l'oxygénothérapie de longue durée en cas d'hypoxémie. Les bronchodilatateurs et les corticoïdes inhalés donnent des résultats certes significatifs mais essentiellement limités au contrôle des symptômes^{4, 5}. Les interventions de réduction de volume pulmonaire, classiquement chirurgicales⁶ et depuis peu menées par voie endoscopique⁷ peuvent avoir un grand intérêt chez des patients très sélectionnés, mais ces interventions ne corrigent pas la pathologie sous-jacente dont l'évolution se poursuit. Enfin, si le bénéfice de la transplantation pulmonaire en termes d'amélioration de la qualité de vie est reconnu dans cette indication, son bénéfice en terme de survie, s'il existe, reste modeste^{8, 9}. Aucune mesure thérapeutique ne possède d'effet curatif pour cette pathologie. Un effort de recherche visant à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques paraît nécessaire compte tenu du poids majeur de l'emphysème pulmonaire en termes de santé publique.

1.4.Présentation du texte d'introduction

La première partie de cette revue de la littérature est consacrée à la description des causes et des facteurs ou marqueurs de risque reconnus de l'emphysème pulmonaire. Ceux-ci ne sont pas limités à l'exposition à la fumée de tabac mais incluent d'autres facteurs exogènes, inhalés ou non, agents inertes ou infectieux, ainsi que des facteurs endogènes, qu'il s'agisse de pathologies génétiques clairement identifiées et directement associées au développement de l'emphysème ou de polymorphismes génétiques associés statistiquement au développement de l'emphysème chez les fumeurs.

La deuxième partie de ce texte traite des mécanismes physiopathologiques contribuant à l'agression chronique des structures alvéolaires au cours de l'emphysème. Si historiquement un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases dans le poumon fut le premier mécanisme physiopathologique identifié de cette maladie, une réaction inflammatoire chronique, un excès de radicaux libres de l'oxygène, une altération de la viabilité des cellules résidentes de l'alvéole et d'autres phénomènes ont été rapportés au cours de l'emphysème et mis en cause dans son développement.

Enfin, la troisième partie cette introduction rapporte les éléments soutenant l'hypothèse générale énoncée plus haut, à savoir qu'une défaillance des systèmes de réparation alvéolaire d'alvéologénèse joue un rôle central au cours de l'emphysème. Il y est décrit 1) que l'induction de l'alvéologénèse est possible dans le poumon des mammifères adultes, 2) que la fumée de cigarette, principal facteur de risque de l'emphysème, antagonise ce phénomène, 3) que les fibroblastes pulmonaires des patients atteints d'emphysème présentent des altérations de fonctions essentielles à l'alvéologénèse, 4) qu'un défaut d'alvéologénèse a été rapporté dans un modèle animal d'emphysème et enfin 5) que l'induction de l'alvéologénèse est possible dans un modèle animal d'emphysème.

Au terme du texte d'introduction, les principaux objectifs de ce travail seront présentés.

2. Première partie : Etiologie de l'emphysème pulmonaire

2.1.Facteurs exogènes

La principale cause de l'emphysème est l'exposition à la fumée de tabac. Cependant, d'autres facteurs de risque environnementaux de cette maladie ont été reconnus.

2.1.1.Toxiques inhalés

2.1.1.1.Fumée de cigarette

La grande majorité des cas d'emphysème pulmonaire est liée à la consommation active de tabac sous la forme de cigarettes dont la fumée est inhalée. La fumée de cigarette, composée d'une phase gazeuse et d'une phase goudron, contient plusieurs milliers de substances toxiques dont une liste sommaire est donnée dans le tableau 1¹⁰. Parmi les composés contenus dans la fumée de cigarette, de nombreuses espèces radicalaires, en particulier des radicaux libres de l'oxygène et du monoxyde d'azote, semblent jouer un rôle de premier plan dans la physiopathologie de la BPCO en général et de l'emphysème en particulier. D'autres composés tels que le cadmium ont été également impliqués dans la pathogénie de la BPCO. Enfin, la nicotine semble également capable d'interférer avec le développement des alvéoles pulmonaires puisque l'exposition de rats femelles à ce produit durant la gestation puis la lactation aboutit au développement de lésions similaires à un emphysème pulmonaire chez les ratons¹¹.

Tableau 1 : Principales classes de composants de la fumée de cigarette et nombre de composants identifiés, tiré de¹⁰

Class	No.
Amides, imides, lactams	237
Carboxylic acids	227
Lactones	150
Esters	474
Aldehydes	108
Ketones	521
Alcohols	379
Phenols	282
Amines	196
N-Heterocycles	921
Hydrocarbons	705
Nitriles	106
Anhydrides	11
Carbohydrates	42
Ethers	311
Inorganics	50
Total	4720

Le développement de lésions d'emphysème pulmonaire suite à une exposition prolongée à un toxique inhalé donné semble relativement spécifique de la fumée de cigarette. En effet, alors que l'exposition aux fumées dégagées par la combustion de végétaux sur un foyer ouvert¹² a été associée au développement de symptômes respiratoires et au développement d'un trouble ventilatoire obstructif, des lésions d'emphysème n'ont pas été rapportées chez les patients exposés à ces fumées. L'exposition prolongée à des poussières organiques peut entraîner l'association d'un trouble ventilatoire obstructif et d'une diminution de la capacité de transfert du CO mais l'existence de lésions d'emphysème, dont la définition est morphologique, n'a pas été rapportée au cours de ces formes de BPCO¹³, de même que chez les patients exposés aux particules issues des moteurs diesel¹⁴.

2.1.1.2. Autres toxiques inhalés : Particules métalliques

L'exposition à des particules métalliques peut contribuer au développement de lésions d'emphysème. Chez le hamster, l'instillation trachéale de particules de cadmium, un métal présent dans la fumée de cigarette, peut induire un emphysème pulmonaire¹⁵. Chez la souris, l'instillation trachéale de nanoparticules de dioxyde de titane conduit au développement de lésions d'emphysème¹⁶.

2.1.2.Toxicomanie intraveineuse

Certains toxiques administrés par voie sanguine peuvent également induire le développement d'un emphysème. L'injection chronique de drogues par voie intraveineuse a été associée au développement de lésions d'emphysème bulleux à prédominance apicale¹⁷, le mécanisme de constitution des lésions chez ces patients n'étant pas connu.

La constitution d'un emphysème panlobulaire sévère, prédominant aux bases, a par ailleurs été observée chez de jeunes toxicomanes s'injectant par voie intraveineuse du méthylphenidate sous une forme galénique destinée à la voie orale. Chez ces patients, la présence de nombreux granulomes microscopiques liés à la présence de particules de talc, dont de nombreux de topographie microvasculaire, était notée dans le poumon lors de l'autopsie. Cette observation pourrait suggérer que la destruction du lit vasculaire pulmonaire puisse aboutir à la constitution de lésions d'emphysème pulmonaire chez l'homme¹⁸.

2.1.3.Infection par le VIH

L'infection par le VIH par elle-même semble pouvoir entraîner le développement d'un emphysème pulmonaire chez les non-fumeurs et augmente considérablement le risque de développer un emphysème chez les fumeurs¹⁹. Le mécanisme de constitution des lésions dans ce cas n'est pas connu précisément mais la constatation d'un nombre élevé de lymphocytes T8 cytotoxiques dans le LBA des sujets infectés par le VIH par rapport à des sujets indemnes de cette infection a soulevé l'hypothèse d'un rôle de ces cellules dans la pathogénie de l'emphysème chez ces patients²⁰.

2.1.4.Malnutrition

La malnutrition sévère et prolongée peut être responsable du développement de lésions d'emphysème pulmonaire, comme cela avait pu être observé par les médecins du ghetto de Varsovie lors de la deuxième guerre mondiale. Plus récemment, le développement de lésions d'emphysème débutant a été rapporté chez des patients atteints d'anorexie mentale. Dans ce dernier cas, l'emphysème était diagnostiqué sur des critères strictement morphologiques par le scanner, en l'absence d'altération des volumes et débits pulmonaires ainsi que de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone²¹.

Le développement de lésions d'emphysème suite à une malnutrition a été reproduit chez l'animal, indiquant une relation de cause à effet entre ces deux phénomènes²².

2.2.Facteurs endogènes

Le développement d'un emphysème pulmonaire ne survient pas chez l'ensemble des fumeurs et ne respecte pas une relation dose-effet linéaire par rapport à l'intensité du tabagisme²³, ce qui indique l'intervention de facteurs endogènes dans le cours de cette maladie. Notamment, les cas de BPCO les plus précoces et les plus sévères semblent adopter une répartition familiale²⁴. De fait, un certain nombre de facteurs génétiques ont été associés au développement de l'emphysème. Certains correspondent à des pathologies bien identifiées dont l'emphysème est une des manifestations, y compris chez des sujets non fumeurs. D'autres correspondent à des polymorphismes associés au développement de la BPCO, voire plus spécifiquement de l'emphysème, chez les fumeurs.

2.2.1.Pathologies génétiques directement associées à l'emphysème

2.2.1.1.Pathologies des inhibiteurs des sérine protéases : Déficit en alpha-1-antitrypsine

Le principal facteur endogène associé à la survenue d'un emphysème pulmonaire est la présence de mutations de l' α -1-antitrypsine rassemblées dans le cadre nosologique nommé déficit en alpha-1-antitrypsine. Historiquement, la constatation d'une grande fréquence de l'emphysème pulmonaire chez les patients porteurs de ces mutations a conduit à la formulation d'un des premiers concepts physiopathologiques de cette maladie, le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases. Le déficit en α -1-antitrypsine est une maladie relativement rare quoique sous-diagnostiquée, rendant compte de 2 à 3% des cas d'emphysème aux Etats-Unis²⁵.

L' α -1-antitrypsine est un inhibiteur des sérine protéases et est le principal inhibiteur endogène de l'élastase du polynucléaire neutrophile. Les hépatocytes sont le principal lieu de synthèse de l' α -1-antitrypsine, qu'ils sécrètent dans la circulation. Les pneumocytes de type 2 participent cependant aussi à sa synthèse *in situ* dans le poumon²⁶.

Dans la grande majorité des cas, à l'exception des rares individus porteurs d'une délétion de ce gène, la présence de la mutation entraîne un défaut d'arrangement de la structure tertiaire de la molécule et sa séquestration dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes²⁷. La séquestration de l' α -1-antitrypsine dans le cytoplasme des hépatocytes aboutit à une baisse majeure de l'activité anti-élastasique dans le sérum ainsi que dans le poumon. Un rôle majeur dans la constitution de l'emphysème est attribué au déséquilibre élastase/anti-élastase en résultant²⁸.

S'il est largement admis, ce dernier point peut cependant être remis en cause. Ainsi, le traitement substitutif par l' α -1-antitrypsine recombinante, qui corrige intégralement le déséquilibre de la balance élastase/anti-élastase dans la circulation, n'a jamais fait la preuve formelle de son efficacité pour le traitement de l'emphysème lié au déficit en α -1-antitrypsine²⁹. Par ailleurs, l'accumulation de polymères d' α -1-antitrypsine mutée dans le cytoplasme peut par elle-même entraîner une cytotoxicité, celle-ci représentant le principal mécanisme de l'atteinte hépatique associée aux mutations de l' α -1-antitrypsine. L' α -1-antitrypsine étant également produite par les pneumocytes de type 2, la cytotoxicité entraînée par l'accumulation d' α -1-antitrypsine mutée dans le cytoplasme de ces cellules pourrait également contribuer à l'atteinte pulmonaire de cette maladie.

De plus, la formation de ces polymères confère à l' α -1-antitrypsine une activité chimiotactique qui s'exprime vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles³⁰. L' α -1-antitrypsine étant produite par les pneumocytes de type 2, ce phénomène pourrait intervenir au cours de l'emphysème, et en effet une accumulation de polymères d' α -1-antitrypsine mutée est observée dans les cloisons alvéolaires des patients atteints d'emphysème, colocalisée avec les polynucléaires neutrophiles. La relation de cause à effet entre l'accumulation de polymères d' α -1-antitrypsine mutée et le déclenchement de la réaction inflammatoire est suggérée par le caractère chimiotactique de ces polymères *in vivo* chez la souris³¹. Cet événement pourrait représenter un élément important de la physiopathologie de l'emphysème chez les patients atteints de déficit en α -1-antitrypsine et pourrait contribuer à expliquer le bénéfice médiocre que tirent ces patients du traitement substitutif.

Une association entre la présence de mutations de l' α -1-antichymotrypsine, une autre sérine protéase produite par les hépatocytes, et l'emphysème pulmonaire a également été rapportée³².

2.2.1.2.Pathologies du tissu conjonctif

Des maladies constitutives du tissu conjonctif, en particulier le syndrome de Marfan, le syndrome d'Ehlers-Danlos et la cutis laxa peuvent s'exprimer sous la forme d'un emphysème pulmonaire spontané dont le développement commence généralement dans l'enfance. Ces pathologies illustrent le rôle critique que joue la perte de l'homéostasie de la matrice extracellulaire dans le développement de l'emphysème.

2.2.1.2.1.Syndrome de Marfan

Le syndrome de Marfan est une pathologie du tissu conjonctif, héréditaire autosomique dominante, dont l'incidence est de 1/5000 naissances. Le gène impliqué est celui de la fibrilline-1, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, situé sur le chromosome 15. La fibrilline-1 est le principal composant des microfibrilles qui sont distribués de façon large dans la matrice extracellulaire des tissus élastiques et non élastiques. Le rôle des microfibrilles est incomplètement connu mais il semblerait qu'ils contribuent de façon majeure à la construction des fibres élastiques en servant de support sur lequel celles-ci sont assemblées³³.

L'emphysème pulmonaire semble peu fréquent et adopte une forme préférentiellement bulleuse et apicale chez les patients atteints du syndrome de Marfan. Ainsi, dans une série rétrospective portant sur 100 patients, dont 16 avaient présenté une symptomatologie pulmonaire, des lésions d'emphysème bulleux apical étaient détectées chez 5 sujets³⁴.

Par ailleurs, il est à noter que la localisation dans les cloisons alvéolaires de la fibrilline-1 est altérée chez les patients chez qui des lésions histologiques d'emphysème débutant sont détectées. Chez les sujets sains, le marquage par un anticorps dirigé contre la fibrilline-1 est révélé sous la forme d'un réseau maillant les cloisons alvéolaires. Chez les sujets atteints d'emphysème débutant, celui-ci est raréfié et prend un aspect morcelé³⁵.

2.2.1.2.2.syndrome d'Ehlers-Danlos

Le syndrome d'Ehlers-Danlos est un ensemble hétérogène de maladies génétiques ayant en commun une hyperélasticité cutanée, une hyperlaxité ligamentaire et une fragilité des tissus, dont les mécanismes sont multiples et mal connus et dont neuf formes cliniques ont été décrites. L'emphysème pulmonaire attribuable au syndrome d'Ehlers-danlos semble peu fréquent par rapport aux autres atteintes de la maladie et peut prendre soit la forme d'un emphysème bulleux apical révélé par des pneumothorax³⁶, soit la forme d'un emphysème panlobulaire de distribution homogène dans le poumon³⁷.

2.2.1.2.3.Cutis Laxa

Le terme cutis laxa regroupe des pathologies rares des fibres élastiques dont il existe des formes liées à l'X, des formes autosomales dominantes et des formes autosomales récessives. Par définition, cette pathologie est caractérisée par une perte de l'élasticité cutanée, la peau de ces patients formant de nombreux plis flasques et paraissant prématurément vieillie. Il s'y associe de nombreuses atteintes viscérales dont la plus fréquente est un emphysème pulmonaire de type panlobulaire, précoce et rapidement évolutif³⁸.

Plusieurs gènes ayant en commun de participer à la synthèse des fibres élastiques ont été impliqués dans la survenue de ce syndrome : Tropoélastine³⁹, fibuline-4⁴⁰, fibuline-5⁴¹.

2.2.1.3.Vascularite urticariante hypocomplémentémique

La vascularite urticariante hypocomplémentémique est liée à un déficit en la fraction C1a du complément. Cette pathologie est responsable d'épisodes d'urticaire géant de mécanisme non allergique auxquels s'associent des atteintes articulaires et rénales. Il peut s'y ajouter une atteinte pulmonaire qui prend la forme d'un emphysème de type panlobulaire dont les mécanismes de constitution sont inconnus. Sur le plan histologique, les lésions observées au niveaux cutané et rénal correspondent à une vascularite des vaisseaux de petit calibre, alors qu'au niveau pulmonaire aucune lésion de vascularite n'est observée⁴².

2.2.2.Polymorphismes génétiques associés au développement de l'emphysème chez les fumeurs

Un certain nombre de polymorphismes génétiques potentialisant l'agression environnementale ont été associés au développement de l'emphysème chez les sujets

fumeurs. Sur le plan clinique, ces associations se traduisent par le fait que seule une minorité de fumeurs, de l'ordre de 10 à 15% d'entre eux, développe un emphysème.

2.2.2.1. Polymorphismes associés à la BPCO

De nombreux polymorphismes ont été associés chez les sujets fumeurs au développement d'une BPCO définie par un déclin accéléré de la fonction respiratoire. Les gènes identifiés incluent des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que l'interleukine 10 (IL-10), l'interleukine 13 (IL-13), le toll-like receptor 4 (TLR4), le TGF-beta ; le TIMP-2, une antiprotéase, ainsi que plusieurs protéases dont les métalloprotéases matricielles (MMP) 1 et 12 et la SERPINE-2 aussi nommée Plasminogen Activator Inhibitor-1 ; des enzymes impliqués dans la défense anti-oxydante et la détoxification des xénobiotiques comme la Glutathion-S-Transférase (GST); des protéines impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire et de l'apoptose comme p53 et p21. Les gènes dont des polymorphismes ont été associés de façon claire au développement de la BPCO sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Gènes dont les polymorphismes sont associés au développement de la BPCO chez les fumeurs

	Site du polymorphisme	Conséquence fonctionnelle	Référence
Inflammation			
IL-10	Gène 1082 A/G	Diminution des taux	43
IL-13	Promoteur -1055 C/T	?	44
TLR4	Gène 299 A/G	Perte de fonction	45
TGFb	Gène & promoteur -10807G/A -509T/C 29T/C	?	46
TGFb	Gène -800 G/A -509 C/T	?	47
Protéases/ antiprotéases			
TIMP-2	Gène	?	48

	853 G/A -418 G/C		
MMP-1	Promoteur -1607 G/GG	Augmentation de l'expression	49
MMP-12	Promoteur Asn357Ser	?	49
SERPINE-2	Gène -39698 C/T -34079 A/G -33227 C/T -31810 A/G -26328 A/G 440 A/G 3775 A/G 3796 C/T	?	50
SERPINE-2	Gène rs6734100 C/G rs729631 C/G rs975278 A/G rs7583463 A/C rs6748795 C/G	?	51
Anti-oxydants / détoxification			
GST	Gène Délétion GSTT1 Délétion GSTM1 GSTP1 313 A/G	?	52
Survie/apoptose			
p53	Gène Arg72Pro	?	53
p21	Gène Ser31Arg	?	53

2.2.2.2. Polymorphismes directement associés à l'emphysème

De plus, certains polymorphismes ont été associés non seulement au développement d'un trouble ventilatoire obstructif irréversible mais également à celui de lésions anatomiques caractéristiques d'un emphysème pulmonaire, ces lésions ayant été appréciées de façon non invasive par le scanner dans la plupart des études. Des polymorphismes responsables

d'une augmentation de l'expression du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), une cytokine pro-inflammatoire, et de la MMP-9, une enzyme protéolytique, ont été associés au développement de l'emphysème chez les sujets fumeurs, ainsi que des polymorphismes responsables d'une perte de fonction de l'hème-oxygénase-1 (HO-1), une puissante enzyme anti-oxydante, et de la mEPHX. Un polymorphisme réduisant l'activité du promoteur de la cathepsine S, une enzyme élastolytique, a également été associé à l'emphysème⁵⁴. Les gènes dont les polymorphismes ont été associés de façon claire au développement de l'emphysème chez les sujets fumeurs sont rapportés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Gènes dont les polymorphismes sont associés au développement de l'emphysème chez les fumeurs

	Site du polymorphisme	Conséquence fonctionnelle	Référence
Inflammation			
TNF- α	Promoteur -308 G/A	Augmentation de l'expression	55
Protéases			
MMP-9	Promoteur -1562 C/T	Augmentation de l'expression	56
MMP-9	Promoteur -1562 C/T	Augmentation de l'expression	57
Anti-oxydants/ détoxification			
HO-1	Promoteur Répétition de motifs GT	Diminution de l'expression	58
mEPHX	Gene 113 T/C	Perte de fonction	59

3. Deuxième partie : Mécanismes physiopathologiques concourant à la destruction des structures alvéolaires au cours de l'emphysème

La plupart des études consacrées à la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire ont été centrées sur les mécanismes impliqués dans l'agression du parenchyme pulmonaire par la fumée de cigarette ou les enzymes élastasiques. Les principaux mécanismes identifiés sont un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur d'un excès de protéases, une réaction inflammatoire pulmonaire chronique, un excès d'espèces réactives de l'oxygène, enfin la survenue de modifications cellulaires incluant une sénescence accélérée et l'apoptose des cellules résidentes du poumon.

3.1.Déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases

Le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases dans le poumon est historiquement le premier mécanisme physiopathologique de l'emphysème mis en évidence, la formulation de ce concept prenant son origine dans l'observation de lésions d'emphysème sévère chez les patients atteints de déficit en α -1-antitrypsine dans la population suédoise.

Un excès de protéases est observé dans le poumon des patients atteints d'emphysème quel qu'en soit la cause, ainsi que de façon constante dans les modèles animaux d'emphysème. Les protéases impliquées appartiennent aux familles des sérine protéases, des cystéine protéases et des métalloprotéases matricielles (MMP). La relation de cause à effet entre un excès de protéases dans le poumon et le développement de l'emphysème a été démontrée dans les modèles animaux.

3.1.1.Protéases

3.1.1.1.Sérine protéases

3.1.1.1.1.Elastase leucocytaire

L'élastase leucocytaire est produite par les polynucléaires neutrophiles. Sa fonction physiologique est de détruire les pathogènes phagocytés par ces cellules et d'inactiver par clivage protéolytique certains de leurs facteurs de virulence⁶⁰, mais elle possède aussi la capacité de dégrader les fibres élastiques qui sont un élément essentiel de la matrice extra

cellulaire du poumon⁶¹. Une augmentation des taux d'élastase leucocytaire a été rapportée dans le liquide de lavage broncho alvéolaire de patients atteints d'emphysème débutant⁶². Son expression est colocalisée avec les lésions d'emphysème dans ce contexte⁶³.

La relation de cause à effet entre un excès d'élastase leucocytaire et le développement de l'emphysème n'a pas été démontrée chez l'homme mais a été établie de façon claire chez l'animal. Les souris dont le gène de l'élastase leucocytaire a été inactivé sont protégées à plus de 50% contre le développement de l'emphysème induit par l'exposition chronique à la fumée de cigarette⁶⁴. De plus, l'administration en excès d' α -1-antitrypsine humaine chez la souris⁶⁵ et celle d'inhibiteurs synthétiques de l'élastase leucocytaire chez le cobaye⁶⁶ possèdent également un effet protecteur vis-à-vis de l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette.

3.1.1.1.2. Protéinase 3

La protéinase 3 est, comme l'élastase leucocytaire, synthétisée et stockée par les polynucléaires neutrophiles. Son activité élastolytique est proche de celle de l'élastase leucocytaire⁶⁷. Le rôle de la protéinase 3 n'a pas été démontré au cours de l'emphysème humain mais, de même que l'élastase leucocytaire, cette enzyme peut induire des lésions très étendues d'emphysème après son instillation trachéale chez le hamster⁶⁸.

3.1.1.2. Cystéine protéases : Cathepsines

Les cathepsines sont des enzymes protéolytiques de localisation principalement lysosomale, donc intracellulaire, mais aussi extracellulaire. Leur fonction biologique principale est d'assurer la dégradation des protéines incorporées dans le lysosome mais elles peuvent aussi participer à la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire comme par exemple dans le contexte de la progression métastatique des tumeurs⁶⁹. Sept des onze cathepsines connues chez l'homme possèdent une activité élastolytique (cathepsines B, G, F, K, L, S, V). La cathepsine G est synthétisée et stockée par les polynucléaires neutrophiles ; les cathepsines B, K, L et S sont produites et stockées par les monocytes et macrophages. Les cathepsines sont inhibées *in vivo* par les cystatines et les thyropines.

La cathepsine S semble impliquée dans la physiopathologie de l'emphysème mais son rôle reste non établi. En effet, alors qu'une augmentation de l'activité du promoteur de la cathepsine S est associée à une sévérité moindre de l'emphysème dans une population japonaise⁵⁴, sa présence est nécessaire au développement de l'emphysème pulmonaire induit par la surexpression de l'interféron gamma dans le poumon⁷⁰.

3.1.1.3.Métallo protéases matricielles

La famille des métalloprotéases matricielles (MMP) regroupe chez l'homme 24 protéases ayant en commun la présence d'un atome de zinc au niveau de leur site catalytique. Elles sont sécrétées sous la forme de pro-enzyme et sont activées par clivage. Les MMP peuvent pour la plupart hydrolyser divers substrats mais elles possèdent chacune un certain degré de spécificité vis-à-vis de certains d'entre eux. Elles jouent un rôle central au cours des processus de remodelage tissulaire, aussi bien en conditions physiologiques comme par exemple au cours du développement⁷¹ ou au cours de la cicatrisation cutanée⁷², qu'en situation pathologique comme par exemple dans l'athérosclérose⁷³. Elles sont inhibées de façon globale et irréversible par l' α -2-macroglobuline et de façon spécifique par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (Tissue Inhibitors of Metallo Proteinases ou TIMP) qui sont au nombre de quatre. D'autres protéines possèdent la capacité d'inhiber les MMP comme par exemple la protéine RECK⁷¹.

Dans leur ensemble, les MMP semblent essentiellement délétères au cours de l'emphysème. En effet, l'administration d'un inhibiteur pharmacologique à large spectre des MMP possède un effet protecteur dans le modèle d'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette chez le cobaye⁷⁴. De même, l'administration de doxycycline, qui inhibe de façon non spécifique les MMP, protège de l'emphysème induit par l'inactivation du gène du VEGF dans le poumon⁷⁵. Les métalloprotéases semblent donc jouer un rôle important dans la constitution des lésions dans ces modèles animaux.

Plus spécifiquement, parmi les 24 membres de la famille des MMP, les MMP-1, -2, -9 et -12 semblent jouer un rôle dans la dégradation progressive des structures alvéolaires au cours de l'emphysème. La MMP-1 dégrade de façon quasi-exclusive les fibres de collagène. Les MMP-2, -9 et -12 dégradent également les fibres élastiques.

3.1.1.3.1.MMP-1

La MMP-1 est fortement exprimée par les pneumocytes de type 2 dans le poumon emphysemateux humain, alors qu'elle n'est pas exprimée dans le poumon de fumeurs sans emphysème ou de sujets non fumeurs^{76, 77}. Son expression pulmonaire augmente également chez le cobaye exposé à la fumée de cigarette⁷⁸. Cette augmentation de l'expression de MMP-1 dans le poumon emphysemateux joue probablement un rôle causal dans le développement des lésions puisque les souris exprimant la MMP-1 humaine dans le poumon développent spontanément des lésions d'emphysème⁷⁹. Dans ce contexte, la cible principale de la MMP-1 semble être le collagène III plutôt que le collagène I⁸⁰.

Sur le plan mécanique, le seuil de rupture des fibres collagènes est abaissé dans le poumon des souris chez qui un emphysème pulmonaire a été induit par une instillation trachéale d'élastase, suggérant que la dégradation des fibres collagènes participe à la pathogénie de l'emphysème pulmonaire⁸¹.

3.1.1.3.2.MMP-2

Une augmentation de l'expression pulmonaire de MMP-2 est observée de façon quasi-constante dans le poumon emphysémateux. Le contenu en ARNm de MMP-2 est plus élevé dans le poumon emphysémateux par rapport au poumon sain⁸². De même, une augmentation de l'expression ou de l'activité pulmonaires de MMP-2 est observée au cours de l'emphysème induit chez l'animal par l'instillation trachéale d'élastase⁸³, par la surexpression de l'IL-13 dans le poumon⁸⁴, par l'auto-immunisation contre les cellules endothéliales⁸⁵ ou par l'inhalation de cadmium⁸⁶, bien que son rôle dans ces modèles n'ait pas été défini précisément.

3.1.1.3.3.MMP-9

Une plus forte concentration de MMP-9 a été rapportée dans le produit de l'expectoration induite chez les patients atteints d'emphysème par rapport à des sujets non fumeurs⁸⁷. Les sources de cette enzyme dans le poumon ne sont pas connues exhaustivement mais, en dehors des polynucléaires neutrophiles qui en sont la source principale, il est démontré que les macrophages alvéolaires des patients atteints de BPCO produisent de grandes quantités de MMP-9⁸⁸. Une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de MMP-9 dans le poumon est associée au développement des lésions dans la plupart des modèles animaux d'emphysème pulmonaire^{83, 85, 86, 89-93}.

Il semble exister une relation de cause à effet entre la surexpression ou l'activation de MMP-9 dans le poumon et le développement de l'emphysème. L'inactivation du gène de MMP-9 possède un effet protecteur vis-à-vis de l'emphysème induit par la surexpression dans le poumon de l'IL-13⁹⁴. Inversement, la surexpression par les macrophages de la MMP-9 humaine conduit au développement spontané de lésions d'emphysème chez la souris⁹⁵.

3.1.1.3.4.MMP-12

MMP-12 est la MMP possédant la plus forte activité élastinolytique⁷¹. Dans le poumon, elle est produite et libérée essentiellement par les macrophages mais aussi par l'épithélium des

voies aériennes⁹⁶. Une élévation du contenu pulmonaire en MMP-12 est observée chez les patients atteints de BPCO^{97, 98}. Une augmentation du contenu pulmonaire en MMP-12 a été observée après inhalation de fumée de cigarette chez le rat⁹⁹ et la souris¹⁰⁰.

Il est probable que la MP-12 joue un rôle de premier plan en pathologie humaine. En effet, les souris dont le gène de MMP-12 a été inactivé sont complètement protégées de l'emphysème induit par l'exposition chronique à la fumée de cigarette, ce qui démontre la relation de cause à effet entre l'activité de cette enzyme et le développement de l'emphysème dans ce modèle. En plus de son rôle dans la dégradation des structures alvéolaires, la MMP-12 joue un rôle essentiel au cours de la réaction inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette puisque son inactivation prévient l'alvéolite macrophagique qui est observée dans ce contexte¹⁰¹.

3.1.1.3.5. Inhibiteurs des MMP

TIMP

Le rôle dans le développement de l'emphysème d'un déficit relatif en TIMP-1 par rapport à un excès de MMP-9 a été avancé par certains auteurs^{87, 88}. Chez la souris, l'inactivation du gène de TIMP-3 conduit au développement spontané de lésions pulmonaires d'allure emphysemateuse¹⁰².

α -2-macroglobuline

L' α -2-macroglobuline ne semble pas être impliquée dans la physiopathologie de l'emphysème puisque les taux circulants de cette protéine ne sont pas diminués chez les patients atteints d'emphysème tabagique et sont plus élevés chez les patients déficitaires en alpha-1-antitrypsine par rapport à des patients témoins¹⁰³.

Le rôle joué dans le développement de l'emphysème par un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases est bien établi, les observations faites chez l'homme ayant été reproduites, et les relations de cause à effet bien démontrées, chez l'animal et en particulier dans le modèle d'emphysème induit par la fumée de cigarette. Cependant, s'il est central dans la physiopathologie de l'emphysème, ce phénomène ne constitue qu'un des mécanismes contribuant à la destruction des cloisons alvéolaires.

3.2.Réaction inflammatoire chronique

Une réaction inflammatoire chronique impliquant plusieurs types cellulaires est constamment observée dans le poumon emphysémateux humain. Les macrophages alvéolaires, qui sont exposés de façon directe aux polluants inhalés et donc à la fumée de cigarette, y occupent une place particulièrement importante. La caractéristique essentielle de cette réaction inflammatoire est son caractère auto-entretenu puisque qu'elle persiste des années voire indéfiniment chez les patients qui ont arrêté de fumer, c'est-à-dire après la correction du facteur déclenchant de la maladie. Son rôle dans le développement de l'emphysème a été démontré dans des modèles animaux : Les souris surexprimant dans le poumon l'interféron-gamma ou l'interleukine-13, deux cytokines pro-inflammatoires, développent spontanément un emphysème pulmonaire^{84, 104}.

3.2.1.Cellules impliquées

3.2.1.1.Macrophages

Une infiltration macrophagique importante est présente dans le poumon emphysémateux humain, l'augmentation du nombre de macrophages atteignant un facteur 15 dans le tissu alvéolaire et les espaces alvéolaires par rapport au poumon sain¹⁰⁵. Les macrophages sont de plus localisés au niveau des sites de destruction des cloisons alvéolaires¹⁰⁶, ce qui suggère que ces cellules pourraient être impliquées dans le développement des lésions. Effectivement, les macrophages alvéolaires participent aux principaux mécanismes physiopathologiques reconnus de l'emphysème. Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres de l'oxygène et des enzymes protéolytique, au premier plan desquelles les MMP-2, -9 et -12.

Le rôle joué par les macrophages au cours de l'emphysème semble essentiel. Chez l'homme, le nombre de macrophages dans le tissu pulmonaire est corrélé à l'intensité de la dégradation des structures alvéolaires et à la sévérité du trouble ventilatoire obstructif¹⁰⁶. En conditions expérimentales, l'infiltration des cloisons alvéolaires et des espaces aériens par les macrophages est associée au développement de l'emphysème lors d'une exposition chronique à la fumée de cigarette chez le cobaye¹⁰⁷, chez la souris¹⁰¹ et chez le rat¹⁰⁸. Surtout, l'administration d'un anticorps cytotoxique pour ces cellules protège du développement de l'emphysème induit par la fumée de cigarette chez le rat, ce qui démontre que les macrophages sont nécessaires au développement de l'emphysème pulmonaire induit par la fumée de cigarette¹⁰⁹.

3.2.1.2. Polynucléaires neutrophiles

Une augmentation du nombre des polynucléaires neutrophiles a été rapportée dans le LBA¹¹⁰ et dans le tissu pulmonaire¹⁰⁵ des fumeurs ou ex-fumeurs atteints d'emphysème par rapport aux fumeurs qui sont indemnes de cette pathologie. Pour autant, la nature du rôle de ces cellules dans la pathogénie de l'emphysème, délétère ou bénéfique, reste mal connu. D'une part, les polynucléaires neutrophiles contribuent de façon majeure à la dégradation de la matrice extracellulaire pulmonaire après une exposition intense et de courte durée à la fumée de cigarette chez l'animal, par l'intermédiaire des sérine protéases qu'ils produisent¹¹¹. D'autre part, chez l'homme, le nombre de polynucléaires neutrophiles dans le tissu pulmonaire est corrélé de façon inverse avec la sévérité de l'emphysème, indiquant que la nature neutrophilique de la réaction inflammatoire pulmonaire est associée à une préservation de l'architecture du poumon profond¹⁰⁶. Chez le rat, l'administration d'un anticorps cytotoxique vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles ne protège pas de l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette¹⁰⁹, ce qui indique que ces cellules ne soient pas nécessaires au développement de l'emphysème. Il est d'ailleurs notable que les pathologies au cours desquelles un afflux massif de polynucléaires neutrophiles dans le poumon est observé, qu'elles soient aiguës comme les pneumopathies infectieuses ou chroniques comme les bronchectasies, ne s'accompagnent pas de la constitution de lésions d'emphysème.

3.2.1.3. Lymphocytes T et B

Une infiltration du parenchyme pulmonaire par des lymphocytes T oligoclonaux activés participe à la réaction inflammatoire pulmonaire au cours de l'emphysème¹¹², et un nombre élevé de lymphocytes T dans le poumon est associé à la sévérité des lésions¹⁰⁶. Les lymphocytes présents dans le poumon de ces patients sont majoritairement de type CD8^{105, 113}. Les lymphocytes CD4 présents expriment quant à eux préférentiellement le phénotype Th1¹¹⁴. De plus, l'infiltration du poumon par les lymphocytes intéresse aussi les lymphocytes B et possède un caractère organisé puisque la présence de follicules lymphoïdes, qui sont absents du poumon sain, a été rapportée chez des patients atteints d'emphysème^{105, 115}. L'infiltration du poumon profond par des lymphocytes observée dans l'emphysème humain est reproduite chez la souris exposée à la fumée de cigarette¹¹⁶.

Le rôle joué par les lymphocytes T au cours de l'emphysème est mal connu, les données disponibles s'avérant contradictoires. Ainsi, alors que les souris déficientes en lymphocytes T CD8+ (mais non en lymphocytes T CD4+) sont protégées de l'emphysème induit par la

fumée de cigarette¹¹⁷, les souris SCID, dont les lymphocytes B et T ne sont pas fonctionnels, ne le sont pas¹¹⁸.

La preuve que les lymphocytes T pouvaient dans certaines conditions jouer un rôle central dans le développement de l'emphysème a cependant été apportée. En effet, le transfert de lymphocytes CD4 prélevés chez des rats immunisés contre les cellules endothéliales humaines vers d'autres rats non immunisés suffit à l'induction chez ces derniers, comme chez les rats donneurs, d'un emphysème pulmonaire⁸⁵. Enfin, une contribution des lymphocytes B au développement de l'emphysème a récemment été proposée. Chez l'homme, la présence de follicules lymphoïdes constitués de lymphocytes B oligoclonaux est associée à la sévérité de la maladie¹¹⁵.

3.2.1.4. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques, dont la fonction principale est de présenter l'antigène aux lymphocytes T, peuvent activer la plupart des cellules impliquées dans les réactions inflammatoire et immunitaire. Un rôle important de ces cellules au cours des pathologies pulmonaires inflammatoires chroniques, dont l'emphysème, est suspecté¹¹⁹.

L'intoxication tabagique est par elle-même responsable d'une infiltration du poumon par des cellules de la lignée dendritique. Une augmentation d'un facteur 30 du nombre des cellules de Langerhans est observée au niveau du parenchyme pulmonaire des sujets fumeurs par rapport à celui des non-fumeurs¹²⁰.

La présence de cellules dendritiques folliculaires, révélées par un anticorps anti-CD21, a été établie en association à celle des lymphocytes B au sein des follicules lymphoïdes présents dans le parenchyme pulmonaire des patients atteints d'emphysème pulmonaire¹¹⁵, de même qu'au niveau de l'épithélium et de l'adventice des petites voies aériennes chez les patients atteints de BPCO¹²¹. L'exposition chronique à la fumée de cigarette reproduit ce phénomène chez la souris, l'infiltration par les cellules dendritiques prédominant cependant au niveau des voies aériennes et non des cloisons alvéolaires dans cette espèce. Les expériences animales ont de plus permis de préciser les caractéristiques des cellules dendritiques présentes dans le poumon emphysémateux, ces cellules présentant un certain degré d'activation indiqué par une expression plus forte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et de la molécule de co-stimulation CD40¹¹⁶. Si la présence de cellules dendritiques est établie dans le poumon emphysémateux, les antigènes reconnus et le rôle que jouent ces cellules dans cette pathologie ne sont pas connus.

3.2.2.Auto-entretien de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire pulmonaire observée au cours de l'emphysème possède la caractéristique essentielle de persister pour une longue période après la correction de son facteur déclenchant, notamment après le sevrage tabagique¹²². Une persistance de la réaction inflammatoire pulmonaire est également observée chez les souris exposées à la fumée de cigarette pendant 6 semaines puis soustraites à cette exposition¹²³.

Plusieurs mécanismes potentiellement à l'origine de la perpétuation de la réponse inflammatoire pulmonaire au cours de l'emphysème ont été identifiés. L'activité chimiotactique des produits de dégradation de l'élastine, des phénomènes auto-immuns et une diminution du nombre des lymphocytes T régulateurs dans le poumon, ces trois phénomènes paraissant étroitement intriqués, contribuent à ce phénomène. La nitrosylation de l'histone déacétylase macrophagique pourrait aussi participer à la perpétuation de la réponse inflammatoire pulmonaire. Chez les patients atteints de déficit en α -1-antitrypsine, l'accumulation d' α -1-antitrypsine mutée, qui possède des propriétés chimiotactiques, pourrait également y participer.

3.2.2.1.Activité chimiotactique des fragments d'élastine

Les propriétés chimiotactiques des fragments d'élastine vis-à-vis des monocytes et des macrophages ont été reconnues dès le début des années 80, l'implication potentielle de ce phénomène dans la physiopathologie de l'emphysème ayant d'ailleurs été suspectée dès cette période¹²⁴. L'exposition de monocytes et de macrophages aux peptides d'élastine induit de plus leur activation aboutissant à la libération vers le milieu extracellulaire d'enzymes possédant une activité élastasique¹²⁵.

Le rôle joué par les peptides d'élastine dans l'emphysème par l'intermédiaire de leur activité chimiotactique n'est pas décrit chez l'homme mais a été démontré en conditions expérimentales. Chez les souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette, l'administration d'un anticorps neutralisant les peptides d'élastine inhibe à 66% l'accumulation de macrophages dans le poumon. Le même anticorps inhibe complètement le développement des lésions dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation d'élastase dans la même espèce. Il est à noter que la formation de peptides d'élastine possédant une activité chimiotactique vis-à-vis des monocytes/macrophages semble essentiellement dépendante de MMP-12 chez la souris¹²⁶.

3.2.2.2.Auto-immunité

Des phénomènes d'auto-immunité impliquant l'immunité humorale et l'immunité cellulaire ont été mis en évidence dans des modèles animaux d'emphysème ainsi que chez l'homme.

La possibilité de l'implication dans le développement de l'emphysème d'anticorps dirigés contre des composants de la cloison alvéolaire a été démontrée chez l'animal. L'injection de sérum provenant de rats immunisés contre les cellules endothéliales humaines, chez lesquels des anticorps dirigés contre l'endothélium autologue sont présents, induit un emphysème pulmonaire chez la souris⁸⁵. Des anticorps anti-endothélium ne semblent pas présents chez les patients atteints d'emphysème mais des auto-anticorps dirigés contre l'élastine ont été identifiés dans le sérum de ces patients ¹²⁷.

L'implication de l'immunité cellulaire dans l'emphysème a été rapportée chez l'homme et implique au premier plan la présence de fragments d'élastine. En effet, les lymphocytes T CD4+ isolés à partir du sang des patients emphysémateux sont activés spécifiquement et très intensément par l'exposition aux peptides d'élastine, cette réaction étant dépendante des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II¹²⁷.

3.2.2.3.Diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs dans le poumon emphysémateux

Les lymphocytes T régulateurs, caractérisés par l'expression des molécules de surface CD4 et CD25, orchestrent la réponse immune et notamment répriment le développement de clones lymphocytaires T auto-réactifs. Des altérations fonctionnelles des lymphocytes T régulateurs sont observées au cours de nombreuses pathologies auto-immunes¹²⁸. En accord avec l'hypothèse de la participation de phénomènes d'auto-immunité au développement de l'emphysème, une diminution de l'ordre de 70% du nombre de ces cellules a été rapportée dans le poumon de patients atteints d'emphysème sévère par rapport au poumon de sujets sains, alors que le nombre de ces cellules dans le sang n'était pas différent entre les deux groupes¹²⁷.

3.2.2.4.Nitrosylation de l'histone déacétylase

L'acétylation des histones est associée à l'activation de la transcription, notamment lors de la réponse inflammatoire. L'histone déacétylase (HDAC) est impliquée dans la répression de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages alvéolaires¹²⁹. Son activité et son expression sont fortement diminuées dans le poumon des patients atteints de BPCO¹³⁰. HDAC est inactivée par l'exposition à la fumée de cigarette, le mécanisme principal

de cet effet étant sa nitrosylation¹³¹. L'inactivation de la HDAC macrophagique par la fumée de cigarette pourrait contribuer à la perpétuation de la réaction inflammatoire pulmonaire chronique au cours de l'emphysème.

La présence d'une réaction inflammatoire chronique dans le poumon est un des mécanismes principaux de la dégradation des structures alvéolaires dans le poumon emphysémateux. Cause ou conséquence de celle-ci, un excès d'espèces réactives de l'oxygène participe également à l'agression chronique du poumon profond au cours de cette maladie.

3.3.Excès d'espèces réactives de l'oxygène dans le poumon

Un excès d'espèces réactives de l'oxygène est observé dans le cadre du vieillissement normal mais aussi au cours de nombreuses pathologies dégénératives chroniques, et semble jouer un rôle central au cours de la BPCO. Il est la résultante d'un déséquilibre entre d'une part une production excessive d'oxydants et d'autre part un défaut d'expression ou d'activité des systèmes anti-oxydants qui à l'état normal sont exprimés à un haut niveau dans le poumon. La nature des espèces réactives de l'oxygène ainsi que leurs sources cellulaires et moléculaires sont multiples dans le poumon atteint de BPCO, alors que de multiples cibles de ces espèces radicalaires ont été identifiées. La relation de cause à effet entre l'excès d'oxydants dans le poumon et le développement de l'emphysème a été vérifiée dans des modèles animaux.

3.3.1.Nature et source des espèces réactives de l'oxygène dans le poumon emphysémateux

La première source d'espèces réactives de l'oxygène au cours de l'emphysème pulmonaire est la fumée de cigarette qui contient de l'ordre de 10^{14} de ces composés par bouffée, dont la majorité sont des radicaux alkoxyl (RO.) et peroxy (RO₂-)¹³². Cependant, une surproduction endogène de radicaux libres de l'oxygène joue un rôle essentiel au cours de l'emphysème. Le principal des radicaux libres de l'oxygène endogènes produits dans le poumon emphysémateux semble être l'anion superoxyde (O₂⁻) (figure 1). Les sources cellulaires et moléculaires de l'anion superoxyde sont multiples dans le poumon.

3.3.1.1.Sources cellulaires de l'anion superoxyde au niveau pulmonaire

Les macrophages alvéolaires¹³³, les polynucléaires neutrophiles¹³⁴ mais aussi les pneumocytes 2 produisent l'anion superoxyde. Chez le cobaye, les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 produisent l'anion superoxyde en quantité comparable à celle produite par les macrophages alvéolaires¹³⁵. De même, l'étirement mécanique entraîne la production d'anion superoxyde dans des cultures primaires de cellules alvéolaires de type 2 de rat¹³⁶. Les fibroblastes pulmonaires ne semblent pas produire d'anion superoxyde¹³⁵.

3.3.1.2.Sources moléculaire de l'anion superoxyde dans la cellule

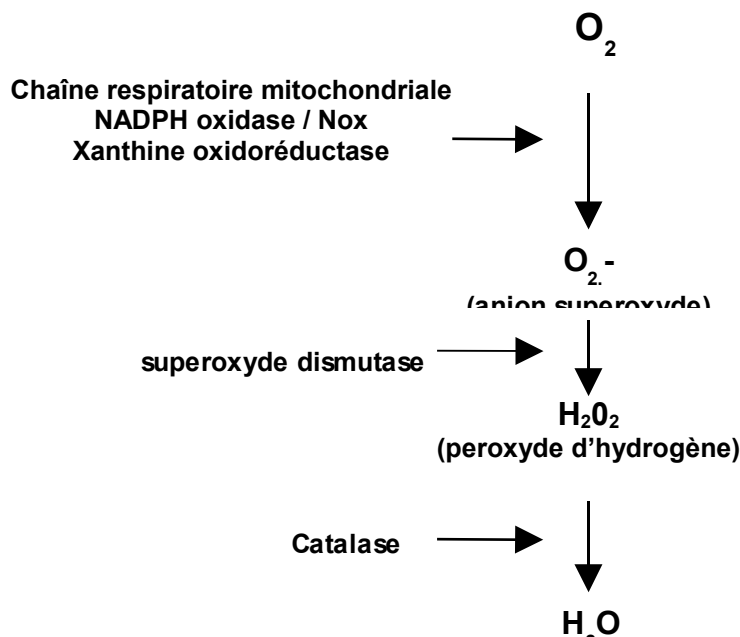
Les trois principales sources d'anion superoxyde dans la cellule sont la chaîne respiratoire mitochondriale, les molécules de la famille de la NADPH oxydase (NOX) et la xanthine oxidoréductase.

A l'état basal, environ 1 à 3% de l'O₂ consommé par la cellule est incomplètement métabolisé par la chaîne respiratoire mitochondriale et est converti en anion superoxyde. L'inhibition du transfert d'électron au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est associée à une augmentation de la production d'anion superoxyde¹³⁶.

Les NOX sont des protéines intermembranaires catalysant la génération d'anion superoxyde à partir de l'O₂ et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). La NADPH oxydase ou NOX2, archétype de cette famille, a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle participe à la destruction des pathogènes. D'autres enzymes de la famille des NOX ont été identifiées dans des cellules non phagocytaires, notamment épithéliales. En particulier, au niveau pulmonaire, NOX4 participe à la production de radicaux libres de l'oxygène par les pneumocytes de type 2¹³⁷.

Enfin, la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en urate, nécessitant pour cela la réduction de l'O₂, et la production d'anion superoxyde. La xanthine oxydase est essentiellement exprimée par les cellules endothéliales vasculaires et est impliquée dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Cependant, des arguments indirects suggèrent la présence de la xanthine oxydase dans les pneumocytes de type 2. Ainsi, dans le modèle d'œdème pulmonaire de réexpansion chez le rat, alors qu'il existe une forte production de radicaux libres de l'oxygène dans les pneumocytes de type 2, l'administration d'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, diminue la production de radicaux libres de l'oxygène dans le poumon¹³⁸.

Figure 1: radicaux libres de l'oxygène



3.3.2.Participation des radicaux libres de l'oxygène au développement de l'emphysème

3.3.2.1.Excès d'espèces réactives de l'oxygène dans le poumon au cours de la BPCO

Un déséquilibre de la balance oxydants / antioxydants en faveur d'un excès d'oxydants est une des caractéristiques essentielles du poumon au cours de la BPCO. En témoignant, le taux d' H_2O_2 dans l'air exhalé est plus élevé chez les sujets fumeurs et les sujets atteints de BPCO par rapport aux sujets non fumeurs¹³⁹, alors que des produits de peroxydation lipidique, marquant la présence d'espèce réactives de l'oxygène, sont détectés à des taux élevés dans le condensat d'air exhalé et le tissu pulmonaire des fumeurs atteints de BPCO par rapport à ceux des fumeurs indemnes d'emphysème et des non fumeurs^{140, 141}. Enfin, une forte production d'anion superoxyde est détectée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des sujets atteints de BPCO¹⁴².

3.3.2.2.Expression pulmonaires des systèmes antioxydants dans l'emphysème : Données contradictoires

Les systèmes antioxydants présents dans le poumon sont multiples et incluent à la fois des éléments extracellulaires tels que le glutathion et des éléments intracellulaires tels que les superoxyde dismutases (SOD), la catalase ou l'hème-oxygenase-1 (HO-1). L'expression de ces systèmes est sous le contrôle de facteurs de transcription, notamment du facteur Nrf2¹⁴³.

L'expression de certains systèmes anti-oxydants est diminuée dans le poumon emphysemateux. Ainsi, les macrophages alvéolaires des sujets atteints de BPCO sévère expriment l'HO-1 à un niveau inférieur à celui des macrophages alvéolaires des sujets fumeurs indemnes d'emphysème¹⁴⁴. De même, l'expression de Nrf2 est plus faible dans le poumon emphysemateux humain par rapport au poumon de sujets fumeurs indemnes d'emphysème ou non fumeurs¹⁴⁵. Cependant, l'expression pulmonaire d'autres systèmes anti-oxydants semble augmentée au niveau des cloisons alvéolaires au cours de cette pathologie, dont l'hème-oxygenase-2¹⁴⁴ ou la MnSOD intracellulaire¹⁴⁶. La résultante nette de la somme de la sous-expression de certains systèmes anti-oxydants et de la surexpression de certains autres en termes de capacité anti-oxydante pulmonaire totale au cours de la BPCO n'est pas connue.

3.3.2.3.Rôle de l'excès d'espèces réactives de l'oxygène dans l'emphysème

3.3.2.3.1.L'excès d'espèces réactives de l'oxygène contribue au développement de l'emphysème

La relation de cause à effet entre la production en excès de radicaux libres de l'oxygène et la survenue d'un emphysème pulmonaire a été bien démontrée dans des modèles animaux. Le traitement par des chélateurs des oxydants tels que la N-acetyl-cysteine ou la thioredoxine protège les animaux contre l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette¹⁴⁷ ou l'instillation trachéale d'élastase^{148, 149}. De plus, les souris surexprimant la CuZnSOD, une enzyme extracellulaire initiant le processus de détoxification des anions superoxyde en les convertissant en peroxyde d'hydrogène (figure 1), sont protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette, par l'instillation trachéale d'élastase¹⁵⁰ ou par l'instillation trachéale de céramide, un agent pro-apoptotique¹⁵¹.

A l'inverse, les souris chez lesquelles le gène de Nrf2 est inactivé sont extrêmement susceptibles à l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette¹⁵² ou par l'élastase¹⁵³.

3.3.2.3.2.Données contradictoires

Les données disponibles indiquent majoritairement un rôle causal de l'excès d'oxydants dans le poumon vis-à-vis du développement de l'emphysème. Cependant, la production d'oxydants pourrait paradoxalement être nécessaire au maintien de l'architecture alvéolaire. En effet, l'inactivation du gène de la NADPH oxydase, une source majeure d'anion superoxyde, sensibilise les souris à l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette¹⁵⁴. Le mécanisme en cause n'est pas décrit mais pourrait faire intervenir la voie du Transforming Growth Factor- β (TGF- β), qui possède un effet protecteur vis-à-vis du développement de l'emphysème et dont les oxydants font office de second messenger intracellulaire¹⁵⁵.

Le déséquilibre de la balance protéase / antiprotéases, l'existence d'une réaction inflammatoire chronique et un excès d'oxydants dans le poumon contribuent chacun de façon importante à la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire. En aval de ces phénomènes, des altérations de la viabilité des cellules résidentes de l'alvéole semblent contribuer de façon majeure à la constitution des lésions au cours de cette maladie. Un excès d'apoptose ou une sénescence précoce de ces cellules ont été rapportées.

3.4.Modifications de la viabilité des cellules résidentes de l'alvéole

3.4.1.Apoptose

La destruction des cloisons alvéolaires implique non seulement la destruction de leur matrice extracellulaire mais aussi celle des cellules les composant. Cet état de fait a amené certains auteurs à évoquer comme *primum movens* de l'emphysème une apoptose excessive des cellules résidentes de l'alvéole. En accord avec cette hypothèse, des cellules apoptotiques ont été détectées en grand nombre dans le poumon emphysémateux, chez l'homme et dans des modèles animaux, alors que l'induction directe de l'apoptose dans le poumon induit des lésions d'emphysème. En contrepartie, l'excès de cellules apoptotiques dans le poumon emphysémateux pourrait être en rapport non avec un excès d'apoptose des cellules alvéolaires mais avec un défaut de clairance locale de ces cellules ou efférocytose, alors que l'apoptose des cellules de l'alvéole ne semble pas nécessaire au développement de l'emphysème dans certains modèles animaux.

3.4.1.1.Détection de cellules apoptotiques dans le poumon emphysémateux

Plusieurs auteurs ont rapporté la détection en grand nombre de cellules apoptotiques dans le poumon des patients atteints d'emphysème pulmonaire. Les cellules intéressées appartiennent aux trois principales populations de cellules résidentes de l'alvéole, c'est-à-dire aux cellules épithéliales alvéolaires, endothéliales et mésenchymateuses^{77, 156-158}. L'identification des cellules apoptotiques reposait dans ces études sur au moins deux techniques incluant la détection d'une fragmentation de l'ADN nucléaire par Nick-End Labeling, la visualisation de fragments d'ADN par électrophorèse ou la mise en évidence d'une activité caspase-3 dans le broyat tissulaire, la détection de protéines pro-apoptotiques telles que Bcl-2, Bad et Bax par immunohistochimie, enfin la visualisation de modifications caractéristiques de la chromatine en microscopie électronique. L'augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans le poumon emphysémateux par rapport au poumon de sujets indemnes d'emphysème est de l'ordre d'un facteur 4 à 25 et est corrélée à l'élargissement des espaces aériens, suggérant une association entre ces deux phénomènes¹⁵⁷.

La détection de cellules apoptotiques a également été rapportée dans de nombreux modèles animaux d'emphysème pulmonaire. La présence de ces cellules a pu être montrée par au moins deux techniques complémentaires dans les modèles d'emphysème induit par l'inhibition du récepteur de VEGF¹⁵⁹, par l'immunisation contre les cellules endothéliales xénogéniques⁸⁵ et par la surexpression dans le poumon de l'interferon-gamma⁷⁰. D'autres auteurs ont par ailleurs rapporté la présence de cellules apoptotiques dans les modèles d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase¹⁶⁰ ou l'exposition chronique à la fumée de cigarette¹⁶¹, ces résultats ayant été obtenus par la seule technique TUNEL qui n'est pas absolument spécifique de la mort cellulaire par apoptose.

3.4.1.2.Rôle discuté de l'apoptose des cellules alvéolaires

Si la présence dans le poumon de cellules en voie d'apoptose est bien établie au cours de l'emphysème, le rôle de ce phénomène n'est pas bien établi.

3.4.1.2.1. L'apoptose des cellules de l'alvéole pourrait jouer un rôle central au cours de l'emphysème

Les cellules épithéliales, endothéliales et mésenchymateuses représentant une partie importante de la structure alvéolaire, il est intuitivement concevable que leur mort, programmée ou non, puisse aboutir à la destruction de ces structures. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'apoptose extensive des cellules épithéliales alvéolaires induite par l'instillation trachéale de caspase-3 activée, un effecteur puissant de l'apoptose, est suivie de la constitution rapide de lésions d'emphysème chez la souris¹⁶². De façon moins directe, la démonstration que l'apoptose des cellules de l'alvéole pouvait conduire au développement de l'emphysème a été apportée par l'observation chez le rat et la souris que l'inhibition pharmacologique ou génétique du récepteur du Vascular Endothelial Growth Factor, qui induit l'apoptose des cellules endothéliales mais aussi épithéliales du poumon profond, conduit au développement de lésions caractéristiques d'emphysème¹⁵⁹. Par ailleurs, il est notable que l' α -1-antitrypsine, dont le déficit est un facteur de risque majeur de développer un emphysème, possède de puissantes propriétés anti-apoptotiques et protège du développement des lésions pulmonaires dans les modèles animaux d'emphysème induit par l'inhibition pharmacologique du récepteur du VEGF et par l'instillation trachéale de caspase-3 activée, modèles dans lesquels l'apoptose des cellules de l'alvéole est centrale¹⁶³.

¹⁶⁴ .

3.4.1.2.2. Mécanismes de l'apoptose dans le poumon emphysémateux humain : Rôle du Placenta Growth Factor

Le Placenta Growth Factor (facteur de croissance placentaire – PIGF) est un homologue du VEGF qui se lie et active le récepteur Flt-1, un des récepteurs du VEGF, mais non Flk-1, un autre récepteur du VEGF qui est impliqué de façon centrale au cours de l'angiogénèse. L'expression pulmonaire du PIGF, forte au cours du développement, s'éteint progressivement pendant et à la suite de la phase d'alvéologénèse.

In vitro, le PIGF inhibe la prolifération et induit l'apoptose des pneumocytes de type 2. *In vivo*, la surexpression constitutionnelle de ce facteur conduit au développement d'un emphysème pulmonaire au fil du vieillissement des animaux, les lésions étant détectées à partir de l'âge de 6 mois, associé à une diminution de l'expression pulmonaire du VEGF. Chez ces souris comme dans le modèle d'emphysème induit par l'inhibition du récepteur du VEGF, le développement de l'emphysème ne s'accompagne pas d'une réaction inflammatoire pulmonaire significative, indiquant que celle-ci ne soit pas nécessaire au développement des lésions dans ces modèles¹⁶⁵.

Chez l'homme, une élévation des taux de PIGF dans le plasma et le liquide de lavage broncho-alvéolaire est observée parmi les patients atteints de BPCO par rapport à des personnes indemnes de pathologie pulmonaire, sans effet propre de l'intoxication tabagique. Ces taux sont corrélés avec le degré de sévérité du trouble ventilatoire obstructif chez les patients atteints de BPCO¹⁶⁶.

3.4.1.2.3. L'apoptose des cellules de l'alvéole pourrait être un épiphénomène au cours de l'emphysème

L'apoptose n'est pas spécifique de l'emphysème

Cependant, l'apoptose des cellules de l'alvéole n'est pas spécifique de l'emphysème et ne semble pas suffisante à la constitution de celui-ci. En effet, l'apoptose des cellules de l'alvéole est observée au cours de nombreux autres modèles animaux de pathologies inflammatoires chroniques pulmonaires comme celles induites par l'inhalation chronique de dioxyde d'azote¹⁶⁷ ou l'instillation trachéale de bléomycine¹⁶⁸. De plus, dans ce dernier modèle, l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires induite par la liaison Fas/Fas-ligand semble jouer un rôle causal dans le développement de lésions de fibrose et non d'emphysème¹⁶⁹. L'apoptose des cellules de l'alvéole n'est donc pas un événement spécifique de l'emphysème et peut conduire à des lésions pulmonaires très différentes de celui-ci.

Rôle de l'anoïkis

L'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires pourrait être la conséquence et non la cause de la dégradation de la charpente conjonctive des alvéoles. En effet, la dégradation de la matrice extracellulaire sur laquelle les cellules reposent peut par elle-même aboutir à la mort par apoptose de ces cellules. Ce phénomène porte le nom d'anoïkis¹⁷⁰. L'implication éventuelle de la mort cellulaire par anoïkis dans la physiopathologie de l'emphysème n'a pas été étudiée.

Excès d'apoptose ou défaut d'efférocytose ?

Par ailleurs, la détection de cellules apoptotiques dans un tissu donné ne dépend pas uniquement de la survenue de phénomènes d'apoptose mais aussi de la capacité des cellules avoisinantes, et en particulier des macrophages, de phagocyter ces cellules. Ce processus est appelé efférocytose. Or, les macrophages alvéolaires de sujets atteints de

BPCO ont une diminution de l'ordre de 65% de leur capacité à phagocyter des cellules épithéliales apoptotiques par rapport à des macrophages alvéolaires de sujets sains, la différence étant imputable en majeure partie à un effet de la fumée de cigarette¹⁷¹. Les importances relatives d'un excès d'apoptose et d'un éventuel défaut d'efférocytose dans l'accumulation dans le poumon emphysémateux de cellules présentant les caractéristiques de cellules apoptotiques ne sont pas connues.

Les modifications de la viabilité des cellules de l'alvéole dans le poumon emphysémateux ne se résument pas à un éventuel excès d'apoptose. Parallèlement, et jouant peut-être un rôle encore plus important, une sénescence accrue de ces cellules a été décrite au cours de l'emphysème.

3.4.2.Sénescence des cellules résidentes de l'alvéole

La sénescence cellulaire est un phénomène présent chez la grande majorité des organismes multicellulaires. Il est lié au vieillissement, survient après environ 50 mitoses, et est caractérisé par l'évolution des cellules vers un phénotype post-mitotique. Les cellules concernées sont alors dans l'impossibilité d'entrer en mitose du fait du raccourcissement de leurs télomères chromosomiques lui-même en rapport avec une perte de l'activité de la télomérase, une enzyme dont la fonction est de prévenir ce raccourcissement. Les cellules sénescents expriment certains marqueurs caractéristiques tels que la β -galactosidase et des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines telles que p16INK4 et p21CIP1/WAF1¹⁷².

La sénescence cellulaire pourrait jouer un rôle très important au cours de l'emphysème. En effet, la prévalence de l'emphysème pulmonaire augmente avec l'âge, cette relation n'étant pas uniquement dépendante de l'augmentation dans le temps de la quantité de tabac consommée puisque elle reste présente chez les patients non ou peu fumeurs déficitaires en α -1-antitrypsine ainsi que chez les patients ayant cessé de fumer. Par ailleurs, le vieillissement pulmonaire physiologique s'accompagne d'un élargissement des espaces aériens distaux¹⁷³.

L'expression de marqueurs de sénescence a été rapportée dans les cellules du poumon emphysémateux humain, qu'il s'agisse des cellules épithéliales alvéolaires et endothéliales observées *in situ*, qui expriment p16INK4 et p21CIP1/WAF1 et dont les télomères sont raccourcis¹⁷⁴, ou des fibroblastes cultivés *ex vivo* qui expriment la β -galactosidase¹⁷⁵. La sénescence de ces cellules au cours de l'emphysème peut être rapportée au moins partiellement à l'intoxication tabagique puisque la fumée de cigarette induit par elle-même la sénescence cellulaire dans la lignée A549, un modèle de cellules épithéliales alvéolaires¹⁷⁶.

Enfin, la délétion chez les souris du gène de Senescence Marker Protein-30, une protéine dont l'expression diminue avec l'âge, sensibilise celles-ci vis-à-vis de l'emphysème induit par la fumée de cigarette¹⁷⁷. Ces données convergentes pointent vers un rôle probablement important d'une sénescence prématurée des cellules alvéolaires dans la physiopathologie de l'emphysème.

3.5.Emphysème centro-lobulaire : Continuité des lésions entre les territoires bronchiolaire et alvéolaire

Enfin, chez les patients tabagiques, l'emphysème centro-lobulaire est associé de façon constante à des lésions des petites voies aériennes associant un épaississement du tissu conjonctif sous-muqueux à l'accumulation de mucus et de leucocytes dans la lumière. Chez ces patients, la sévérité du trouble ventilatoire obstructif est corrélée à la sévérité de l'inflammation et du remodelage bronchiolaires¹⁷⁸. Cette association est moins nette chez les patients atteints d'emphysème panlobulaire¹⁷⁹.

Il n'a pas été rapporté chez l'homme atteint de BPCO d'association entre la sévérité de l'atteinte bronchiolaire et celle de l'emphysème, mais des arguments expérimentaux suggèrent que la pathologie des petites voies aériennes puisse par elle-même entraîner le développement de lésions d'emphysème. En effet, la surexpression dans les petites voies aériennes, sous la dépendance du promoteur de la protéine sécrétée des cellules de Clara (CCSP), du canal Na⁺ β-Enac qui entraîne la déshydratation de la surface épithéliale bronchiolaire, induit certes une réaction inflammatoire et un remodelage de la paroi des petites voies aériennes proches de ceux observés chez l'homme au cours de la BPCO, mais aussi des lésions d'emphysème pulmonaire¹⁸⁰. Ces données soulèvent l'hypothèse que les lésions d'emphysème centro-lobulaire, pourraient être secondaires à l'atteinte bronchiolaire qui est observée au cours de la BPCO et qui constituerait alors le *primum movens* de cette pathologie. La description chez les patients atteints de BPCO de phénotypes caractérisés plus particulièrement soit par une atteinte bronchitique plus sévère, soit par une prédominance des lésions d'emphysème par rapport aux lésions des voies aériennes, plaide cependant en défaveur de cette hypothèse⁸⁷.

4. Troisième partie : Défaut de régénération alvéolaire au cours de l'emphysème

Les mécanismes concourant à la dégradation des structures alvéolaires au cours de l'emphysème ont fait l'objet de la plupart des études consacrées à la physiopathologie de cette maladie. Cependant, la constitution de lésions d'emphysème, c'est-à-dire la destruction complète des cloisons alvéolaires, témoigne également de la mise en défaut des systèmes de réparation et de régénération alvéolaire qui dans d'autres situations, par exemple en cas de pneumopathie bactérienne, obtiennent la restitution *ad integrum* du parenchyme pulmonaire. En conséquence, les systèmes de réparation et régénération alvéolaire pourraient être des acteurs importants au cours de l'emphysème. D'une part, un défaut d'expression ou des altérations de ces systèmes pourraient rendre compte de la dégradation progressive et de la destruction des cloisons alvéolaires. D'autre part, l'induction d'une réparation ou d'une régénération alvéolaire efficaces représenteraient une avancée thérapeutique majeure pour cette maladie.

L'hypothèse qu'un défaut de réparation ou régénération alvéolaire participe au développement de l'emphysème est soutenue par des données de la littérature indiquant que des systèmes de régénération alvéolaire sont présents et fonctionnels dans le poumon des mammifères adultes, que la fumée de cigarette inhibe ces systèmes en conditions expérimentales et qu'une altération des systèmes impliqués dans la réparation ou régénération alvéolaire a été rapportée au cours de l'emphysème humain. Enfin, il a été démontré chez l'animal que l'alvéologénèse pouvait être induite par des agents pharmacologiques dans des modèles expérimentaux d'emphysème, faisant la preuve du concept d'alvéologénèse thérapeutique dans cette maladie.

4.1. La régénération alvéolaire est possible chez les mammifères adultes

La phase d'alvéologénèse correspond à la dernière étape du développement pulmonaire. Elle fait suite aux stades embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire et sacculaire du développement au cours desquels se forme l'arbre respiratoire conducteur puis parenchymateux. Chez l'homme, l'alvéologénèse débute lors des dernières semaines de la gestation, se réalise massivement lors des premiers mois de vie et prend fin dans l'enfance, entre 2 et 8 ans, le moment précis de son achèvement n'étant pas connu avec précision. Il était classiquement admis que le potentiel d'alvéologénèse était complètement réalisé au

terme du développement pulmonaire, excluant toute possibilité d'alvéologénèse et donc de régénération du tissu pulmonaire à l'âge adulte¹⁸¹.

Or, il a été récemment démontré que le poumon des mammifères adultes pouvait de la même façon que le poumon immature être le siège d'une alvéologénèse. Ces observations ont été faites dans des modèles de déplétion alvéolaire généralisée, obtenue par l'imposition d'un régime hypocalorique, ou locale, obtenue par la résection chirurgicale de parenchyme pulmonaire. L'exploration des mécanismes impliqués dans ces phénomènes a été menée essentiellement chez les rongeurs dans le modèle d'alvéologénèse induite par la résection pulmonaire. D'une grande importance, l'induction de l'alvéologénèse a également pu être observée non seulement chez les rongeurs mais aussi des espèces caractérisées comme l'homme par l'interruption de leur croissance à la fin du développement.

4.1.1. Alvéologénèse à l'âge adulte dans les espèces à croissance continue

4.1.1.1. Alvéologénèse après déplétion alvéolaire diffuse

La régénération des structures alvéolaires a été observée chez la souris adulte dans le modèle de déplétion alvéolaire diffuse causée par l'imposition prolongée d'un régime hypocalorique. Chez l'homme, la dénutrition sévère entraîne par elle-même la perte de cloisons alvéolaires et le développement de lésions proches de celles observées au cours de l'emphysème²¹, mais le caractère réversible ou non de ce phénomène n'est pas connu. Chez la souris, le retour à un régime normocalorique entraîne la régression complète de l'élargissement des espaces alvéolaires induite par la malnutrition et le rétablissement d'un nombre d'alvéoles équivalent aux valeurs initiales, témoignant d'une alvéologénèse¹⁸². De plus, la restauration d'une taille et d'un nombre normaux des espaces alvéolaires est associée à une forte élévation de la synthèse d'ADN dans le poumon, signant l'intensité des phénomènes de réplication cellulaire et suggérant que les processus identifiés correspondent bien à une régénération des cloisons alvéolaires¹⁸³.

4.1.1.2. Alvéologénèse après résection chirurgicale de parenchyme pulmonaire

La survenue de changements structurels adaptatifs et de la génération *de novo* de structures alvéolaires au sein du poumon restant a été bien démontrée chez des animaux ayant subi l'exérèse d'une partie du parenchyme pulmonaire¹⁸⁴. Chez le rat, la résection des lobes supérieur et moyen du poumon droit, correspondant environ 25% du poumon total, suffit à

induire une augmentation franche du volume des lobes restants, alors qu'à l'échelle microscopique la taille et la surface des alvéoles restent proches de ceux des animaux n'ayant pas été opérés, ce qui démontre la formation de nouveaux alvéoles¹⁸⁵. Des observations similaires ont été rapportées dans le même modèle chez la souris¹⁸⁶, chez qui il a montré de plus que l'alvéologénèse post-pneumonectomie s'accompagnait d'une prolifération de toutes les populations cellulaires du poumon profond ; une incorporation de bromo-desoxyuridine, qui indique la synthèse d'ADN caractéristique des cellules en phase S du cycle cellulaire, est observée dans les cellules épithéliales, endothéliales et mésenchymateuses du poumon de ces animaux¹⁸⁷.

Le rétablissement à distance de la résection pulmonaire d'une surface alvéolaire proche de la surface alvéolaire préopératoire, bien démontré chez le rat et la souris adultes, semble s'accompagner d'un bénéfice en termes de fonction ventilatoire et d'échanges gazeux. Ainsi, 21 jours après la pneumonectomie, la fréquence respiratoire, le volume courant, le débit expiratoire de pointe et le débit expiratoire en milieu d'expiration retrouvent les valeurs notées chez les mêmes animaux avant l'opération¹⁸⁷.

Enfin, il apparaît que l'induction de l'alvéologénèse dans le poumon des rongeurs puisse être répétée à plusieurs reprises au cours de la vie. Pour preuve, la réalisation d'une bilobectomie supérieure et moyenne droite 4 semaines après celle d'une pneumonectomie gauche induit dans le parenchyme restant un deuxième cycle de modifications structurales incluant une alvéologénèse¹⁸⁸.

La plupart des résultats obtenus dans le domaine de la régénération du tissu pulmonaire l'ont été chez le rat et la souris. Le choix de ces espèces n'est probablement pas innocent et pourrait être en rapport avec le fait que, chez ces animaux, la croissance somatique semble ne jamais cesser complètement¹⁸⁹, suggérant l'activation ou l'absence de suppression des mécanismes impliqués dans le développement des tissus. Il est donc d'un intérêt majeur pour une éventuelle application de ces résultats à l'homme, dont la croissance s'interrompt définitivement à la fin de l'adolescence avec la fusion des épiphyses osseuses, que des phénomènes de régénération alvéolaire aient aussi été mis en évidence dans des espèces à croissance arrêtée comme le chien.

4.1.2.Alvéologénèse dans les espèces à croissance interrompue

4.1.2.1.Alvéologénèse post-pneumonectomie chez le chien

Chez le chien adulte, la pneumonectomie droite, correspondant à l'ablation de 55% du parenchyme pulmonaire total, induit des remaniements structurels dans le poumon restant caractérisés par une hypertrophie et/ou une hyperplasie des septums interalvéolaires, évoluant vers la formation de nouveaux alvéoles. Ces phénomènes se déroulent sur une période de plusieurs mois et aboutissent à une augmentation de l'ordre de 43% du nombre d'alvéoles dans le poumon gauche¹⁹⁰. Ces résultats démontrent la validité du concept d'alvéologénèse, du moins d'expansion de la surface d'échange alvéolo-capillaire, chez les mammifères supérieurs adultes.

Il faut toutefois signaler que l'intensité de l'alvéologénèse post-pneumonectomie reste dépendante de l'âge chez le chien, et semble bien plus intense chez les jeunes animaux. Chez le chiot, l'alvéologénèse vigoureuse dans le poumon restant induite par la résection du poumon gauche, correspondant à environ 45% du parenchyme pulmonaire total, aboutit à la restauration d'un nombre d'alvéoles proche de celui des animaux non opérés¹⁹¹.

4.1.2.2.Alvéologénèse post-pneumonectomie chez l'homme

L'alvéologénèse secondaire à une résection pulmonaire étendue n'a pas été démontrée directement chez l'homme mais des éléments indirects indiquent son existence, du moins chez les enfants et les adolescents. Ainsi, la fonction ventilatoire appréciée à l'âge adulte par la mesure du VEMS chez des sujets ayant subi une pneumonectomie avant l'âge de 20 ans est supérieure à celle de sujets ayant subi la même intervention après l'âge de 20 ans, indiquant chez les sujets jeunes la probable hyperplasie du poumon restant, c'est-à-dire la formation de nouveaux alvéoles compensant la perte du parenchyme réséqué. Ce développement compensatoire du poumon restant demeure comme chez le chien dépendant de l'âge. Chez les personnes ayant subi une pneumonectomie avant l'âge de 5 ans, le VEMS à l'âge adulte était très proche de celui de la population générale¹⁹².

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'alvéologénèse est possible dans le poumon des mammifères adultes, et que les mécanismes impliqués sont accessibles dans une certaine mesure à la stimulation, soulevant l'hypothèse qu'ils puissent être manipulés dans un but thérapeutique. Les mécanismes de l'alvéologénèse chez les mammifères adultes ont été décrits essentiellement dans le modèle d'alvéologénèse induite par la résection chirurgicale de parenchyme pulmonaire.

4.1.3.Mécanismes de la régénération alvéolaire, rôle des fibroblastes

4.1.3.1.Cellules impliquées

Les cellules résidentes de l'alvéole de tous types participent *de facto* à l'alvéologénèse, que ce soit dans le cadre du développement pulmonaire ou de l'alvéologénèse à l'âge adulte. En effet, la formation de nouvelles cloisons alvéolaires exige la prolifération équilibrée des cellules épithéliales, endothéliales et mésenchymateuses du poumon profond. Une population récemment identifiée de cellules souches bronchiolo-alvéolaires semble également contribuer à l'alvéologénèse. La participation de cellules souches d'origine hématopoïétique, dont il sera tout d'abord question, a aussi été rapportée dans ces phénomènes. Ces cellules ne semblent toutefois pas jouer un rôle majeur au cours de l'alvéologénèse en termes quantitatifs.

4.1.3.1.1.Cellules d'origine extra-pulmonaire : Cellules souches d'origine hématopoïétique

Des cellules d'origine hématopoïétique jouent un rôle important au cours des phénomènes de réparation tissulaire dans de nombreux organes, en particulier dans leur compartiment vasculaire¹⁹³, ainsi qu'au cours de la diffusion métastatique des cancers. Le dénominateur commun de ces processus est la survenue d'une angiogénèse¹⁹⁴. Ces cellules souches d'origine hématopoïétique sont cependant également capables de se différencier en cellules non endothéliales et de participer à la réparation du parenchyme avoisinant comme cela a été démontré dans le cerveau¹⁹⁵, le cœur¹⁹⁶ ou le foie¹⁹⁷.

Pourtant, contrairement à ce qui a pu être observé dans les organes cités plus haut, la mobilisation et l'implantation dans le poumon de cellules d'origine hématopoïétique ne semblent pas jouer un rôle important au cours de l'alvéologénèse chez les mammifères adultes. En effet, chez les souris ayant subi une transplantation de moelle osseuse à partir d'animaux exprimant soit la *Green fluorescent Protein* de façon ubiquitaire, soit la luciférase sous la dépendance du promoteur du gène Flk-1 et donc de façon spécifique dans les cellules endothéliales, l'alvéologénèse induite par la pneumonectomie ne s'accompagne pas de la détection de cellules fluorescentes dans le poumon restant, en dehors de quelques rares cellules endothéliales¹⁹⁸. Ainsi, chez la souris, l'alvéologénèse induite à l'âge adulte par la résection de parenchyme pulmonaire semble être essentiellement sous la dépendance de cellules d'origine locale, alvéolaire ou bronchiolaire.

4.1.3.1.2. Cellules d'origine locale

Cellules épithéliales et endothéliales

La prolifération équilibrée de tous les types cellulaires de l'alvéole est observable très précocement dans le poumon restant après pneumonectomie chez le rat¹⁹⁹. Le rôle joué spécifiquement par chaque type cellulaire n'est pas connu mais il est notable que chacun d'entre eux semble avoir le potentiel de conduire le processus d'alvéologénèse. En effet, l'administration de facteurs de croissance ciblant spécifiquement les cellules épithéliales ou endothéliales du poumon entraîne une intensification et une accélération de l'alvéologénèse induite par la résection pulmonaire (voir plus bas). Ces résultats suggèrent que l'induction de la prolifération d'une population cellulaire particulière de l'alvéole soit accompagnée par l'expansion simultanée des types cellulaires avoisinants, probablement via des mécanismes paracrines. Par exemple, les pneumocytes de type 2 sécrètent selon un mode paracrine le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), qui est un puissant mitogène pour les cellules endothéliales²⁰⁰.

Cellules souches locales

Pneumocytes de type 2

Plusieurs populations de cellules souches jouant potentiellement un rôle de premier plan au cours de l'alvéologénèse ont été identifiées dans le poumon, au premier rang desquelles les pneumocytes de type 2. Les pneumocytes de type 2 sont quantitativement majoritairement responsables de la réparation épithéliale alvéolaire comme elle a été décrite initialement dans le poumon des souris ayant subi une instillation trachéale de bléomycine. Dans ce modèle, la mort des pneumocytes de type 1 conduit à la dénudation de la membrane basale alvéolaire. Les pneumocytes de type 2 prolifèrent alors, migrent sur la membrane jusqu'à la recouvrir entièrement, réalisant un aspect d'hyperplasie des pneumocytes de type 2, puis se différencient en pneumocytes de type 1 ou meurent par apoptose, ce qui aboutit à la restitution d'un épithélium alvéolaire normal^{201, 202}. Les pneumocytes de type 2, ou peut-être une sous-population d'entre eux, semblent donc principalement responsables de la régénération de l'épithélium alvéolaire en situation d'agression aigue.

Sous-populations de cellules de Clara, cellules souches bronchiolo-alvéolaires

D'autres populations de cellules souches ont été décrites dans le poumon distal. Dans les voies aériennes terminales et en particulier au niveau de la jonction bronchio-alvéolaire, une sous-population des cellules de Clara caractérisée par sa résistance au naphtalène, un hydrocarbure aromatique, semble jouer un rôle central au cours de la réparation épithéliale bronchiolaire faisant suite à la destruction épithéliale induite par ce solvant²⁰³. Ces cellules se rapprochent d'une deuxième sous-population de cellules exprimant elles aussi la protéine des cellules de Clara (Clara Cell Secretory Protein – CCSP) et possédant par ailleurs une capacité d'efflux du colorant Hoescht 33342, une caractéristique qu'elles partagent avec les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules n'expriment pour autant pas le marqueur de surface CD45 ce qui affirme leur origine extra-hématopoïétique²⁰⁴.

Par ailleurs, une fraction des cellules exprimant CCSP, localisée à la jonction bronchiolo-alvéolaire, possède la propriété d'exprimer également l'apoprotéine C du surfactant (SpC), un marqueur des pneumocytes de type 2. Elles n'expriment pas le marqueur Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), un marqueur des cellules neuroendocrines exprimé par certaines cellules souches de l'épithélium bronchique. Ces cellules, nommées par les auteurs « cellules souches bronchiolo-alvéolaires » (Bronchiolar Alveolar Stem Cells -BASC), se multiplient aussi bien dans les suites d'une agression ciblant les petites voies aériennes, l'injection parentérale de naphtalène qui détruit l'épithélium bronchiolaire, que dans les suites d'une agression ciblant l'épithélium alvéolaire, l'instillation intranasale de bléomycine. *In vitro*, ces cellules possèdent la capacité de se différencier aussi bien en cellules de Clara qu'en pneumocytes de type 2²⁰⁵.

Les cellules souches bronchiolo-alvéolaires co-exprimant CCSP et SpC ont probablement un rôle important au cours de l'alvéologénèse. Chez la souris, la réalisation d'une pneumonectomie est suivie dans le poumon restant par une augmentation du nombre de ces cellules présente dès le troisième jour et atteignant 220% deux semaines après la chirurgie, en rapport avec une prolifération intense de celles-ci, ce qui suggère que ces cellules contribuent de façon majeure à la genèse de l'épithélium recouvrant les cloisons alvéolaires nouvellement formées²⁰⁶.

Fibroblastes alvéolaires

Tous les types cellulaires de l'alvéole participent aux processus d'alvéologénèse et semblent avoir le potentiel de les accélérer. Cependant, de nombreux éléments indiquent que les fibroblastes alvéolaires jouent un rôle central au cours de ces phénomènes. Les fibroblastes

pulmonaires sont les principaux contributeurs à la synthèse et à l'entretien de la matrice extracellulaire et participent aux interactions intercellulaires indispensables au développement équilibré des différentes populations cellulaires.

Les fibroblastes alvéolaires produisent la matrice extracellulaire du poumon

Les fibroblastes pulmonaires sont le principal type cellulaire responsable de la synthèse et de la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire de l'alvéole, incluant les protéoglycanes, le collagène, notamment de type I et IV, et l'élastine. L'élastine est en particulier un composant essentiel de la matrice extracellulaire du poumon puisqu'elle apporte à celle-ci l'élasticité indispensable à la réalisation du cycle ventilatoire, et il est probable que la synthèse d'élastine soit une étape essentielle de l'alvéologénèse. En accord avec cette hypothèse, Koh et collaborateurs ont montré que l'expression de l'ARN messager de la tropoélastine, le précurseur soluble de l'élastine, augmentait fortement au niveau des extrémités et des jonctions des cloisons alvéolaires dans le poumon restant de rats ayant subi une pneumonectomie, indiquant que la synthèse d'élastine fait partie intégrante du processus d'alvéologénèse. De la même manière, une réactivation de l'expression du collagène I est observée dans le poumon restant des rats pneumonectomisés²⁰⁷. Dans ces expériences, la localisation de l'expression de l'ARNm de l'élastine est proche de celle observée au cours du développement, qui dans ce dernier cas est située préférentiellement au niveau des extrémités des cloisons alvéolaires.

Les fibroblastes alvéolaires participent aux interactions intercellulaires dans le poumon

Par ailleurs, et notamment du fait de leur localisation dans les cloisons alvéolaires, entre l'épithélium alvéolaire et l'endothélium capillaire, les fibroblastes pulmonaires participent aux complexes interactions intercellulaires qui aboutissent à la croissance et à la multiplication des alvéoles. L'interaction des fibroblastes alvéolaires avec l'épithélium est nécessaire aux premières étapes du développement pulmonaire²⁰⁸ et à la différenciation des cellules épithéliales du poumon immature en pneumocytes de type 2²⁰⁹. Chez le rat à la phase d'alvéologénèse du développement pulmonaire, la présence des fibroblastes alvéolaires est nécessaire au maintien du phénotype des pneumocytes de type 2, cet effet étant dépendant à 50% de l'effet du KGF sécrété par les fibroblastes, mais non au maintien du phénotype de l'épithélium bronchiolaire²¹⁰.

L'interaction des fibroblastes pulmonaires avec les cellules épithéliales et endothéliales du poumon se réalise pour partie par l'intermédiaire de facteurs solubles agissant essentiellement de manière paracrine. Ainsi, dans le poumon, les fibroblastes sont la principale sinon la seule source de Keratinocyte Growth Factor (KGF ou Fibroblast Growth Factor-7) et contribuent de façon majeure à l'élévation du contenu pulmonaire en Hepatocyte Growth Factor (HGF) en réponse à une agression alvéolaire^{211, 212}. De plus, une sous-population de fibroblastes pulmonaire est durant la phase d'alvéologénèse du développement la principale source pulmonaire d'acide tout-trans rétinoïque (ATRA). Chez le rat, l'ATRA est un stimulus majeur de l'alvéologénèse à cette phase du développement ainsi que chez l'adulte en réponse à une résection pulmonaire²¹³.

En plus de la sécrétion de facteurs solubles, les interactions intercellulaires conduites par les fibroblastes pulmonaires se réalisent par l'intermédiaire de contacts directs entre ces cellules. En effet, des expansions du cytoplasme des fibroblastes pulmonaires traversent les membranes basales épithéliales et endothéliales et viennent au contact du cytoplasme des cellules épithéliales alvéolaires et endothéliales reposant sur le versant luminal de ces membranes, réalisant directement un réseau entre ces différents types cellulaires. Les fonctions précises de ces contacts cytoplasmiques ne sont pas connues mais correspondent probablement à une forme de communication intercellulaire²¹⁴.

Il est probable que la bonne réalisation de l'alvéologénèse requière la présence d'une population de fibroblastes alvéolaires viables et métaboliquement actifs. Les fibroblastes pulmonaires jouent un rôle central dans l'alvéologénèse au cours du développement et probablement au cours de la régénération alvéolaire, fournissant la matrice extracellulaire secondairement colonisée par les autres types cellulaires et produisant des facteurs solubles stimulant l'alvéologénèse.

4.1.3.2. Stimulus et inhibiteurs de l'alvéologénèse dans le poumon adulte

Les signaux à l'origine de l'alvéologénèse dans le poumon adulte sont multiples. Les contraintes mécaniques s'exerçant sur le poumon, des facteurs solubles dont des facteurs de croissance et des hormones, enfin l'activation dans les populations cellulaires concernées de facteurs de transcription spécifiques participent au contrôle de ce processus.

4.1.3.2.1. Facteurs mécaniques

Les interactions mécaniques établies par l'intermédiaire de la cavité pleurale entre la paroi thoracique d'une part et le tissu pulmonaire d'autre part sont nécessaires au développement

pulmonaire comme cela est indiqué à l'inverse par le fait que l'atrésie diaphragmatique induit une hypoplasie pulmonaire²¹⁵. Ces interactions interviennent également au cours de l'alvéologénèse chez l'animal adulte puisque l'utilisation d'une prothèse gonflable placée dans la cavité pleurale laissée vide par la pneumonectomie, qui prévient le déplacement du médiastin en effectuant une contre-pression sur celui-ci, inhibe partiellement la formation de nouveaux alvéoles dans le poumon controlatéral²¹⁶.

4.1.3.2.2.Facteurs solubles

De nombreux facteurs solubles participent à l'alvéologénèse post-pneumonectomie dans le poumon adulte. Certains, principalement des facteurs de croissance, agissent sur un mode paracrine. D'autres sont sécrétés à distance.

Facteurs de croissance

Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Le HGF est un hétérodimère de deux chaînes protéiques α et β produit sous la forme d'une chaîne unique, le proHGF, qui est activé par clivage protéolytique. Son récepteur de haute affinité c-met est exprimé à la membrane plasmique de nombreux types cellulaires dont dans le poumon les cellules épithéliales, mais aussi par les cellules endothéliales et mésenchymateuses. Le HGF est produit dans le poumon par les cellules mésenchymateuses mais aussi par les cellules épithéliales bronchiques et les polynucléaires neutrophiles. Dans le poumon, le HGF semble agir essentiellement comme un facteur paracrine sécrété par les fibroblastes alvéolaires à destination des cellules épithéliales et endothéliales avoisinantes²¹⁷.

Le HGF possède une activité mitogénique très intense vis-à-vis des cellules exprimant son récepteur et avait initialement été identifié comme étant le principal facteur mitogénique pour les hépatocytes au cours de la régénération hépatique induite par l'hépatectomie²¹⁸. Il est également un facteur angiogénique puissant²¹⁹.

Le HGF stimule la prolifération des cellules de l'alvéole au cours de l'alvéologénèse induite dans le poumon droit par la pneumonectomie gauche chez la souris. Son expression pulmonaire ainsi que celle de c-met s'élèvent dès le premier jour après l'exérèse, tandis que l'administration d'un anticorps neutralisant le HGF inhibe partiellement la prolifération des cellules alvéolaires et que l'administration de HGF exogène potentialise cette dernière²²⁰.

Keratinocyte Growth Factor (KGF)

Le KGF (ou Fibroblast Growth Factor-7) est un membre de la famille des facteurs de croissance fibroblastiques. Il est produit de façon quasi-exclusive par les cellules mésenchymateuses. Il a pour cible essentiellement les cellules épithéliales, mais peut aussi exercer ses effets sur les cellules mésothéliales et endothéliales. Son récepteur est FGFR2-IIIb. Il exerce des effets mitogènes, motogènes et pro-différenciateurs selon un mode d'action paracrine. Il est également capable d'induire l'angiogénèse dans une certaine mesure²²¹. Il est structurellement et fonctionnellement proche du FGF-10 avec lequel il partage son récepteur.

Le KGF participe aux premières phases du développement pulmonaire. L'activation du récepteur du KGF est nécessaire au développement pulmonaire fœtal, les souris dont le gène de FGFR2 a été inactivé n'étant pas viables du fait d'une agénésie pulmonaire complète²²². Par ailleurs, le bon déroulement du développement pulmonaire nécessite un étroit contrôle de l'activité du KGF, un excès de celui-ci étant délétère. Ainsi, les fœtus surexprimant à partir du 10^e jour après la conception le KGF sous la dépendance du promoteur de SpC, c'est-à-dire dans l'épithélium alvéolaire, ou sous celle du promoteur de CCSP, c'est-à-dire au niveau bronchiolaire, présentent 10 jours plus tard des malformations pulmonaires associant une hyperplasie épithéliale et la formation de dilatations kystiques des saccules, obérant leur viabilité. Après la naissance, la surexpression du KGF sous la dépendance du promoteur de CCSP s'accompagne d'une hyperplasie épithéliale majeure, d'une augmentation de la masse du poumon et *in fine* d'une insuffisance respiratoire létale en environ trois semaines²²³.

En plus de sa participation au développement pulmonaire initial, le KGF possède la propriété de stimuler l'alvéologénèse dans le poumon adulte puisque l'administration de KGF exogène dans les suites d'une pneumonectomie augmente le volume, la masse et la densité d'alvéoles dans le poumon restant²²⁴.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF possède 6 isoformes activant trois récepteurs différents nommés VEGFR-1 (ou Flt-1), VEGFR-2 (ou Flk-1) et VEGFR-3 (ou Flt-4). Il induit une augmentation majeure de la perméabilité capillaire et est le principal stimulus de la phase initiale de l'angiogénèse. Il est exprimé dans le poumon essentiellement par les cellules épithéliales. Il a pour cibles principales les cellules endothéliales mais son récepteur est également exprimé par l'épithélium^{225,226}. Le VEGF est fortement exprimé dans le poumon en développement ainsi que dans le poumon adulte²²⁵. L'activation de son récepteur est nécessaire au bon déroulement de l'alvéologénèse au cours du développement²²⁷. Par ailleurs, une surexpression du VEGF participe à la régénération hépatique induite par une hépatectomie partielle²²⁸.

Ces éléments suggèrent que le rôle du VEGF au cours de l'alvéologénèse chez l'adulte pourrait être considérable mais celui-ci reste cependant imprécis. En effet, alors que l'administration de VEGF exogène augmente la masse du poumon restant à distance d'une pneumonectomie chez la souris, l'administration d'anticorps neutralisant les VEGF-R1 et VEGF-R2 ne la réduit pas²²⁹, ce qui indique que l'activation de ces récepteurs n'est pas nécessaire à la réalisation de l'alvéologénèse.

Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

L'IGF-1 est une hormone polypeptidique dont la structure est proche de celle de l'insuline. Il est produit dans le foie, agissant alors selon un mode endocrine, ainsi que directement dans les tissus cibles, agissant alors selon un mode paracrine. L'IGF-1 active un récepteur spécifique (IGF1-R) ainsi que le récepteur de l'insuline. L'IGF-1 possède de nombreuses fonctions biologiques dont des propriétés mitogènes, motogènes, anti-apoptotiques et pro-différenciatrices²³⁰. Dans le poumon, l'IGF-1 est exprimé essentiellement par l'épithélium respiratoire et les macrophages alvéolaires²³¹.

L'IGF-1 est le premier facteur de croissance dont le rôle ait été mis en évidence au cours de l'alvéologénèse chez l'adulte. Chez le rat, une augmentation des taux d'IGF-1 est observée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire au cours de l'alvéologénèse induite dans le poumon controlatéral par la pneumonectomie. Surtout, celle-ci est partiellement inhibée par l'administration aux animaux d'anticorps neutralisant l'IGF-1²³². Cette augmentation de l'expression de l'IGF-1 semble limitée au poumon, d'autres auteurs n'ayant pas observé d'élévation des taux sériques de ce facteur dans le même modèle, et pourrait être liée à des mécanismes post-traductionnels, le contenu pulmonaire en ARNm de l'IGF-1 n'étant pas différent de celui observé chez les animaux témoins²³³.

Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

La famille du PDGF inclut plusieurs isoformes A, B, C, D et AB. Deux récepteurs du PDGF, PDGFR- α et PDGFR- β ont été décrits. Dans le poumon en développement, le PDGF-A produit par les cellules épithéliales alvéolaires et ciblant le PDGFR α , exprimé par les cellules mésenchymateuses sous-jacentes, est nécessaire à la formation des cloisons interalvéolaires et donc à l'alvéologénèse²³⁴. La régulation de l'expression du PDGF et de l'activation de ses récepteurs est cependant indispensable au maintien de l'architecture et de la fonction des tissus. Notamment, l'activation excessive des PDGFR a été impliquée au cours de pathologies fibrosantes comme la sclérodermie²³⁵. Le rôle du PDGF au cours de l'alvéologénèse à l'âge adulte n'est pas connu. L'expression pulmonaire de ce facteur ne semble pas modifiée dans le modèle d'alvéologénèse induite par la pneumonectomie²³⁶.

Ligands des récepteurs nucléaires

Hormones corticotropes

L'implication des hormones corticotropes dans le déroulement de l'alvéologénèse a été mise en évidence au cours du développement, l'administration de dexaméthasone par voie parentérale après la naissance inhibant l'alvéologénèse chez le lapin²³⁷, et chez le rat adulte dans le modèle d'alvéologénèse induite par la pneumonectomie. Dans ce modèle, la réalisation d'une surrénalectomie bilatérale préalable à la pneumonectomie potentialise l'alvéologénèse compensatoire²³⁸. Cet effet est inhibé par l'administration concomitante d'hydrocortisone ce qui démontre l'implication des hormones corticostéroïdes dans le contrôle de l'alvéologénèse²³⁹.

Oestrogènes

Chez les rats femelles, les hormones oestrogéniques sont responsables d'une alvéologénèse intensifiée par rapport aux rats mâles, aboutissant à une plus grande densité des alvéoles dans le poumon par rapport à ceux-ci²⁴⁰. Ces effets sont en rapport avec la présence du récepteur Estrogen Receptor- β (ER- β) dans le poumon et sont associés à une modulation positive par celui-ci de l'expression pulmonaire du PDGF-A²⁴¹.

Acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est le métabolite actif du rétinol ou vitamine A qui est apporté par l'alimentation. Il est présent dans l'organisme sous les formes tout-trans (ATRA) et 9-cis (9-cisRA). La signalisation intracellulaire par les rétinoïdes est une combinaison d'évènements complexes faisant intervenir en premier lieu les récepteurs Retinoic Acid Receptor (RAR) et Retinoid X Receptor (RXR) dont il existe pour chacun trois isoformes α, β, γ . Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et agissent comme des facteurs de transcription en se liant à des éléments de réponse spécifiques sur l'ADN chromosomique, les Retinoic Acid Responsive elements (RARE) et Retinoid X Responsive elements (RXRE). Les RAR et RXR régulent positivement ou négativement l'expression de nombreux gènes. L'ATRA lie uniquement les RAR, le 9-cisRA se liant aussi bien aux RAR qu'aux RXR^{242, 243}. La liaison de l'ATRA aux RAR est grandement facilitée par une protéine cytoplasmique de 15 kDa nommée Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2²⁴⁴. Par ailleurs, les acides rétinoïques peuvent exercer des effets non transcriptionnels via leur fixation à d'autres protéines cytoplasmiques pouvant se comporter en récepteurs, comme le complexe AP-1, le récepteur de l'IGF²⁴⁵ ou l'adénine translocase mitochondriale²⁴⁶.

L'ATRA joue un rôle crucial au cours du développement de l'ensemble de l'organisme et est un stimulus majeur de la l'alvéologénèse survenant à la phase finale du développement pulmonaire. Il est produit localement lors de cette phase par une sous-population de fibroblastes alvéolaires caractérisés par la présence dans leur cytoplasme de gouttelettes lipidiques²¹³. *In vitro*, l'ATRA induit l'expression de l'ARNm de l'élastine, le principal composant de la matrice extracellulaire du poumon, par les fibroblastes pulmonaires obtenus à partir de rats nouveaux-nés, c'est-à-dire au cours de la phase d'alvéologénèse du développement pulmonaire²⁴⁷. L'effet de l'acide rétinoïque au cours de l'alvéologénèse n'est cependant pas univoque mais semble dépendant du type de récepteur exprimé dans le poumon. Ainsi, alors qu'un défaut d'alvéologénèse est observé chez les souris déficientes en RAR α ²⁴⁸ et RAR γ ²⁴⁹, un phénomène inverse est observé chez les souris déficientes en RAR β ²⁵⁰, indiquant des rôles antagonistes de ces deux récepteurs.

En plus de ses effets au cours du développement, l'ATRA module l'alvéologénèse faisant suite à la pneumonectomie chez l'animal adulte. Chez le rat, l'administration d'ATRA exogène induit une augmentation de la masse et du volume du poumon restant ainsi qu'une augmentation de l'index mitotique dans celui-ci²⁵¹. Cependant, le caractère fonctionnel ou non du parenchyme pulmonaire produit sous l'influence de l'ATRA dans ce modèle reste débattu. En effet, chez le chien ayant subi une pneumonectomie droite, l'administration d'ATRA ne s'accompagne pas d'une augmentation significative de la surface alvéolaire d'échange par rapport aux chiens pneumonectomisés n'ayant pas reçu d'ATRA, mais induit

une prolifération particulièrement intense des cellules endothéliales aboutissant à la fréquente présence d'un réseau capillaire double au niveau des cloisons alvéolaires²⁵². Ces modifications histologiques se traduisent en termes fonctionnels par une diminution de la capacité d'échange du monoxyde carbone à bas volume pulmonaire par rapport aux animaux n'ayant pas reçu d'ATRA²⁵³. Cependant, ces modifications du réseau microvasculaire du poumon, si elles sont responsables d'une altération à court terme de la fonction d'échange alvéolo-capillaire, pourraient représenter l'ébauche d'un processus d'alvéologénèse. En effet, chez le jeune rat approchant le terme de la phase d'alvéologénèse, la croissance de nouvelles cloisons alvéolaires à partir d'un réseau microvasculaire mature, c'est à dire simple, débute par le dédoublement de celui-ci²⁵⁴.

Rôle de la NO synthase endothéliale

Le rôle joué par le monoxyde d'azote (NO) produit par la NO synthase endothéliale (eNOS) au cours de l'angiogénèse a conduit à suspecter un rôle de cette enzyme dans l'alvéologénèse. L'expression protéique de eNOS s'élève d'un facteur 2 dans le poumon restant après pneumonectomie, et les souris dont le gène de eNOS a été inactivé sont caractérisées dans ce modèle par une absence de prolifération cellulaire, un défaut de croissance compensatoire du poumon et une surface alvéolaire inférieure à celle des souris sauvages²⁵⁵. Ces résultats indiquent que eNOS est nécessaire à l'alvéologénèse observée à l'âge adulte chez la souris pneumonectomisée.

4.1.3.2.3.Facteurs de transcription, rôle de HIF-1 α

Certains facteurs de transcription semblent orchestrer les événements cellulaires qui sont à l'origine de l'alvéologénèse dans le poumon adulte. En particulier, l'implication de Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) a été décrite au cours de ces phénomènes, alors que l'expression pulmonaire d'autres facteurs de transcription, à savoir Early Growth Response-1 (EGR-1), Nurr77 et la tristetraproline augmente dans les suites immédiates de la pneumonectomie²⁵⁶. Le rôle joué par ces derniers facteurs au cours de l'alvéologénèse n'est pas connu. Une surexpression dans le foie de EGR-1 et Nurr77 a été rapportée au cours de la régénération hépatique induite par l'hépatectomie partielle, ce qui suggère que ces facteurs participent aux processus de régénération tissulaire^{257, 258}.

HIF-1 est un facteur de transcription dont l'activation est induite principalement par l'hypoxie. Elle entraîne l'expression de nombreux gènes qui sont impliqués en particulier dans l'angiogénèse, dont celui du VEGF²⁵⁹. En l'absence d'hypoxie, une forte expression de HIF-1 α est observée dans le poumon de chiots âgés de deux mois, c'est-à-dire à la phase

d'alvéologénèse post-natale du développement pulmonaire, ainsi que dans les suites d'une pneumonectomie effectuée chez le chien adulte²⁶⁰. Dans ce modèle, l'augmentation de l'expression pulmonaire HIF-1 α semble sous la dépendance de facteurs mécaniques puisqu'elle est réprimée par l'inflation d'une prothèse gonflable dans la cavité pleurale²⁶¹. Il est par ailleurs notable que l'exposition à l'hypoxie accélère la phase d'alvéologénèse du développement chez le chien²⁶² et le cobaye²⁶³, suggérant un rôle de HIF-1 α dans son déroulement.

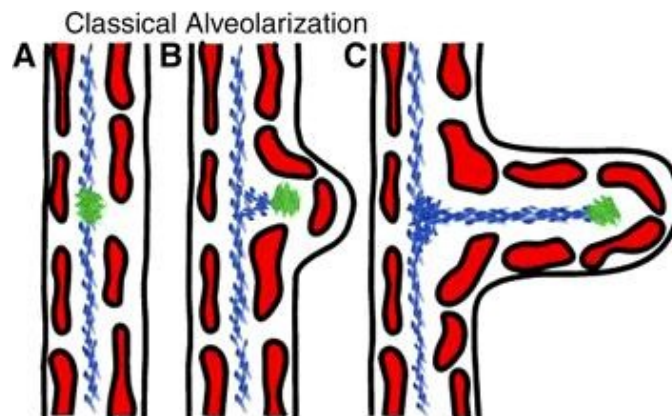
4.1.3.3.Mécanismes structuraux de l'alvéologénèse dans le poumon mature : Hypothèses

Les mécanismes structuraux de l'alvéologénèse dans le poumon adulte n'ont pas été décrits directement mais des données obtenues à la toute fin du développement pulmonaire permettent probablement de les approcher. Le point essentiel est le fait que l'alvéologénèse reste possible y compris après la maturation de la microcirculation pulmonaire, caractérisée par le passage d'un réseau capillaire double à un réseau capillaire simple au niveau des cloisons alvéolaires.

4.1.3.3.1.Alvéologénèse avant la maturation microvasculaire du poumon

Le poumon distal au stade sacculaire du développement, c'est-à-dire préalablement à l'alvéologénèse développementale, est vascularisé par un réseau capillaire double, chaque feuillet de capillaires étant localisé sur un versant des cloisons sacculaires. Le poumon est à ce stade encore pauvre en fibres élastiques. L'événement initial de l'alvéologénèse est alors le repli d'un des feuillets capillaires sur lui-même, donnant naissance à un nouveau réseau capillaire double à l'intérieure de la cloison alvéolaire au sein de laquelle des fibroblastes nombreux déposent une matrice extracellulaire riche en fibres élastiques (figure 2). Par la suite, s'effectue une maturation de la structure microvasculaire, qui consiste en la fusion des deux réseaux distincts et aboutit à la formation du réseau capillaire simple qui est présent dans le poumon adulte²⁶⁴.

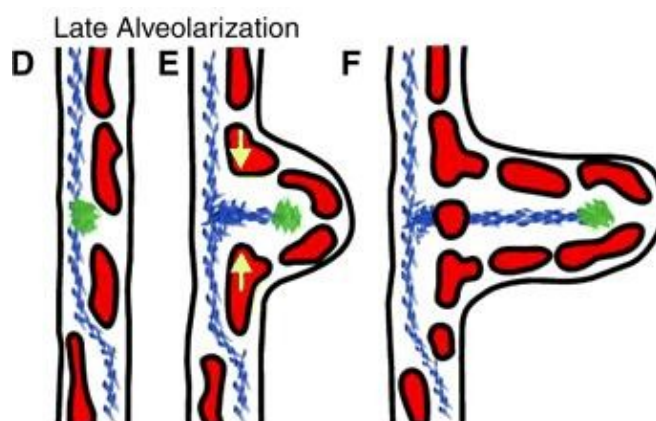
Figure 2 : Alvéologénèse avant la maturation microvasculaire du poumon. Figure tirée de²⁵⁴.



4.1.3.3.2. Alvéologénèse faisant suite à la maturation microvasculaire du poumon

Il a été récemment démontré que l'alvéologénèse pouvait survenir après la maturation microvasculaire du poumon, c'est-à-dire dans un poumon dont la structure est celle du poumon adulte. Ce point a été démontré chez le rat jusqu'à l'âge de 60 jours, ce qui correspond au début de l'âge adulte dans cette espèce. Dans ce contexte, la formation de nouvelles cloisons alvéolaires s'accompagne d'une duplication locale du réseau capillaire au niveau de leur base, reproduisant à ce niveau l'architecture du poumon immature²⁵⁴ (figure 3).

Figure 3 : alvéologénèse survenant après la maturation microvasculaire du poumon. Figure tirée de²⁵⁴



4.2.La fumée de cigarette réprime des fonctions fibroblastiques impliquées dans la régénération alvéolaire

Les mécanismes par lesquels la fumée de cigarette aboutit à une dégradation des structures alvéolaires chez les fumeurs sensibles au tabac ont été explorés de façon exhaustive. Cependant, les effets de la fumée de cigarette ne semblent pas limités à sa participation à l'agression chronique du poumon. En effet, la fumée de cigarette exerce à l'égard des fibroblastes pulmonaires des effets aboutissant à la perte de certaines de leurs fonctions intervenant dans l'alvéologénèse.

4.2.1.La fumée de cigarette est cytotoxique envers les fibroblastes pulmonaires et induit leur sénescence précoce

L'extrait de fumée de cigarette est cytotoxique vis-à-vis des fibroblastes pulmonaires *in vitro*²⁶⁵. Cet effet a été associé à l'induction de l'apoptose de ces cellules par la fumée^{266, 267}. En plus de son effet cytotoxique, la fumée de cigarette inhibe la prolifération et la capacité à migrer des fibroblastes pulmonaires^{268, 269}. De plus, les fibroblastes pulmonaires exposés de façon prolongée à la fumée de cigarette développent un phénotype sénescant caractérisé par une morphologie aplatie et élargie et un arrêt du cycle cellulaire²⁷⁰. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la fumée de cigarette induit probablement une réduction dans le poumon du nombre de fibroblastes alvéolaires métaboliquement actifs possédant le potentiel de proliférer, caractéristiques essentielles pour l'alvéologénèse.

4.2.2.Altérations fonctionnelles des fibroblastes pulmonaires induites par la fumée de cigarette

La fumée de cigarette inhibe plusieurs fonctions des fibroblastes associées à la croissance et à la multiplication alvéolaires. En particulier, la synthèse par ces cellules et la polymérisation de l'élastine sont particulièrement sensibles à l'exposition à la fumée. Ainsi, l'exposition à l'extrait de fumée de cigarette diminue l'expression de l'ARNm de la tropoélastine, le précurseur soluble de l'élastine, par les fibroblastes pulmonaires fœtaux de rat²⁷¹. Par ailleurs, en conditions acellulaires, la fumée de cigarette inhibe la polymérisation de l'élastine sous forme de fibres fonctionnelles²⁷². Enfin, l'exposition à la fumée de cigarette diminue l'expression par les fibroblastes pulmonaires fœtaux de rat de la lysyl oxydase, une enzyme indispensable à la polymérisation de la tropoélastine et à l'arrangement de sa structure quaternaire²⁷¹.

4.2.3.L'exposition à la fumée de cigarette inhibe-t-elle l'alvéologénèse *in vivo* ?

Chez le singe rhésus, l'exposition à la fumée de cigarette durant la période périnatale, c'est-à-dire à la phase d'alvéologénèse du développement pulmonaire, entraîne une augmentation de l'apoptose des cellules du parenchyme pulmonaire, sans cependant qu'une altération de la structure du poumon ait été décrite²⁷³. La démonstration directe que la fumée de cigarette inhibe l'alvéologénèse dans le poumon adulte n'a pas été apportée, en particulier dans le modèle d'alvéologénèse post-pneumonectomie.

Cependant, des données obtenues dans un modèle de déplétion alvéolaire diffuse, l'emphysème pulmonaire induit par l'instillation d'élastase, indiquent que la fumée de cigarette pourrait effectivement induire un défaut d'expression, de synthèse et de polymérisation de l'élastine ainsi qu'un défaut de croissance, de multiplication ou de réparation des alvéoles. Ainsi, alors que l'instillation trachéale d'élastase induit une forte augmentation de l'expression de l'ARNm de l'élastine dans le poumon, cette réponse est inhibée à 40% dans le poumon des hamsters exposés pendant une semaine à la fumée de cigarette²⁷⁴. Cette réduction de la synthèse d'élastine est associée à une diminution d'un facteur 7 de l'activité de la lysyl oxydase dans le poumon de ces animaux. Ces phénomènes pourraient avoir une grande importance physiopathologique puisque les lésions d'emphysème pulmonaire sont aggravées chez les hamsters exposés à la fumée de cigarette après une instillation d'élastase²⁷⁵, ce d'autant plus que les souris exprimant l'élastine à un faible niveau présentent une susceptibilité particulière à l'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette²⁷⁶.

4.3.Phénotype anormal des fibroblastes dans le poumon emphysémateux humain

Dans l'hypothèse qu'un défaut des systèmes de régénération alvéolaire jouerait un rôle au cours de l'emphysème, une altération de la viabilité et des fonctions des fibroblastes pulmonaires au cours de l'emphysème pourrait contribuer à expliquer l'absence de régénération alvéolaire au cours de cette maladie. Effectivement, des données concordantes indiquent que le phénotype des fibroblastes alvéolaires est profondément altéré dans le poumon emphysémateux.

4.3.1. Données *in vivo*

Les données concernant le phénotype des fibroblastes *in situ* dans le poumon emphysémateux sont limitées aux observations de Sirianni et collaborateurs²⁷⁷. Ces auteurs ont montré que les contacts directs établis via des extensions cytoplasmiques par les fibroblastes alvéolaires avec les cellules épithéliales et endothéliales avoisinantes étaient grandement réduits dans le poumon emphysémateux. Ces résultats suggèrent que les fibroblastes du poumon emphysémateux pourraient avoir perdu pour partie leur capacité à participer aux interactions intercellulaires qui jouent un rôle essentiel au cours du développement pulmonaire foetal et probablement durant la réparation pulmonaire^{278 279 280}.

4.3.2. Données *in vitro*

Le phénotype anormal des fibroblastes pulmonaires au cours de l'emphysème a été décrit de façon plus extensive *in vitro* dans des études utilisant des cultures primaires de fibroblastes obtenus par la technique de culture d'explants.

4.3.2.1. Sénescence précoce des fibroblastes alvéolaires

Tout d'abord, les fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysémateux sont caractérisés par une sénescence cellulaire prématurée. Ainsi, les fibroblastes de poumon emphysémateux prolifèrent moins vite et effectuent moins de cycles cellulaires en comparaison avec des fibroblastes cultivés à partir de poumon normal, la réduction de leur capacité de prolifération étant estimée de 40 à 50%^{269, 281, 282}. Ces cellules expriment de plus la β -galactosidase associée à la sénescence¹⁷⁵. La sénescence précoce des fibroblastes est spécifique du poumon emphysémateux puisque les fibroblastes cultivés à partir de la peau des mêmes malades n'expriment pas la β -galactosidase²⁸³. Par ailleurs, les fibroblastes de poumon emphysémateux n'ont pas l'aspect en fuseau typique des fibroblastes en microscopie optique et expriment l' α -actine du muscle lisse, ce qui indique un certain degré de différenciation de ceux-ci vers un phénotype de myofibroblaste.

4.3.2.2. Altérations fonctionnelles

Enfin, des altérations de fonctions directement liées à la réparation tissulaire ont été décrites dans les fibroblastes de poumon emphysémateux. Leur chimiotaxie vis-à-vis de la fibronectine et leur capacité à contracter un gel de collagène, deux fonctions associées avec la réparation tissulaire, sont réduites respectivement de 63% et de 35%. Ces anomalies sont

au moins en partie liées à une surexpression par ces cellules de la prostaglandine E2 et de ses récepteurs EP2 et EP4, ainsi que par un émoussement de leur réponse au TGF- β 1²⁸⁴.

Ces données convergentes soutiennent l'hypothèse selon laquelle les fibroblastes de poumon emphysémateux humain présentent des altérations majeures de leurs fonctions de réparation et de régénération tissulaires, et que ces altérations pourraient expliquer l'absence de réparation tissulaire qui est responsable, en conjonction avec l'agression chronique des structures alvéolaires, de l'évolution progressive et irréversible de l'emphysème pulmonaire.

4.4.Perte de la capacité d'alvéologénèse chez le rat dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase

Un argument supplémentaire en faveur de la contribution d'un défaut de régénération alvéolaire à la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire a été apporté par la démonstration chez le rat que la constitution de lésions d'emphysème après une instillation trachéale d'élastase s'accompagne d'une diminution drastique de l'intensité de l'alvéologénèse induite dans le poumon restant par une lobectomie inférieure droite. Chez ces animaux, le nombre de cellules en cours de prolifération était réduit de 64% par rapport aux rats n'ayant pas subi d'instillation d'élastase²⁸⁵. Ce résultat démontre une altération majeure de la capacité d'alvéologénèse dans le poumon emphysémateux chez le rat.

4.5.L'activation des systèmes d'alvéologénèse est un objectif thérapeutique envisageable dans le poumon emphysémateux

La manipulation thérapeutique des systèmes d'alvéologénèse représenterait une avancée thérapeutique majeure pour le traitement de l'emphysème ainsi que des autres maladies pulmonaires chroniques caractérisées par la destruction du parenchyme pulmonaire. Ce résultat a déjà pu être obtenu chez l'animal dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase via l'administration d'agents pharmacologiques, la thérapie génique ou l'implantation de cellule souches mésenchymateuses, soulevant l'espoir qu'un tel effet puisse un jour être reproduit chez l'homme.

4.5.1.Régénération alvéolaire induite par l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA)

La validité du concept d'induction d'une alvéologénèse dans le poumon emphysémateux a été apportée par l'utilisation de l'ATRA dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation d'élastase chez le rat. L'administration d'ATRA pendant 8 jours à partir du 20^e jour après l'instillation d'élastase, c'est-à-dire alors que les lésions d'emphysème sont constituées, obtient une régression complète de l'élargissement des espaces aériens du poumon caractéristique de l'emphysème²⁸⁶. Ce résultat a été reproduit par certains²⁸⁷ mais pas par tous les auteurs ayant exploré l'effet de l'ATRA dans le modèle d'emphysème pulmonaire induit par l'élastase chez le rat et la souris²⁸⁸⁻²⁹¹.

4.5.2.Régénération alvéolaire induite par la simvastatine

La correction de lésions d'emphysème déjà installées a également été obtenue chez la souris dans le même modèle par l'administration de simvastatine. La simvastatine appartient à la famille des inhibiteurs de l'hydromyméthylglutaryl CoA réductase, une enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol. Ces molécules, outre leur action hypocholestérolémiant, possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Dans des études non contrôlées, la prise de statines a été associée à une diminution de la mortalité chez les patients atteints de BPCO²⁹².

Chez les souris traitées pendant 12 jours à partir du 20^e après l'instillation d'élastase, l'administration de simvastatine, outre un effet anti-inflammatoire, réduisait de 52% la taille des espaces aériens par rapport aux souris ayant reçu un placebo. Ce résultat soulève l'hypothèse de l'existence éventuelle d'interactions entre l'inflammation chronique d'une part et la répression des systèmes d'alvéologénèse d'autre part.

4.5.3.Régénération alvéolaire induite par le HGF

Le HGF est un très puissant stimulant de la régénération tissulaire dans le foie²¹⁸ et est un agent angiogénique très actif²⁹³. Ses propriétés pro-régénératives ont également été montrées au niveau pulmonaire dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase. Cet effet est associé à l'enracinement dans le poumon de cellule souches d'origine hématopoïétique²⁹⁴. L'effet régénérateur pulmonaire du HGF a été reproduit chez des rats ayant été transfectés par voie intraveineuse avec un plasmide contenant le gène du HGF humain sept jours après l'instillation d'élastase¹⁶⁰.

4.5.4.Régénération alvéolaire induite par l'adrénomédulline

L'adrénomédulline est un polypeptide exprimé dans tous les tissus et en particulier au niveau de la médullosurrénale. Il possède des propriétés vasodilatatrices et angiogéniques puissantes²⁹⁵. Cette molécule est impliquée dans les processus de réparation et régénération tissulaire dans de nombreux organes dont le cerveau²⁹⁶, l'estomac²⁹⁷ et le coeur²⁹⁸ et peut également induire l'alvéologénèse dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase chez la souris. L'élargissement des espaces aériens distaux observé chez les souris ayant reçu une instillation trachéale d'élastase était partiellement corrigé chez les animaux ayant été traités par une perfusion intraveineuse continue d'adrénomédulline du 25^e au 37^e jour après l'instillation²⁹⁹.

4.5.5. Thérapie cellulaire

Une autre approche possible pour l'obtention d'une alvéologénèse dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase est la transplantation dans le poumon de cellules souches mésenchymateuses obtenues à partir de tissu adipeux comme cela a démontré chez le rat^{300, 301}. Ces cellules étaient cultivées *in vitro* à partir du tissu adipeux inguinal de rats et implantées sur une maille réalisée à partir d'acide polyglycolique, laquelle était appliquée sur la tranche de section du poumon chez un autre animal ayant subi une intervention de réduction de volume pulmonaire. Chez les animaux ayant reçu l'implantation de cellules souches mésenchymateuses, une intensification des événements de prolifération cellulaire et une plus grande densité vasculaire étaient observées dans le poumon. Ces modifications structurelles s'accompagnaient d'une amélioration de la fonction respiratoire puisque la PaO₂ et la consommation maximale d'oxygène à l'exercice était supérieures de l'ordre de 50% chez ces animaux par rapport aux rats n'ayant pas reçu l'implantation des cellules souches. Les mécanismes empruntés par les cellules souches mésenchymateuses pour stimuler la régénération alvéolaire dans ce modèle ne sont pas connus de façon exhaustive mais une production très accrue de HGF était décrite dans le poumon des rats transplantés, suggérant que la sécrétion de ce facteur par les cellules transplantées ait pu jouer un rôle majeur dans ce modèle.

Dans l'ensemble, la faisabilité d'induire une régénération alvéolaire chez les rongeurs adultes a été démontrée dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase.

5. Hypothèses et objectifs du travail

5.1. Hypothèses

L'hypothèse générale de cette thèse est qu'une altération des systèmes d'alvéologénèse, en particulier de ceux mis en œuvre par les fibroblastes pulmonaires, joue un rôle central dans la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire, et que l'identification des systèmes défaillants pourrait amener à développer des stratégies thérapeutiques nouvelles pour cette maladie. Cette hypothèse a conduit à formuler deux objectifs :

5.2.Objectifs

5.2.1.Etude *ex vivo*

Le premier objectif de ce travail était de caractériser par une étude *ex vivo* le phénotype des fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysémateux, eu égard :

5.2.1.1.A leur capacité de sécréter deux facteurs de croissance jouant un rôle central au cours de l'alvéologénèse, HGF et KGF,

5.2.1.2.A leur capacité de produire le principal composant de la matrice extracellulaire du poumon, l'élastine, en réponse à des concentrations croissantes d'ATRA.

5.2.2.Etude *in vivo*

Le deuxième objectif de ce travail était d'apprécier dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase chez la souris si il existait une relation entre les anomalies observées dans les fibroblastes de poumon emphysémateux humain au cours de l'étude *ex vivo* et le développement de l'emphysème. Pour répondre à cette question:

5.2.2.1.Des souris ont été traitées par du KGF recombinant humain administré avant ou après la constitution des lésions d'emphysème, dans l'hypothèse que l'administration en excès de KGF possède un effet protecteur ou curatif contre l'emphysème dans ce modèle,

5.2.2.2.Des souris de génotype CRABP2^{-/-} ont été utilisées, dans l'hypothèse que l'inactivation de CRABP2, un composant majeur de la voie de réponse à

l'acide rétinoïque, sensibilise les animaux vis-à-vis de l'emphysème dans ce modèle.

6. Résultats ex vivo

6.1. Défaut de production d'HGF par les fibroblastes d'emphysème

Plantier L, Marchand-Adam S, Marchal-Sommé J, Lesèche G, Fournier M, Dehoux M, Aubier M, Crestani B.

Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 Apr;288(4):L641-7. PMID: 15579628

6.1.1.Objectifs et méthodes

Les facteurs de croissance HGF et KGF jouent un rôle de premier plan au cours de l'alvéologénèse et dans le maintien de l'homéostasie alvéolaire. Ils ciblent les cellules épithéliales et endothéliales de l'alvéole et sont produits à ce niveau par les fibroblastes des cloisons alvéolaires.

Le premier travail mené dans le cadre de cette thèse a eu pour objectif de déterminer si les fibroblastes du poumon emphysémateux présentaient une altération de leur production de HGF et KGF. Pour répondre à cette question, une approche *ex vivo* a été adoptée et des cultures de fibroblastes obtenues par culture primaire de pièces opératoires ont été utilisées. Les lignées de fibroblastes témoins étaient obtenues à partir de poumon réséqué lors d'interventions de résection réglée de tumeurs malignes, d'ablation de corps étranger ou de pleurodèse. L'absence de trouble ventilatoire obstructif était vérifiée, de même que celle de lésions microscopiques d'emphysème sur les pièces opératoires. Les fragments de poumon utilisés pour la culture de cellules étaient prélevés à distance de la tumeur le cas échéant. Les lignées de fibroblastes de poumon emphysémateux étaient obtenues à partir de fragments de poumon réséqué lors d'interventions de réduction de volume pulmonaire ou à partir de poumons explantés lors d'une transplantation pulmonaire. L'absence de pathologie associée était vérifiée au niveau histologique. Les cellules étaient utilisées au 5^e passage de culture.

La production et la sécrétion de HGF et de KGF par les fibroblastes ont été étudiées au niveau de l'ARNm messager et de la protéine, à l'état basal et en réponse à l'interleukine-1 et la prostaglandine E2, deux agents pro-inflammatoires, à la N-acétyl-cystéine, un chélateur des oxydants, ainsi qu'à l'ATRA et à l'acide rétinoïque 9-cis.

Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema

Laurent Plantier,¹ Sylvain Marchand-Adam,¹ Joëlle Marchal-Sommé,¹ Guy Lesèche,² Michel Fournier,³ Monique Dehoux,^{1,4} Michel Aubier,^{1,5} and Bruno Crestani^{1,5}

¹INSERM U700, Faculté de médecine Xavier Bichat, Université Paris 7, Paris; ²Service de chirurgie thoracique and ³Service de pneumologie, Hôpital Beaujon, Clichy; and ⁴Service de biochimie and

⁵Service de pneumologie, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

Submitted 2 July 2004; accepted in final form 28 November 2004

Plantier, Laurent, Sylvain Marchand-Adam, Joëlle Marchal-Sommé, Guy Lesèche, Michel Fournier, Monique Dehoux, Michel Aubier, and Bruno Crestani. Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L641–L647, 2005. First published December 3, 2004; doi:10.1152/ajplung.00249.2004.—Pulmonary emphysema results from an excessive degradation of lung parenchyma associated with a failure of alveolar repair. Secretion by pulmonary fibroblasts of hepatocyte growth factor (HGF) and keratinocyte growth factor (KGF) is crucial to an effective epithelial repair after lung injury. We hypothesized that abnormal HGF or KGF secretion by pulmonary fibroblasts could play a role in the development of emphysema. We measured in vitro production of HGF and KGF by human fibroblasts cultured from emphysematous and normal lung samples. HGF and KGF production was quantified at basal state and after stimulation. Intracellular content of HGF was lower in emphysema (1.52 pg/μg, range of 0.15–7.40 pg/μg) than in control fibroblasts (14.16 pg/μg, range of 2.50–47.62 pg/μg; $P = 0.047$). HGF production by emphysema fibroblasts (19.3 pg/μg protein, range of 10.4–39.2 pg/μg) was lower than that of controls at baseline (57.5 pg/μg, range of 20.4–116 pg/μg; $P = 0.019$) and after stimulation with interleukin-1β or prostaglandin E₂. Neither retinoic acids (*all-trans* and *9-cis*) nor *N*-acetylcysteine could reverse this abnormality. KGF production by emphysema fibroblasts (5.3 pg/μg, range of 2.2–9.3 pg/μg) was similar to that of controls at baseline (2.6 pg/μg, range of 1–6.1 pg/μg; $P = 0.14$) but could not be stimulated with interleukin-1β. A decreased secretion of HGF by pulmonary fibroblasts could contribute to the insufficient alveolar repair in pulmonary emphysema.

pneumocytes; fibroblast growth factor-7; alveolar repair; retinoids

THE PATHOGENESIS OF PULMONARY emphysema remains incompletely understood. Tobacco smoke exposure leads to major alterations of the lung microenvironment, mostly by inducing oxidative stress (22) and chronic inflammation (7) with an excessive degradation of extracellular matrix proteins and apoptosis of alveolar epithelial and endothelial cells (30). However, the constitution of pulmonary emphysema may also be interpreted as the consequence of a failure of the repair processes of the lung. The hypothesis that the mechanisms involved in alveolar repair may be defective in emphysema was elegantly put forward by Massaro and Massaro (25) who demonstrated that *all-trans*-retinoic acid (ATRA) is able to promote a new round of alveolar septation and alveolar repair after constitution of pulmonary emphysema in the rat (25).

The mechanisms of alveolar epithelial repair have so far been described in the context of acute lung injury and lie mainly in the ability of type 2 pneumocytes to proliferate, migrate along the denuded basal membrane, and eventually differentiate into type 1 pneumocytes (24). The role of mesenchymal-epithelial interactions in this process is essential. Pulmonary fibroblasts have the ability to produce and maintain the extracellular matrix structure, whose integrity is needed for epithelial cells to migrate and differentiate (26). Furthermore, fibroblasts produce and release several growth factors that stimulate alveolar epithelial cell proliferation, differentiation, and migration, such as keratinocyte growth factor (KGF) (also known as the fibroblast growth factor-7) and hepatocyte growth factor (HGF). Both molecules facilitate the repair of an experimental epithelial wound in vitro (11, 12) and are protective in a number of animal models of acute lung injury (34). Moreover, besides their potent action on alveolar epithelial cells, KGF and HGF have been shown to act on endothelial cells, as both factors promote endothelial cell survival and favor angiogenesis (4, 13). Production of HGF and KGF is part of the normal response to lung injury, as evidenced in animals (1) and in humans (31). In premature infants, a low KGF concentration in the airways is associated with the further development of bronchopulmonary dysplasia (9). Interestingly, a link has been evidenced between retinoids and KGF and HGF because ATRA may regulate KGF and HGF expression in vitro (6, 21) and in vivo (20). Recently, HGF has been shown to orchestrate pulmonary regeneration in emphysematous lung in mice (15).

Our hypothesis is that altered properties of lung fibroblasts contribute to defective alveolar repair in pulmonary emphysema. This question has not been previously evaluated, and very limited data concerning the functional properties of pulmonary fibroblasts in emphysema are available. The in vitro proliferative capacity of lung fibroblasts has been shown to be reduced in patients with emphysema compared with controls, a finding that may negatively influence the alveolar repair process (28). No data are available concerning the production of KGF and HGF, essential mediators of alveolar repair, by lung fibroblasts in emphysema.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the production of HGF and KGF by human lung fibroblasts cultured from normal and emphysematous lungs and to determine the modulatory action of retinoids.

Address for reprint requests and other correspondence: B. Crestani, Service de Pneumologie, Hôpital Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75877, Paris cedex 18, France (E-mail: bruno.crestani@bch.ap-hop-paris.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the ethics committee of Paris-Bichat University Hospital. Informed consent was obtained from patients.

Study Population

Pulmonary emphysema patients. Fibroblasts were cultured from lung samples from nine patients (7 men) with severe pulmonary emphysema who were undergoing lung volume reduction surgery ($n = 5$) or lung transplantation ($n = 4$). Median age of patients was 60 yr (range of 41–70 yr). All patients were smokers or ex-smokers (34 ± 14 pack-yr), with the exception of one patient who had α_1 -proteinase inhibitor deficiency. Emphysema was diagnosed by the presence of an obstructive ventilatory disorder via lung function tests associated with characteristic chest computed tomography and histological findings. The absence of any associated lung disease was verified. Five patients received inhaled steroids at the time of sampling.

Control patients. Fibroblasts were cultured from lung samples from eight patients (5 men) undergoing lung surgery for cancer ($n = 6$), foreign body removal ($n = 1$), or pleurodesis ($n = 1$). Median age of controls was 61 yr (range of 41–67 yr). Lung samples were taken from an uninvolved segment, and the absence of emphysema was histologically controlled. Four patients were active or past smokers (30 ± 1 pack-yr), and four never smoked. One patient received inhaled steroids for asthma treatment.

Culture of Fibroblasts

Pulmonary fibroblasts were cultured from lung explants as previously described (23). Fibroblasts were cultured with DMEM culture medium (GIBCO/Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with 10% fetal calf serum (Fetalclone 2, Hyclone, Logan, UT), 100 IU/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate, and 0.25 μ g/ml amphotericin B (GIBCO/Invitrogen). Cells were maintained at 37°C with 5% CO₂ and were used at passage 5. To confirm the fibroblastic nature of cultured cells, all cell cultures were evaluated immunohistochemically at passage 5. All cells stained positive with antivimentin, antidesmin, and antiprol-4-hydroxylase antibodies (Dako Cytomation, Trappes, France). Three of the seven control cultures and all emphysema cultures contained 5–10% α -smooth muscle actin-positive cells, indicating some differentiation toward a myofibroblast phenotype. Staining with antibodies directed against smooth muscle myosin heavy chain 1, pancytokeratin, and CD31 was always negative.

HGF And KGF Secretion by Fibroblasts

Fibroblasts were cultured to confluence in 12-well tissue culture plates (Corning, Schiphol-Rijk, The Netherlands), washed two times in PBS (GIBCO/Invitrogen), then incubated in serum-free DMEM, and exposed to stimulants or kept unstimulated. For HGF secretion determination, cells were incubated for 18 h in 1 ml of DMEM. For KGF secretion determination, cells were cultured for 48 h in 500 μ l of DMEM because, in preliminary experiments, KGF concentrations were below the detection level after an 18-h incubation period in 1 ml of DMEM. Cell supernatants were stored at -80°C until determina-

tion of HGF and KGF concentrations. Fibroblasts were stimulated with interleukin-1 β (IL-1 β , 10 ng/ml) or prostaglandin E₂ (PGE₂, 10^{-6} M) at concentrations previously shown to exert a maximal stimulatory effect on HGF and KGF secretion by fibroblasts (23, 32). N-acetylcysteine (NAC) is a potent anti-oxidant agent proven to inhibit oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts exposed to cigarette smoke extract in vitro (5) and to be protective in animal models of emphysema (2, 29). In some experiments, control and emphysema fibroblasts were cultured with 10^{-2} M NAC to determine whether this agent could modulate the secretion of HGF and KGF by those cells. To appreciate the regulatory effect of retinoids, fibroblasts were cultured with 10^{-6} M ATRA or 9-*cis*-retinoic acid (9cisRA, 10^{-6} M). For these experiments, cells cultured with 1% DMSO were used as controls because ATRA and 9cisRA were dissolved in DMSO. All stimulants were obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Measurement of HGF and KGF Concentration

HGF and KGF concentrations in cell supernatants were measured with HGF and KGF ELISA (Duoset development kits, R&D, Abingdon, UK). Sensitivity of the tests was 125 pg/ml for HGF and 15 pg/ml for KGF. Total cellular proteins were recovered in Tris-HCl after two freeze-thaw cycles and sonication, and the protein content of the cell monolayer was determined with the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, Marne-la-coquette, France). HGF secretion and KGF secretion by fibroblasts were expressed as picograms HGF or KGF per microgram of protein in the cell monolayer.

Determination of Intracellular HGF and KGF

Fibroblasts were cultured to confluence in 75-cm² flasks and deprived of serum for 18 h. The culture medium was aspirated, the cells were rinsed twice with PBS, and then the cell monolayer was lysed with the Cytobuster protein extraction reagent (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany). HGF and KGF were quantified in the lysate with the Duoset ELISA, as described above. The total protein content of the cell monolayer was determined with the Bio-Rad protein assay. Intracellular HGF and KGF were expressed as picograms per micrograms of protein.

Quantitative Analysis of proHGF and KGF mRNA

Fibroblasts were grown to confluence in 75-cm² tissue culture flasks and cultured in serum-free DMEM for 18 h. Total RNA was extracted and reverse transcribed as described previously (23). Quantitative real-time PCR using a Sybr green fluorochrome (Sigma) was performed on an ABI Prism 7700 cycler (AME Bioscience, London, UK) to quantify proHGF mRNA (proHGF is the inactive precursor of HGF) and KGF mRNA. Ubiquitin C mRNA served as an endogenous mRNA control (19). Results were expressed as proHGF-to-ubiquitin C mRNA ratio and KGF-to-ubiquitin mRNA ratio. Primer sequences and amplification products are described in Table 1.

Statistical Analysis

All data are expressed as medians (with ranges given in parentheses). Differences between emphysema and control fibroblasts were

Table 1. Quantitative PCR primers

Primers		Sequence	Amplification Product
proHGF	Forward	5' - CAGAGGACAAAGGAAAAGAA - 3'	167 bp
	Reverse	5' - GCAAGTGAATGGAAATCCTTTA - 3'	
KGF	Forward	5' - GAACAAGGAAGGAAACTCTATGCAA - 3'	201 bp
	Reverse	5' - AAGTGGCTGTTTTTGTCTTCT - 3'	
Ubiquitin C	Forward	5' - CACTTGGCTCCTGCGCTTGA - 3'	105 bp
	Reverse	5' - TTTTGGGAATGCAACAACCTTT - 3'	

KGF, keratinocyte growth factor; proHGF, inactive precursor of hepatocyte growth factor.

determined by the Mann-Whitney *U*-test. To compare the effect of pharmacological agents on baseline conditions, we used Friedman's ANOVA test, which was followed by Wilcoxon's paired test for group comparisons. Comparisons were made with Spearman's non-parametric correlations test for continuous variables and with Mann-Whitney's *U*-test for categorical variables. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

HGF Secretion by Unstimulated Fibroblasts

All pulmonary fibroblasts from control subjects secreted detectable levels of HGF in vitro [57.5 pg/ μ g (20.4–116 pg/ μ g)]. There was no observable difference between smokers or ex-smokers and those who never smoked.

Nine emphysema fibroblast cultures were evaluated for HGF secretion. HGF concentrations were below the detection level of the assay for three of them. For statistical analysis, a value of 125 pg/ml was attributed to these cell lines. Unstimulated HGF secretion by the five remaining fibroblast cultures was 19.3 pg/ μ g (10.4–39.2 pg/ μ g). HGF secretion by emphysema fibroblasts was markedly lower than that of controls ($P = 0.019$; Fig. 1). HGF secretion did not correlate with age, forced expiratory volume in 1 s, residual volume, total lung capacity, carbon monoxide diffusing capacity, or tobacco smoke exposure expressed as pack-years of smoking.

Intracellular HGF was determined in five emphysema and five control fibroblast cultures. The intracellular HGF content of emphysema fibroblasts [1.52 pg/ μ g (0.15–7.40 pg/ μ g); $P = 0.047$] was lower than that of control fibroblasts [14.16 pg/ μ g (2.50–47.62 pg/ μ g)]. Intracellular HGF did not correlate with HGF secretion in control and emphysema fibroblasts (Fig. 1).

ProHGF mRNA was detected in all lung fibroblast cultures. ProHGF-to-ubiquitin C (UBC) mRNA ratio in unstimulated emphysema fibroblasts [0.511 (0.053–2.29)] was lower than that of control fibroblasts [1.76 (0.76–37.59); $P = 0.021$; Fig. 1].

Modulation of HGF Secretion

HGF secretion by control fibroblasts was increased by IL-1 β [131.5 pg/ μ g (50.7–291.3 pg/ μ g); $P = 0.011$] and PGE₂ [238 pg/ μ g (88.2–428.1 pg/ μ g); $P = 0.011$] (Fig. 2). Stimulation by PGE₂ was more potent than that induced by IL-1 β ($P = 0.017$) (Fig. 2). HGF secretion by control fibroblasts cultured with DMSO was 35.4 pg/ μ g (8.6–102.5 pg/ μ g). ATRA [35.6 pg/ μ g (7.6–184.3 pg/ μ g)] and 9cisRA [28.2 pg/ μ g (8.1–128.8 pg/ μ g)] did not significantly modulate HGF secretion by control fibroblasts ($P = 0.67$ and 0.16 , respectively).

HGF secretion by emphysema fibroblasts was increased by IL-1 β [35.6 pg/ μ g (6.1–70.2 pg/ μ g); $P = 0.017$] and PGE₂ [48.9 pg/ μ g (22.3–66.1 pg/ μ g); $P = 0.018$, Fig. 3] and reached levels similar to that of unstimulated controls. HGF secretion by emphysema fibroblasts cultured with DMSO was 16.8 pg/ μ g (2.6–36.2 pg/ μ g). ATRA [11 pg/ μ g (0–33 pg/ μ g)] and 9cisRA [14.9 pg/ μ g (1.7–57.3 pg/ μ g)] did not modulate HGF secretion by emphysema fibroblasts ($P = 0.21$ and 0.31 , respectively). The effect of NAC (10^{-2} M) on HGF secretion was evaluated in five emphysema fibroblast cell lines. In these experiments, NAC inhibited HGF secretion [unstimulated: 26.0 pg/ μ g (16.3–39.2 pg/ μ g); NAC: 14.6 pg/ μ g (7.1–25.46 pg/ μ g); $P = 0.04$, Fig. 3].

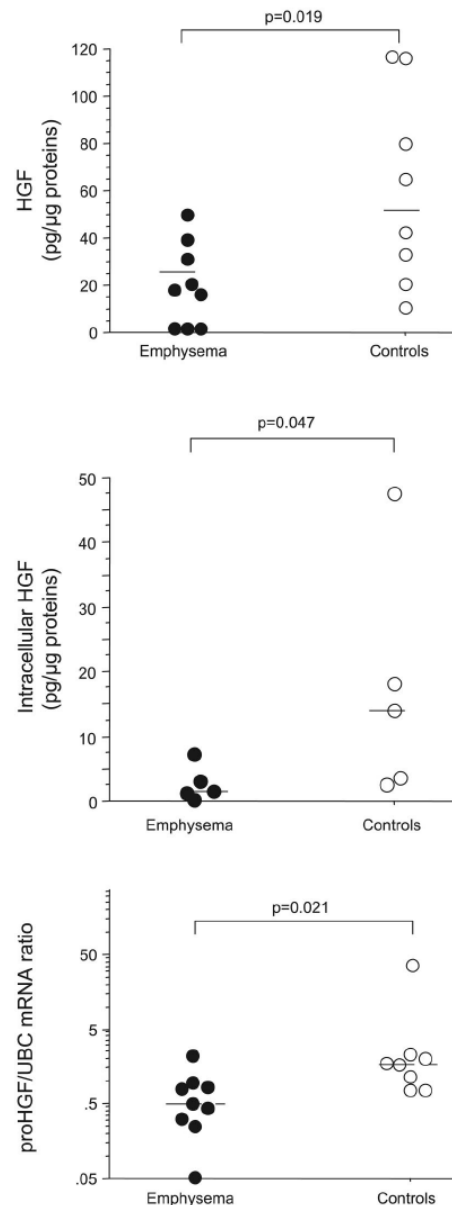


Fig. 1. Basal hepatocyte growth factor (HGF) secretion (*top*, linear scale), intracellular HGF (*middle*, linear scale), and basal proHGF (inactive precursor of HGF)-to-ubiquitin C (UBC) mRNA ratio (*bottom*, logarithmic scale) in emphysema fibroblasts and control fibroblasts. Individual values and median (bar) are given.

KGF Secretion by Unstimulated Fibroblasts

Seven control fibroblast cultures were evaluated for KGF secretion (see Fig. 5). All produced detectable amounts of KGF at baseline in vitro [2.6 pg/ μ g (1–6.1 pg/ μ g)]. Unstimulated secretion of KGF by fibroblasts from smokers [4.45 pg/ μ g

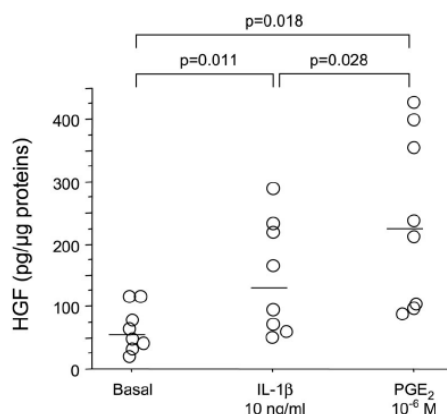


Fig. 2. Modulation of HGF secretion by control fibroblasts ($n = 8$) cultured in basal condition or exposed to 10 ng/ml IL-1 β or 10^{-6} M PGE $_2$. Individual values and median (bar) are shown.

(2.6–6.1 pg/ μ g); $n = 3$) was higher than that of nonsmokers [1.4 pg/ μ g (1–2.5 pg/ μ g); $n = 4$, $P = 0.033$].

Seven emphysema fibroblast cultures were evaluated for KGF secretion in vitro (see Fig. 6). KGF secretion by emphysema fibroblasts [5.3 pg/ μ g (2.2–9.3 pg/ μ g)] was similar to that of controls ($P = 0.14$; Fig. 4).

Intracellular KGF was determined in five emphysema and five control fibroblast cultures. The KGF content of control fibroblasts [1.58 pg/ μ g (0.77–3.8 pg/ μ g)] was not different from that of emphysema fibroblasts [0.99 pg/ μ g (0.04–2.16 pg/ μ g); $P = 0.17$].

KGF mRNA was detected in all lung fibroblast cultures. KGF-to-ubiquitin C mRNA ratio in emphysema fibroblasts [1.014 (0.44–20.23)] was not different from that of control fibroblasts [2.36 (0.66–14.08); $P = 0.44$; Fig. 4].

Modulation of KGF Secretion

KGF secretion by control fibroblasts was increased by IL-1 β [4.6 pg/ μ g (3.4–12 pg/ μ g); $P = 0.042$] and PGE $_2$ [3.8 pg/ μ g (1.7–11.9 pg/ μ g); $P = 0.028$] (Fig. 5). By contrast, IL-1 β did not stimulate KGF secretion by emphysema fibroblasts [7.3 pg/ μ g (2.1–10.1 pg/ μ g); $P = 0.86$], whereas the stimulatory effect of PGE $_2$ was maintained [9.8 pg/ μ g (4.1–21.5 pg/ μ g); $P = 0.027$] (Fig. 6).

KGF secretion by control fibroblasts cultured with DMSO was 3.6 pg/ μ g (1.1–8.9 pg/ μ g). KGF secretion by control fibroblasts cultured with ATRA [2.7 pg/ μ g (0.9–4.7 pg/ μ g)] was not different from that of cells cultured with DMSO ($P = 0.09$), whereas 9cisRA had an inhibitory effect [1.7 pg/ μ g (0.9–5.1 pg/ μ g); $P = 0.034$]. KGF secretion by emphysema fibroblasts cultured with DMSO was 3.2 pg/ μ g (0–23 pg/ μ g). ATRA [4.1 pg/ μ g (0–15.9 pg/ μ g)] and 9cisRA [3 pg/ μ g (1.2–12.4 pg/ μ g)] did not modulate KGF secretion by emphysema fibroblasts ($P = 0.17$ and 0.46, respectively).

DISCUSSION

The main findings of this study are 1) that lung fibroblasts cultured in vitro from patients with pulmonary emphysema have a decreased ability to produce and to secrete HGF

compared with those cultured from control patients and 2) that KGF secretion by emphysema fibroblasts is similar to that of controls at baseline but is not stimulated by IL-1 β .

Fibroblasts play an important role in lung development and homeostasis and are involved in the complex repair process that follows lung injury. We studied lung fibroblasts from patients with severe emphysema requiring lung volume reduction surgery or transplantation. Pulmonary fibroblasts were obtained by primary culture of tissue fragments and were studied at the fifth passage, after prolonged cultivation. Their functional properties may have been quite different from those of in vivo cells. However, because control and emphysema fibroblasts were similarly cultured, this is unlikely to explain the difference between cell types. Considering the heterogeneous repartition of lesions in pulmonary emphysema, it is possible that culture of lung samples from mildly emphysematous lung areas may have led to different results. This could not be done in our study. However, we studied fibroblasts from smokers without emphysema to control for the possible role of tobacco exposure. Every other control patient was an active or past smoker, and, although none had detectable lung emphy-

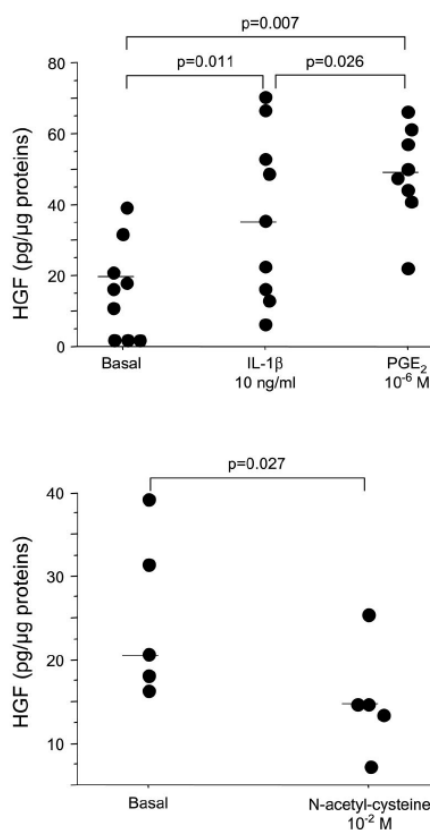


Fig. 3. *Top*: modulation of HGF secretion by emphysema fibroblasts cultured in basal condition ($n = 9$) or exposed to 10 ng/ml IL-1 β ($n = 9$) or 10^{-6} M PGE $_2$ ($n = 8$). Individual values and median (bar) are given. *Bottom*: modulation of HGF secretion by emphysema fibroblasts cultured in basal condition or exposed to 10^{-2} M N-acetylcysteine ($n = 5$). Individual values and median (bar) are given.

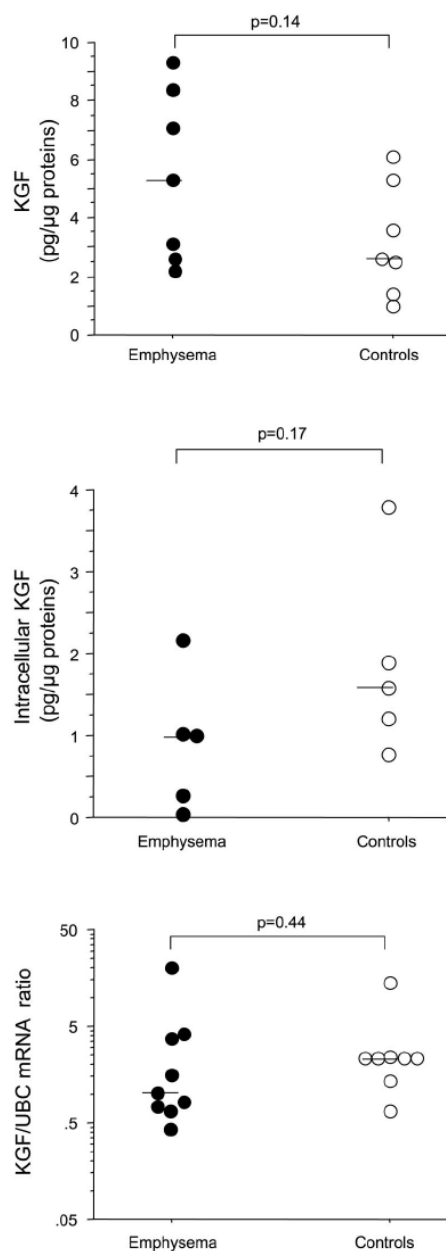


Fig. 4. Basal keratinocyte growth factor (KGF) secretion (*top*, linear scale), intracellular KGF (*middle*, linear scale), and basal KGF-to-ubiquitin C mRNA ratio (*bottom*, logarithmic scale) in emphysema fibroblasts and control fibroblasts. Individual values and median (bar) are given.

sema at computed tomography, it remains difficult to exclude the presence of minimal emphysema at histological examination of frozen and poorly inflated lung samples obtained from resected specimens.

We observed that HGF secretion by unstimulated emphysema pulmonary fibroblasts was two to three times lower than

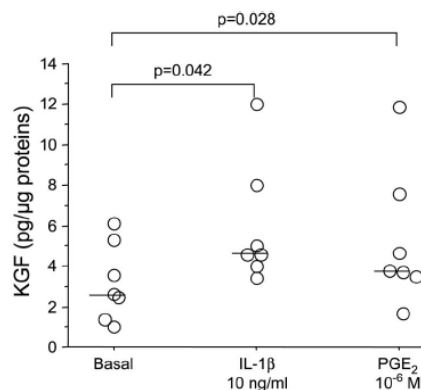


Fig. 5. KGF secretion by control fibroblasts ($n = 7$) cultured in basal condition or exposed to 10 ng/ml IL-1 β or 10^{-6} M PGE $_2$. Individual values and median (bar) are given.

that of controls. To assess whether a decreased HGF secretion by emphysema fibroblasts was related to a decreased production of HGF by those cells, we determined the intracellular content of HGF in emphysema and control fibroblasts. Intracellular HGF was markedly lower in emphysema fibroblasts than in control fibroblasts. This points to a defect in HGF production by those cells. This reduction in HGF production and secretion by emphysema fibroblasts was associated with a reduction of proHGF mRNA content compared with control fibroblasts. NAC, a potent antioxidant molecule, did not increase and eventually had an inhibitory effect on HGF production by emphysema fibroblasts. It is therefore unlikely that the lower HGF secretion by those cells was related to oxidative stress, which is known to participate in the pathogenesis of emphysema (22). HGF secretion by emphysema fibroblasts could still be stimulated by IL-1 β and PGE $_2$, demonstrating that the regulatory machinery of HGF secretion was functional in these cells. In preliminary experiments, we verified that 10^{-2} M NAC had no cytotoxic effects on control and emphysema fibroblasts.

The defect of HGF production and secretion that we measured was not the consequence of a generalized modification of

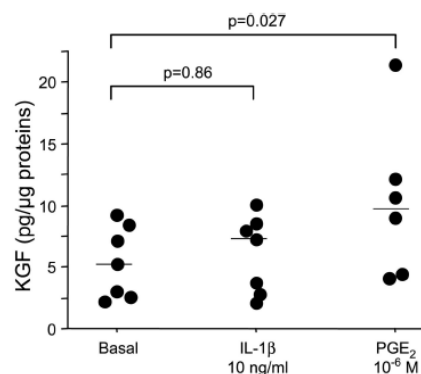


Fig. 6. KGF secretion by emphysema fibroblasts cultured in basal condition ($n = 7$) or exposed to 10 ng/ml IL-1 β ($n = 7$) or 10^{-6} M PGE $_2$ ($n = 6$). Individual values and median (bar) are given.

gene expression and protein production and secretion by emphysema fibroblasts but appeared to be specific for HGF. Indeed, unstimulated KGF protein content and secretion and mRNA transcription by emphysema fibroblasts were similar to results shown in controls.

Besides fibroblasts, different lung cell types have been shown to produce HGF, such as smooth muscle cells (27), neutrophils (14, 16), and perhaps alveolar macrophages, although this remains debatable (8). Neutrophils are increased in the lung in emphysema (10) and could contribute to HGF secretion in emphysema in vivo. At this time, there are no data concerning HGF expression in situ in the emphysematous lung.

KGF secretion by emphysema fibroblasts was not stimulated by IL-1 β , whereas IL-1 β did stimulate HGF secretion in those cells. This discrepancy may indicate that the stimulation by IL-1 β of KGF and HGF secretion by lung fibroblasts involves separate signaling pathways downstream of the IL-1 receptor. Indeed, many intracellular signal transduction pathways have been shown to be activated by the binding of IL-1 to its receptor (3). A defect in the stimulatory effect of IL-1 β on KGF secretion may lead to a relative deficiency of KGF secretion by fibroblasts in the context of alveolar injury and contribute to a defective alveolar repair.

KGF and HGF are survival and growth factors for epithelial and endothelial cells and stimulate angiogenesis (4, 13). A defect in KGF or HGF production by neighboring fibroblasts could contribute to the excessive apoptosis of epithelial and endothelial cells, which is now recognized as an important step in the constitution of emphysema. Underexpression of vascular endothelial growth factor, a potent mitogen for endothelial cells and a strong promoter of angiogenesis, has been recently shown to be involved in the pathophysiology of pulmonary emphysema in animals and in humans (17, 18). Whether underexpression of HGF or KGF favors the development of emphysema in vivo has not been previously evaluated in the literature and warrants further study. Recently, Ishizawa et al. (15) showed that intraperitoneal recombinant human HGF abrogates elastase-induced emphysema in mice through the mobilization of endothelial precursors cells and their engraftment in the damaged alveoli.

Interestingly, we previously showed that fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis lungs secrete low levels of HGF and contain lower amounts of proHGF mRNA than control fibroblasts (23). Alveolar repair is thought to play an important role in the pathogenesis of IPF as well as emphysema (30, 33). A defect in HGF secretion by fibroblasts could contribute to this phenomenon in both diseases.

ATRA has been shown to promote alveolar repair in elastase-induced emphysema in rats (25). Retinoids have been shown to modulate HGF and KGF secretion in different human cell types (6, 21). However, neither ATRA nor 9cisRA (10^{-6} M) was able to regulate positively HGF secretion by emphysema or control fibroblasts in vitro in our study. In contrast, 9cisRA had an inhibitory effect on KGF secretion by control fibroblasts instead of the expected stimulatory effect. Interestingly, 9cisRA did not modulate KGF secretion by emphysema fibroblasts. Thus the beneficial role of ATRA demonstrated in animal models of pulmonary emphysema is unlikely to be secondary to an effect on HGF or KGF secretion by lung fibroblasts.

Altogether, our results indicate that pulmonary emphysema fibroblasts have a reduced capacity to produce and secrete HGF in vitro compared with control fibroblasts. This may contribute to the insufficient alveolar repair observed in pulmonary emphysema.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Veronique Leçon and Francine Hochedez for help preparing ELISA plates.

GRANTS

L. Plantier benefited from a "research year" grant from the Assistance Publique-Hopitaux de Paris. S. Marchand-Adam benefited from grants from Fondation pour la recherche médicale (Prix Mariane Josso) and from Fondation Benaim.

REFERENCES

- Adamson IY and Bakowska J. 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, 1999.
- Balansky RB, D'Agostini F, Zancacchi P, and De Flora S. Protection by N-acetylcysteine of the histopathological and cytogenetical damage produced by exposure of rats to cigarette smoke. *Cancer Lett* 64: 123–131, 1992.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, and McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* 59: 61–83, 1996.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, and Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119: 629–641, 1992.
- Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Cell A, and Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L955–L963, 2003.
- Chattopadhyay N, Butters RR, and Brown EM. Agonists of the retinoic acid- and retinoid X-receptors inhibit hepatocyte growth factor secretion and expression in U87 human astrocytoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 87: 100–108, 2001.
- Cosio MG and Majo J. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* 121: 160S–165S, 2002.
- Crestani B, Dehoux M, Hayem G, Lecon V, Hochedez F, Marchal J, Jaffre S, Stern JB, Durand G, Valeyre D, Fournier M, and Aubier M. Differential role of neutrophils and alveolar macrophages in hepatocyte growth factor production in pulmonary fibrosis. *Lab Invest* 82: 1015–1022, 2002.
- Danan C, Franco ML, Jarreau PH, Dassieu G, Chailley-Heu B, Bourbon J, and Delacourt C. High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1384–1387, 2002.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, and Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1277–1285, 1998.
- Furuyama A and Mochitate K. Hepatocyte growth factor inhibits the formation of the basement membrane of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L939–L946, 2004.
- Gallacy S, Planus E, Lepetit H, Fereol S, Laurent V, Ware L, Isabey D, Matthay M, Harf A, and d'Ortho MP. Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro. *Exp Cell Res* 283: 215–229, 2003.
- Gillis P, Savla U, Volpert OV, Jimenez B, Waters CM, Panos RJ, and Bouck NP. Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J Cell Sci* 112: 2049–2057, 1999.
- Grenier A, Chollet-Martin S, Crestani B, Delarche C, El Benna J, Boutten A, Andrieu V, Durand G, Gougerot-Podalo MA, Aubier M, and Dehoux M. Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 99: 2997–3004, 2002.
- Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, Nakamura T, and Sasaki H. Hepatocyte growth factor induces angio-

- genesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 276–280, 2004.
16. Jaffre S, Dehoux M, Paugam C, Grenier A, Chollet-Martin S, Stern JB, Mantz J, Aubier M, and Crestani B. Hepatocyte growth factor is produced by blood and alveolar neutrophils in acute respiratory failure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L310–L315, 2002.
 17. Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, and Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 737–744, 2001.
 18. Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, and Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 106: 1311–1319, 2000.
 19. Kim S and Kim T. Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease. *Biotechniques* 35: 456–458, 460, 2003.
 20. Kitano Y, Yoshimura K, Uchida G, Sato K, and Harii K. Pretreatment with topical all-trans-retinoic acid is beneficial for wound healing in genetically diabetic mice. *Arch Dermatol Res* 293: 515–521, 2001.
 21. Mackenzie IC and Gao Z. Keratinocyte growth factor expression in human gingival fibroblasts and stimulation of in vitro gene expression by retinoic acid. *J Periodontol* 72: 445–453, 2001.
 22. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 117: 303S–317S, 2000.
 23. Marchand-Adam S, Marchal J, Cohen M, Soler P, Gerard B, Castier Y, Leseche G, Valeyre D, Mal H, Aubier M, Dehoux M, and Crestani B. Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1156–1161, 2003.
 24. Mason RJWR. Alveolar type II cells. In: *The Lung: Scientific Foundations*, edited by Crystal RWJ, Barnes P, Cherniack N, and Weibel E. New York: Raven, 1991, p. 235–246.
 25. Massaro GD and Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 3: 675–677, 1997.
 26. Morris SM, Thomas KM, Rich CB, and Stone PJ. Degradation and repair of elastic fibers in rat lung interstitial fibroblast cultures. *Anat Rec* 250: 397–407, 1998.
 27. Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, Yamada K, Hayashi S, Yo Y, Matsumoto K, Nakamura T, and Ogihara T. Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 483–488, 1995.
 28. Noordhoek JA, Postma DS, Chong LL, Vos JT, Kauffman HF, Timens W, and van Straaten JF. Different proliferative capacity of lung fibroblasts obtained from control subjects and patients with emphysema. *Exp Lung Res* 29: 291–302, 2003.
 29. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, and Gonzalez-Mangado N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 125: 1500–1506, 2004.
 30. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, and Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 117: 684–694, 2000.
 31. Stern JB, Fierobe L, Paugam C, Rolland C, Dehoux M, Petiet A, Dombret MC, Mantz J, Aubier M, and Crestani B. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 28: 2326–2333, 2000.
 32. Tamura M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H, and Daikuhara Y. Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 α and -1 β and tumor necrosis factor- α by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 268: 8140–8145, 1993.
 33. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, and Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275: L1192–L1199, 1998.
 34. Ware LB and Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L924–L940, 2002.

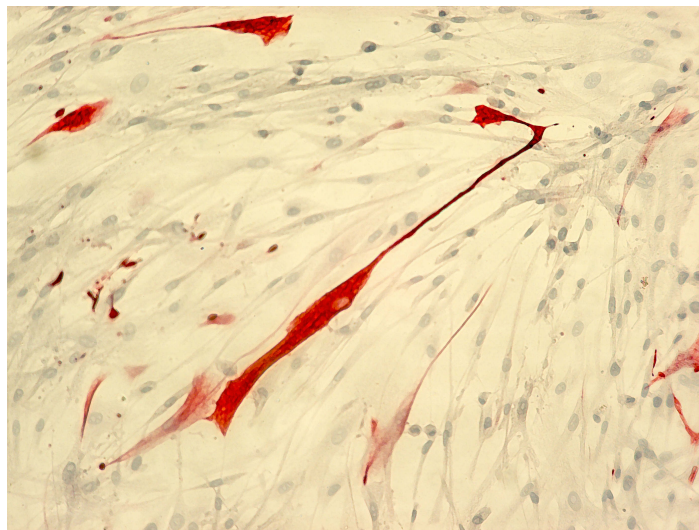


6.1.2.Résultat complémentaire : Aspect en culture des fibroblastes de poumon sain et de poumon emphysémateux

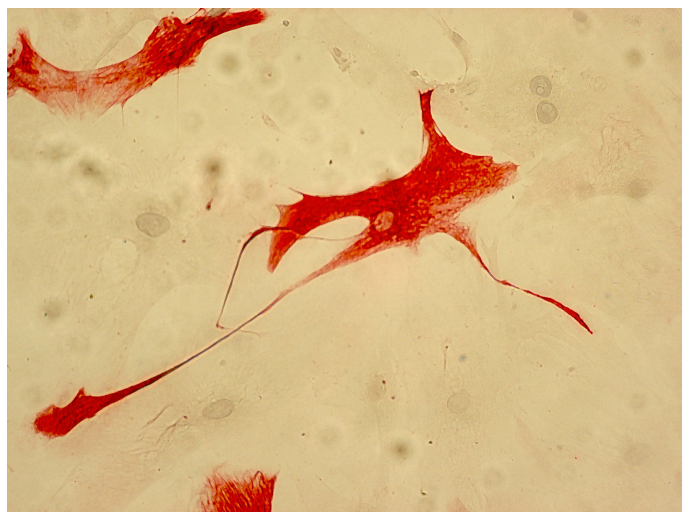
Les fibroblastes cultivés à partir de poumon sain avaient un aspect en fuseau typique des fibroblastes. Les fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysémateux avaient un cytoplasme de plus grande taille et prenaient un aspect aplati. Ils possédaient par ailleurs des extensions cytoplasmiques (figure 4).

Figure 4 : Aspect en culture des fibroblastes cultivés à partir 4a) de poumon de fumeur sain et 4b) de fumeur atteint d'emphysème. Les cellules sont marquées par un anticorps reconnaissant la desmine, révélé en rouge par la peroxydase. Chromogène : Fast Red.

4a)



4b)



6.1.3.Discussion

6.1.3.1.Discussion des méthodes

Cette étude a porté sur une population de patients atteints d'emphysème très sévère, justifiant d'une intervention de réduction de volume chirurgicale ou d'une transplantation pulmonaire. L'emphysème étant défini par la disparition du parenchyme pulmonaire, il peut être argumenté que le choix d'une telle population de patients soit responsable d'un biais de sélection en ce sens que les cellules cultivées proviendraient de tissu fibreux résiduel, par ailleurs présent dans le poumon emphysemateux, et non des cloisons alvéolaires dont la disparition définit la pathologie. Cette question se pose particulièrement en ce qui concerne les prélèvements obtenus lors d'interventions de réduction de volume pulmonaire, dans le cadre desquelles les zones les moins fonctionnelles du poumon sont réséquées. De plus, il peut être soulevé que le conditionnement immunosuppresseur, associant corticothérapie générale à fortes doses et azathioprine, reçu par les patients subissant une transplantation pulmonaire, ait induit par un mécanisme toxique tout ou partie des anomalies observées. Des données recueillies lors du 2^e travail présenté dans le cadre de cette thèse soutiennent cependant que le phénotype des fibroblastes d'emphysème est distinct de celui des fibroblastes de poumon atteint de fibrose, et que le traitement immunosuppresseur administré aux patients n'ait eu que peu d'impact sur le phénotype des fibroblastes étudiés. Par ailleurs, il est possible que la sélection de patients atteints d'un emphysème moins sévère, ou l'utilisation de zones du poumon moins sévèrement atteintes ait conduit à l'obtention de résultats différents. De plus, la culture *ex vivo* de fibroblastes à partir d'un tissu implique un biais de sélection supplémentaire puisque seules les cellules capables de proliférer en dehors de leur environnement natif peuvent être étudiées dans des études de ce type. Enfin, il n'est pas possible à partir des données de cette étude de déterminer si les anomalies phénotypiques observées dans les cellules cultivées à partir de poumon emphysemateux correspondent à un glissement du phénotype de l'ensemble des fibroblastes pulmonaires, à la sélection par le processus pathologique d'une population fibroblastique particulière ou à ces deux phénomènes en association.

6.1.3.2.Discussion des résultats

Les principaux résultats de cette étude sont que les fibroblastes de poumon emphysemateux ont par rapport aux fibroblastes de poumon sain une capacité diminuée à produire et sécréter le HGF, et que leur sécrétion de KGF n'était pas stimulable par l'interleukine-1.

La faible expression du HGF que nous avons observé dans les fibroblastes de poumon emphysémateux explique pour partie l'absence de réparation et régénération alvéolaire au cours de cette maladie, compte tenu des propriétés régénératrices du HGF démontrées dans de nombreux organes et en particulier dans des modèles animaux d'emphysème pulmonaire¹⁶⁰. La démonstration directe que la basse expression du HGF par les fibroblastes joue un rôle causal dans la pathogénie de l'emphysème nécessiterait l'inactivation de ce gène dans les fibroblastes pulmonaires des animaux adultes. Des telles souris ne sont cependant pas disponibles.

Ce résultat est en contradiction apparente avec des données obtenues précédemment chez l'homme dans notre laboratoire. En effet, le contenu total en HGF et en ARNm du proHGF mesuré dans le broyat pulmonaire n'était pas différent de celui mesuré dans le poumon de sujets indemnes d'emphysème³⁰². La principale hypothèse pouvant être avancée pour expliquer cette disparité est la contribution probable des polynucléaires neutrophiles au contenu pulmonaire total en HGF. Les polynucléaires neutrophiles, qui produisent le HGF, sont effectivement présents en grand nombre dans le poumon emphysémateux, et il est d'ailleurs remarquable que la présence de ces cellules dans le poumon des malades soit associée à une sévérité moins grande de la maladie¹⁰⁶. Pour autant, considérant la localisation stratégique des fibroblastes pulmonaires situés à l'interface de l'épithélium alvéolaire et de l'endothélium capillaire, il est vraisemblable que les facteurs de croissance libérés par ces cellules jouent un rôle littéralement central pour le maintien de l'homéostasie alvéolaire, et qu'un apport compensatoire de HGF par des cellules majoritairement endo-alvéolaire telles que les polynucléaires neutrophiles ne puisse compenser un défaut de production de ce facteur par les fibroblastes.

Les mécanismes à l'origine du défaut de production de HGF par les fibroblastes d'emphysème restent méconnus. Nos résultats, s'ils ne permettent pas de les identifier, apportent tout au moins la notion qu'un excès d'espèces réactives de l'oxygène n'y contribue pas puisque l'exposition des cellules à la N-acétyl-cystéine, un chélateur des oxydants, diminuait en fait leur sécrétion de HGF. La sénescence précoce de ces cellules rapportée par de nombreux auteurs est également probablement hors de cause puisque dans un autre système expérimental l'induction de la sénescence de fibroblastes humains induit une augmentation de leur expression du HGF³⁰³.

L'observation d'une expression similaire du KGF à l'état basal par les fibroblastes d'emphysème par rapport aux fibroblastes de témoins renforce le caractère spécifique de la faible expression du HGF par ces mêmes cellules, et pourrait suggérer que le rôle du KGF soit moindre que celui du HGF au cours de l'emphysème. Cependant, la sécrétion de KGF par ces cellules n'était pas stimulable par l'interleukine-1, une cytokine pro-inflammatoire, alors que ce facteur induisait une augmentation de 76% de la sécrétion de KGF par les

fibroblastes de témoins. Compte tenu des propriétés à la fois cytoprotectrices et mitogènes du KGF, ce défaut d'induction de l'expression du KGF en réponse à l'IL-1 pourrait se révéler délétère à l'entretien de l'architecture tissulaire dans les conditions d'inflammation chronique qui sont rencontrées dans le poumon emphysémateux.

Enfin, dans l'hypothèse que les acides rétinoïques régulent différenciellement la sécrétion de HGF et de KGF par les fibroblastes de témoins et les fibroblastes de poumon emphysémateux, nous avons mesuré l'expression de HGF et KGF par ces cellules exposées à l'ATRA et à l'acide 9-cis rétinoïque. Dans ces expériences, alors que l'ATRA ne modifiait pas l'expression de ces facteurs, l'acide 9-cis rétinoïque diminuait la sécrétion de KGF par les fibroblastes de témoins mais non par les fibroblastes d'emphysème, suggérant une altération de la voie de réponse aux rétinoïdes dans ces dernières cellules.

Au total, ce travail a mis en évidence une diminution de l'ordre de 67% de la sécrétion du HGF, un facteur de croissance jouant un rôle essentiel au cours des phénomènes de régénération tissulaire, par les fibroblastes cultivés *in vitro* à partir de poumon emphysémateux par rapport aux fibroblastes de poumon sain. Ce résultat contribue à expliquer la perte de l'homéostasie alvéolaire au cours de l'emphysème.

6.2. Dérégulation de l'expression de l'élastine par les fibroblastes d'emphysème : Rôle de Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2

Plantier L, Rochette-Egly C, Goven D, Boutten A, Bonay M, Lesèche G, Fournier M, Crestani B, Boczkowski J

Dysregulation of elastin expression by fibroblasts in pulmonary emphysema : Role of Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2

Thorax 2008, Jul 11. [Epub ahead of print]. PMID: 18621984

6.2.1.Objectifs et méthodes

Après avoir montré lors du premier travail présenté dans cette thèse que les fibroblastes de poumon emphysémateux produisaient de façon faible ou non stimuable deux facteurs de croissance ciblant les cellules épithéliales et endothéliales de l'alvéole, nous avons suspecté qu'une dérégulation de la production de la matrice extracellulaire du poumon participe à l'altération des systèmes d'alvéologénèse et d'homéostasie alvéolaire dans ces cellules. Compte tenu d'une part du caractère spécifique du tissu pulmonaire de l'expression de l'élastine par les fibroblastes, et d'autre part de son induction lors de la période périnatale par l'acide rétinoïque, cette étude a été centrée sur la régulation par l'ATRA de l'expression de l'élastine par les fibroblastes pulmonaires obtenus par culture primaire à partir de poumon emphysémateux ou sain.

L'acide rétinoïque est un des acteurs majeurs du développement des alvéoles pulmonaires et participe également à leur homéostasie. En effet, les rats adultes soumis à un régime alimentaire carencé en vitamine A, le précurseur de l'acide rétinoïque, développent des lésions pulmonaires proches de celles de l'emphysème³⁰⁴. L'acide rétinoïque peut de plus induire la régénération alvéolaire dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase²⁸⁶. Pourtant, dans le cadre d'un essai thérapeutique prospectif effectué chez des patients atteints d'emphysème, et malgré l'obtention vérifiée de taux élevés de ce composé dans le sang des participants, l'acide rétinoïque administré par voie orale n'a pas obtenu d'amélioration morphologique ou fonctionnelle chez l'homme atteint d'emphysème.

Devant ces éléments, nous avons émis l'hypothèse qu'une altération de la voie de réponse à l'acide rétinoïque dans les fibroblastes pulmonaires obère l'expression de l'élastine par ces cellules et participe au défaut de régénération alvéolaire au cours de l'emphysème.

Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'expression de l'ARNm de l'élastine par les fibroblastes précédemment obtenus à partir de poumon emphysémateux ou sain, en

réponse à des concentrations croissantes d'ATRA. Par la suite, nous avons étudié l'expression des principaux composants de la voie de réponse à l'ATRA dans ces cellules. Enfin, à l'aide de la technique d'interférence ARN, nous avons reproduit dans une lignée de fibroblastes pulmonaires humains les anomalies de la voie de réponse à l'ATRA repérées dans les fibroblastes d'emphysème, afin de déterminer si une relation de cause à effet existait entre la présence de ces anomalies et une altération de l'induction de l'expression de l'élastine par l'ATRA.

Dysregulation of elastin expression by fibroblasts in pulmonary emphysema: role of cellular retinoic acid binding protein 2

L Plantier,^{1,2,3} C Rochette-Egly,⁴ D Goven,¹ A Boutten,^{1,5} M Bonay,^{1,6} G Lesèche,^{3,7} M Fournier,^{2,3} B Crestani,^{1,2,3} J Boczkowski^{1,8}

¹INSERM U700, Hôpital Bichat, Paris, France; ²Services de Pneumologie, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ³Université Paris 7, UFR médicale Denis Diderot, Faculté Bichat, Paris, France; ⁴Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France; ⁵Service de Biochimie A, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁶Service de Physiologie, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁷Service de Chirurgie Thoracique et Vasculaire, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁸CIC 07, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

Correspondence to: Dr L Plantier, Service de Pneumologie B, Hôpital Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75877, Paris Cedex 18, France; laurent.plantier@bch.aphp.fr

Received 14 November 2007
Accepted 7 June 2008
Published Online First
11 July 2008

ABSTRACT

Background: All-trans retinoic acid (ATRA) stimulates elastin synthesis by lung fibroblasts and induces alveolar regeneration in animal models of pulmonary emphysema. However, ATRA treatment has had disappointing results in human emphysema. It was hypothesised that a defect in the ATRA signalling pathway contributes to the defect of alveolar repair in the human emphysematous lung.

Methods: Fibroblasts were cultured from the lung of 10 control subjects and eight patients with emphysema. Elastin and retinoic acid receptor (RAR)- β mRNAs were measured in those cells in the presence of incremental concentrations of ATRA. RARs, retinoic X receptors (RXRs) and cellular retinoic acid binding protein (CRABP) 1 and 2 mRNAs were measured as well as CRABP2 protein content. The effect of CRABP2 silencing on elastin and RAR- β expression in response to ATRA was measured in MRC5 lung fibroblasts.

Results: ATRA at 10^{-9} M and 10^{-8} M increased median elastin mRNA expression by 182% and 126% in control but not in emphysema fibroblasts. RAR- β mRNA expression was induced by ATRA in control as well as emphysema fibroblasts. RARs, RXRs and CRABP1 mRNAs were similarly expressed in control and emphysema fibroblasts while CRABP2 mRNA and protein were lower in emphysema fibroblasts. CRABP2 silencing abrogated the induction of elastin but not RAR- β expression by ATRA in MRC5 fibroblasts.

Conclusion: Pulmonary emphysema fibroblasts fail to express elastin under ATRA stimulation. CRABP2, which is necessary for elastin induction by ATRA in MRC-5 cells, is expressed at low levels in emphysema fibroblasts. This alteration in the retinoic acid signalling pathway in lung fibroblasts may contribute to the defect of alveolar repair in human pulmonary emphysema. These results are the first demonstration of the involvement of CRABP2 in elastin expression.

in the lung is a stimulus for the alveogenesis phase of lung development³; secondly, all-trans retinoic acid (ATRA) induces the expression of elastin in lung fibroblasts⁴; thirdly, vitamin A deficiency leads to an emphysema-like phenotype in the lung of adult rats⁵; finally, the systemic administration of ATRA has been reported to abrogate elastase induced emphysema in adult rats and mice.^{6,7} Retinoic acid exerts its effects by binding two families of nuclear receptors, the retinoic acid receptors (RAR- α , β and γ) and the retinoid X receptors (RXR- α , β and γ), which translocate to the nucleus on binding where they act as transcription factors.⁸ The binding of retinoic acid to RARs and the transcriptional activity of RARs are greatly enhanced by a 15 kDa cytosolic protein, cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2).^{9–11}

In light of those elements, we hypothesised that an alteration in the retinoic acid signalling pathway might contribute to the defect of alveolar repair that is observed in human pulmonary emphysema. To explore this hypothesis, we focused on elastin production by lung fibroblasts. We first determined whether ATRA induced elastin and RAR- β mRNA expression in lung fibroblasts cultured ex vivo from human control and emphysematous lung samples. Then, expression of RAR- α , RAR- β , RAR- γ , RXR- α , RXR- β , RXR- γ , CRABP1 and CRABP2 was determined in those cells. As we found a selective reduction in CRABP2 expression in fibroblasts from emphysematous patients, we determined whether suppression of CRABP2 expression in lung fibroblasts using a siRNA strategy abolished the induction of elastin expression by retinoic acid.

MATERIALS AND METHODS

Lung samples

The study was approved by the ethics committee of Paris-Bichat University Hospital, Paris, France. Patients gave informed consent.

Emphysema patients

Fibroblasts were cultured from lung samples from eight patients with severe pulmonary emphysema undergoing lung volume reduction surgery ($n = 3$) or lung transplantation ($n = 5$). Median age of the patients was 58 years (interquartile range (IQR) 53, 58.5). All patients were smokers or ex-smokers (33 pack-years, IQR 30, 38) and had normal plasma α_1 antitrypsin levels. Emphysema was diagnosed in

Pulmonary emphysema is a chronic degenerative lung disease characterised by an imbalance between alveolar destruction and repair which results in the progressive destruction of pulmonary alveoli and chronic respiratory failure. Lung fibroblasts and myofibroblasts play a major role in the course of pulmonary repair processes,¹ notably through the secretion of elastin, an essential component of the pulmonary extracellular matrix.²

Signalling by retinoic acid, the main active metabolite of vitamin A, is of particular importance for the development, maintenance and repair of pulmonary alveoli, as assessed by the following arguments: firstly, elevation of retinoic acid levels

Table 1 Sequence of primers used for reverse transcription-PCR experiments

Gene	Forward primer	Reverse primer
Ubiquitin C	CACTTGGTCTCGCCTTGA	TTTTTGGGAATGCAACAACCTT
Elastin	GAGCTTTGCTGGAATCCCA	GGCAGTTTCCCTGTGGTGTAG
CRABP1	AGCCGCTACGGCACTTT	AATTTCGACGAGCTGCTGAAG
CRABP2	CAACAGGAGGAGACACTTCTAC	CTCCTCCCAACCTTGAAGTTA
RAR- α	CCTCTGGGACAAGTTCAGTCAACT	GTGCAGATCCGCAGCATCA
RAR- β	TTAAGATCGTGGAGTTTCTAAACG	GGGTAAAGCCGCTGAGAAAAGT
RAR- γ	GAGCCTGGGTTGGACTCTAAAAT	TCTCTAGTGTCTCTTTGTCTCTCA
RXR- α	AGGCGCTGAGGAGAGAAGGT	AGGAAGGTGTCAATGGGTGTGT
RXR- β	CGGTCCATTGGCCTTAAGTG	TCTCCATGAGGAAGGTGTGAT
RXR- γ	GGTCAACAGTGTGACAGTTCAGA	CGGGAGGTAGTTCATGTTTCCAATCCCG

CRABP, cellular retinoic acid binding protein; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoic X receptor.

the presence of an obstructive ventilatory disorder and overdistension on lung function tests associated with characteristic chest CT and histological findings, and the absence of any associated lung disease was verified. The median total lung capacity of patients with emphysema was 127% predicted (IQR 122, 129) and median forced expiratory volume in 1 s 28% predicted (IQR 18, 35).

Control patients

Fibroblasts were cultured from lung samples from 10 patients undergoing lung surgery for cancer. The age of the control subjects (68 years, IQR 65, 71) was not different from that of patients with emphysema ($p = 0.13$). Lung samples were taken from an uninvolved segment, and the absence of emphysema was verified microscopically. Five patients were active or past smokers (36 pack-years, IQR 30, 40) and five were never-smokers. The median total lung capacity of the control patients was 98% predicted (IQR 86, 114) and their median forced expiratory volume in 1 s was 90% predicted (IQR 75, 107).

Isolation of pulmonary fibroblasts

Pulmonary fibroblasts were cultured from lung explants, as previously described.¹² Fibroblasts were cultured with DMEM culture medium (Gibco/Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with 10% fetal calf serum (Fetalclone 2; Hyclone, Logan, Utah, USA), 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulphate and 0.25 µg/ml amphotericin B (Gibco/Invitrogen). Cells were maintained at 37°C with 5% CO₂, and were used at passage 5. To confirm the fibroblastic nature of cultured cells, all cell cultures were evaluated immunocytochemically at passage 5. All cells stained positive with anti-vimentin, anti-desmin and anti-prolyl-4-hydroxylase antibodies (DakoCytomation, Trappes, France). Three of the 10 control cultures and all emphysema cultures contained 5–10% of α smooth muscle actin positive cells. Staining with antibodies directed against smooth muscle myosin heavy chain-1, pancytokeratin and CD31 was always negative.¹²

Modulation of elastin and RAR- β mRNA expression by retinoic acid in pulmonary fibroblasts

Pulmonary fibroblasts (100 000/well) were seeded in 6 well plates and cultured to 80% confluence. They were then incubated with incremental concentrations of ATRA (10^{-9} M to 10^{-5} M) for 72 h. ATRA was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), and cells cultured with 1% DMSO were used as controls. Total RNA was extracted with the Nucleospin extraction system (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and reverse transcribed into complementary DNAs (cDNAs) with MMLV retro transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's

instructions. Quantitative real time PCR using a SybrGreen fluorochrome (Sigma, St Quentin-Fallavier, France) was performed with a Mx3000P thermocycler (Stratagene, La Jolla, California, USA) to quantify elastin and RAR- β cDNAs as well as ubiquitin C (UBC) cDNA as an endogenous control.¹⁸ cDNA copy numbers were expressed relative to a standard prepared from pooled lung fibroblast cDNAs that were used for all experiments. Amplification specificity was verified by agarose gel electrophoresis and melting curves.

Determination of the intracellular content of fibroblasts in RAR, RXR, CRABP1 and CRABP2 mRNA in the absence of stimulation
RAR- α , RAR- β , RAR- γ , RXR- α , RXR- β , RXR- γ , CRABP1 and CRABP2 mRNAs were quantified by reverse transcription-PCR in unstimulated control and emphysema fibroblasts, as described above. Primers sequences are listed in table 1.

Determination of the intracellular content of CRABP2 protein in fibroblasts

Fibroblasts at passage 5 were cultured to confluence in 75 cm² flasks (Corning, Schiphol-Rijk, The Netherlands). Cells were rinsed twice with phosphate buffered saline (Gibco/Invitrogen) and proteins were extracted with Cytobuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Madison, USA) according to the manufacturer's protocol. Cellular proteins (25 µg) were separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a PVDF membrane (Biorad, Marne-la-coquette, France) and incubated with a mouse monoclonal primary antibody binding CRABP2 (5CRA-3B3)¹⁴ diluted 1/1000 for 1 h at room temperature. A mouse monoclonal antibody binding β -actin (A-5316; Sigma) was used as an endogenous control. Detection was performed with peroxidase conjugated sheep anti-mouse (NA 931) and donkey anti-rabbit (NA934) antibodies and ECL reagent (Amersham, Little Chalfont, UK). The Bio-Vision system (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) was used for densitometric quantification of protein bands.

Modulation of elastin and RAR- β mRNA expression by retinoic acid in MRC-5 fibroblasts treated with a CRABP2 siRNA

In preliminary experiments, a decrease in the cellular content in CRABP2 protein was obtained only if cells were transfected at the time of seeding and grown in the continued presence of the siRNA and transfection reagents. As primary lung fibroblasts failed to grow in those conditions, the MRC-5 human lung fibroblast cell line (Eurobio, Les Ulis, France) was used to determine the role of CRABP2 in ATRA induced elastin expression.

MRC-5 cells were seeded at a density of 100 000 cells/well in 6 well culture plates. The same day, these cells were transfected

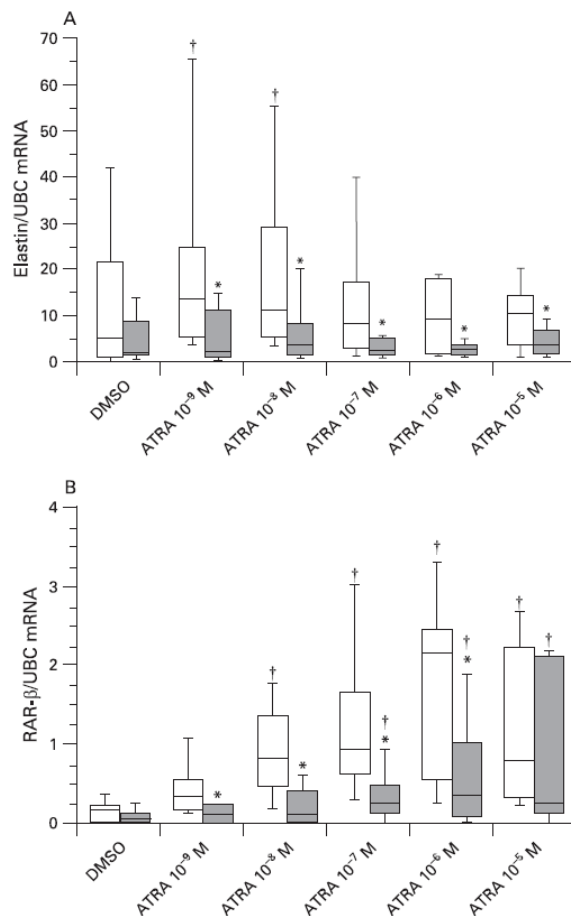


Figure 1 (A) Elastin and (B) retinoic acid receptor (RAR)- β mRNA expression in control (open boxes, $n = 10$) and emphysema (filled boxes, $n = 8$) fibroblasts treated with dimethylsulfoxide (DMSO) or increasing concentrations of all-trans retinoic acid (ATRA). * $p < 0.05$ between control and emphysema fibroblasts, Mann-Whitney's U-test; † $p < 0.05$ compared with DMSO, Wilcoxon's paired comparison. Box plots represent median, 25th and 75th percentiles and extreme values. UBC, ubiquitin C.

with either 20 nM of anti-CRABP2 siRNA (sense: 5'-GCG CAC CAC AGA GAT TAA CTT CAA G-3') or 20 nM scramble control RNA (sense 5'-GCG CAC CGA GAA TTA TTC ACA CAA G-3'; Stealth Technology, Invitrogen) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, and were incubated with 10% fetal bovine serum. Fresh medium, fetal bovine serum, RNAs and Lipofectamine 2000 were added every 3 days until cellular subconfluence was obtained. Transfected cells were then treated with incremental concentrations of ATRA, and elastin, RAR- β and UBC mRNAs were quantified as described above. The CRABP2 mRNA and protein content in siRNA and control RNA treated cells was determined by RT-PCR and western blotting, as described above.

Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile range (IQR), expressed as the values for the 25th and 75th centiles.

Differences between control and emphysema fibroblasts were determined using the Mann-Whitney U test. To compare the effect of retinoic acid on baseline conditions, we used the Friedman analysis of variance test, followed by Wilcoxon's paired test for group comparisons if a difference was detected. A p value < 0.05 was considered significant. In the figures, data are presented as box plots showing the median value, 25th and 75th centiles, and extreme values.

RESULTS

ATRA increased the elastin mRNA content of control but not emphysema fibroblasts

Elastin mRNA was detected in all cell cultures studied except two control fibroblast cultures. In the absence of stimulation, the elastin/UBC mRNA content of emphysema fibroblasts (1.97, IQR 1.21, 6.17) was not different from that of control fibroblasts (4.8, IQR 1.04, 19.8; $p = 0.47$).

In control fibroblasts, treatment with 10^{-9} M and 10^{-8} M ATRA induced 182% ($p = 0.01$) and 126% ($p = 0.028$) increases in the median elastin/UBC mRNA ratio, respectively. In emphysema fibroblasts, the elastin/UBC mRNA ratio was not modified by any concentration of ATRA (fig 1A). In the presence of ATRA at any concentration, the elastin/UBC mRNA ratio was superior in control compared with emphysema fibroblasts.

ATRA increased the RAR- β mRNA content of control and emphysema fibroblasts

In order to determine whether the absence of elastin mRNA induction by ATRA in emphysema fibroblasts was specific for the mechanisms governing ATRA induced elastin expression or was a result of a general deficiency in the retinoic acid signalling pathway, expression of RAR- β , which is induced by ATRA in fibroblasts,¹⁵ was determined in control and emphysema fibroblasts in the presence of ATRA.

RAR- β mRNA was detected in all but one control and one emphysema culture. In the absence of stimulation, the RAR- β mRNA content of emphysema fibroblasts was not different from that of control fibroblasts.

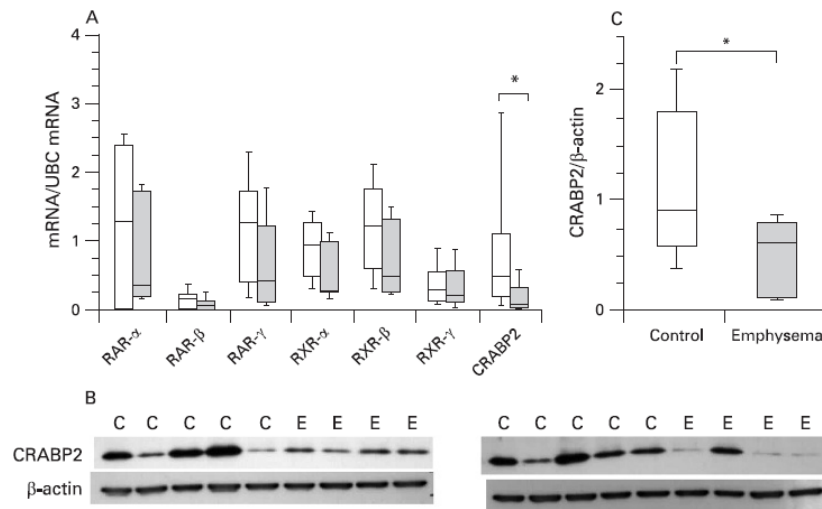
In control fibroblasts, ATRA at a concentration of 10^{-8} M and above induced an increase in the RAR- β mRNA content, reaching a maximum at 10^{-6} M with a median 13.5-fold increase ($p = 0.005$). In emphysema fibroblasts, though this effect was inferior to that observed in control fibroblasts, induction of RAR- β mRNA expression was also observed with ATRA at a concentration of 10^{-7} M and above, with a median 5.2-fold increase at 10^{-6} M ($p = 0.03$).

Low expression of CRABP2 mRNA and CRABP2 protein in emphysema fibroblasts

RAR- α , RAR- β , RAR- γ , RXR- α , RXR- β , RXR- γ and CRABP2 mRNAs were detected in all fibroblast lines. CRABP1 mRNA was not detected in these cells. The intracellular content in RAR- α , - β and - γ and RXR- α , - β and - γ mRNA was not different in control and emphysema fibroblasts, while the median intracellular content of control fibroblasts in CRABP2 mRNA was eight-fold superior to that of emphysema fibroblasts (fig 2A).

We determined by western blotting whether the inferior content in CRABP2 mRNA translated to inferior content in CRABP2 protein in emphysema fibroblasts compared with control fibroblasts. Median intracellular content of CRABP2 in emphysema fibroblasts in relation to that of β -actin (0.61, IQR

Figure 2 (A) Retinoic acid receptor (RAR)- α , RAR- β , RAR- γ , retinoic X receptor (RXR)- α , RXR- β , RXR- γ and cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) mRNA content in control (open boxes, $n = 10$) and emphysema (filled boxes, $n = 8$) fibroblasts in the absence of stimulation. UBC, ubiquitin C. (B) CRABP2 and β -actin protein expression in all of the control (C) and emphysema (E) fibroblasts examined, as determined by western blotting. (C) Quantitative analysis of CRABP2 protein expression reported to that of β -actin in control (open boxes, $n = 10$) and emphysema (filled boxes, $n = 8$) fibroblasts. * $p < 0.05$ between control and emphysema fibroblasts. Box plots represent median, 25th and 75th percentiles and extreme values.



0.58, 1.74) was lower than that of control fibroblasts (0.915, IQR 0.14, 0.79, $p = 0.05$) (fig 2B, C).

ATRA failed to induce elastin mRNA expression in MRC-5 fibroblasts treated with a siRNA targeting CRABP2 mRNA while RAR- β induction was preserved

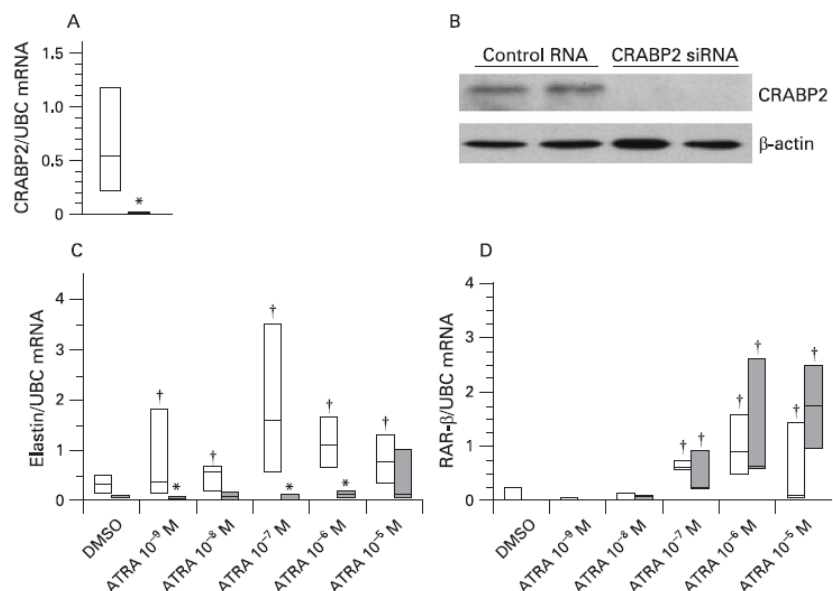
To determine whether the low expression of CRABP2 could explain the absence of elastin induction by ATRA, we tested whether CRABP2 gene silencing affected elastin and RAR- β induction by ATRA in the MRC-5 pulmonary fibroblast cell line.

Median CRABP2 mRNA was reduced by 97.6% in cells treated with the anti-CRABP2 siRNA compared with cells treated with the control RNA ($p = 0.045$, fig 3A). Median

content in CRABP2 protein of siRNA treated cells was reduced by 95.5% compared with that of control RNA treated cells ($p = 0.045$, fig 3B). The anti-CRABP2 siRNA had no additional cytotoxicity compared with the control RNA.

In MRC-5 fibroblasts treated with the control RNA, exposure to ATRA at all concentrations induced an increase in the median elastin/UBC mRNA ratio which reached a maximum of 511% at an ATRA concentration of 10^{-7} M. Induction of elastin gene expression by ATRA was completely abrogated in cells treated with the anti-CRABP2 siRNA (fig 3C). In the presence of ATRA at any concentration, the elastin/UBC mRNA ratio was superior in MRC-5 cells treated with the control RNA compared with cells treated with the anti-CRABP2 siRNA.

Figure 3 (A) Cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) mRNA content and (B) CRABP2 and β -actin protein content in MRC-5 fibroblasts in the presence of the scrambled control RNA and in the presence of the anti-CRABP2 siRNA. (C) Elastin mRNA and (D) retinoic acid receptor (RAR)- β mRNA in MRC-5 fibroblasts treated with the scrambled control RNA (open boxes, $n = 3$) and the anti-CRABP2 siRNA (filled boxes, $n = 3$) in the presence of increasing concentrations of all-trans retinoic acid (ATRA). * $p < 0.05$ between fibroblasts treated with the control RNA and the anti-CRABP2 siRNA, Mann-Whitney U test. † $p < 0.05$ compared with dimethylsulfoxide (DMSO), Wilcoxon's paired comparison. Boxes represent the median and extreme values. UBC, ubiquitin C.



In contrast, CRABP2 silencing did not abrogate the induction of RAR- β mRNA by ATRA in those cells. In siRNA as well as in control RNA treated cells, ATRA at a concentration of 10^{-7} M and above induced an elevation in the RAR- β mRNA content of cells (fig 3D).

DISCUSSION

The main results of this study are as follows: (1) retinoic acid induced elastin mRNA expression in control but not in emphysema lung fibroblasts while it induced RAR- β mRNA in both groups, (2) this discrepancy was associated with decreased levels of CRABP2 mRNA and protein in emphysema fibroblasts and (3) silencing of CRABP2 expression in the MRC5 human lung fibroblast cell line reproduced the phenotype of emphysema fibroblasts, as it resulted in the loss of elastin mRNA but not RAR- β induction by retinoic acid. These results are the first demonstration of the involvement of CRABP2 in elastin expression and strongly suggest that the lack of elastin induction by retinoic acid in emphysema fibroblasts is related to the low expression of CRABP2 in those cells.

In our experiments, *ex vivo* culturing of lung fibroblasts implicated selection bias towards cells able to proliferate outside of their normal environment. Moreover, whether the reduction in CRABP2 expression by cultured emphysema fibroblasts was related to a global reduction of its expression in lung fibroblasts in this disease or reflected the loss of a particular subgroup of CRABP2 expressing lung fibroblasts cannot be determined from our study. Interestingly, skin fibroblasts express different levels of CRABP2 depending on the site of their isolation, as subcutaneous fat fibroblasts express much lower levels of CRABP2 than their dermis derived counterparts.¹⁶ Regulation of CRABP2 expression is incompletely understood but seems to involve the RARs. However, alteration of this pathway seems unlikely in the present study as expression of RAR mRNAs was similar in fibroblasts from emphysematous and control patients. The AP-2 transcription factor¹⁷ and protein kinase C¹⁸ have also been involved in the regulation of CRABP2 expression, but their role in pulmonary emphysema is unknown. Whatever the mechanism of the reduced CRABP2 expression in fibroblasts from patients with emphysema, the present results are in line with previous reports showing that the phenotype of lung fibroblasts is deeply altered in the emphysematous lung, as those cells have been shown to express markers of cellular senescence,¹⁹ to have a reduced proliferation rate²⁰ and to secrete low amounts of hepatocyte growth factor, a key mitogen for alveolar epithelial cells,¹² while they fail to link the endothelial and epithelial compartments of the lung through direct intercellular contacts, as is observed in the normal lung.²¹

In our experiments, ATRA increased the elastin mRNA content in fibroblasts in a non-dose dependent manner as the maximal effect was observed at ATRA concentrations of 10^{-9} M in primary cells and 10^{-7} M in MRC-5 cells. We do not know the reason for this lack of a dose dependent effect. However, a similar phenomenon was described in human primary skin fibroblasts in which ATRA potentiated 8-bromo-cAMP induced hepatocyte growth factor. In those cells, the maximal effect of ATRA was obtained at a concentration of 10^{-7} M.²²

It may be argued that the different RAR- β mRNA expression that was observed between control and emphysema fibroblasts in the presence of 10^{-8} M to 10^{-6} M ATRA may have contributed to the different response of those cells to ATRA with regard to elastin expression. However, this hypothesis seems unlikely as RAR- β has been consistently shown to inhibit alveolar septation, of which elastin synthesis is an essential

step.^{23, 24} Moreover, in addition to the silencing experiments performed in MRC-5 cells, demonstration that CRABP2 deficiency accounted for the reduced elastin synthesis in emphysema fibroblasts would have been strengthened by the transfection of those cells with an expression vector that increases CRABP2 to the level of controls. This experiment could not be performed in this study as primary cells could not survive in the presence of the transfection reagents.

Elastic fibres, an essential component of the lung extracellular matrix as they provide the elasticity needed for cyclic ventilation, are extremely stable and undergo very limited renewal and remodelling in healthy individuals.²⁵ Their degradation is a hallmark of human emphysema²⁶ as well as of numerous animal models of this disease.^{27, 28} While elastic fibre repair has not been demonstrated to date in the human emphysematous lung, data obtained from animal studies point towards a potentially essential role of the lack of elastic fibre regeneration and repair in the constitution of emphysema lesions. Treatment of mice with beta-aminopropionitrile, a chemical inhibitor of elastin cross linking, leads to aggravated emphysema after elastase instillation,²⁹ while mice expressing low levels of elastin develop more severe emphysema than wild-type mice after exposure to cigarette smoke.³⁰ Thus from a pathophysiological point of view, demonstration that fibroblasts cultured from human emphysematous lung have an impaired capacity to express elastin mRNA under retinoic acid stimulation may help explain the defect in alveolar maintenance and repair in this disease. It must be noted that our study was limited to the exploration of elastin mRNA and that differences in the post-transcriptional regulation of elastin production may have been overlooked.

Given the beneficial effect of ATRA in animal models of emphysema, the therapeutic potential of this molecule was evaluated in human patients with emphysema. Disappointingly, a 3 month course of ATRA could not reverse the functional and morphological changes associated with emphysema, despite obtaining high plasma ATRA levels.³¹ Our results may provide an explanation for the lack of a therapeutic effect of ATRA in humans with emphysema as CRABP2, which is necessary for induction of elastin expression by retinoic acid, is lacking in pulmonary fibroblasts in those patients. Interestingly, ATRA induced alveologenesis seems to be strain dependent in mice,³² and it may be hypothesised that differences in CRABP2 expression in the lung between strains may contribute to this phenomenon. Whether synthetic CRABP2 independent retinoids would have a beneficial effect in pulmonary emphysema remains to be investigated.

Overall, our results indicate that low expression of CRABP2 is associated with loss of elastin gene expression by retinoic acid in fibroblasts cultured from human emphysematous lung, which may participate in the lack of alveolar repair and may help explain the lack of a therapeutic effect of ATRA in this disease.

Acknowledgements: We thank Dr Nadira Houhou (Service de Virologie, Hôpital Bichat) for kindly providing the MRC-5 cells used in this study.

Funding: LP was supported by a research fellowship from INSERM (Poste d'Accueil) and a grant from the Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF). JB was supported by INSERM and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Contrat d'Interface). Part of this project was supported by a grant from the Chancellerie des Universités (Legs Poix).

Competing interests: None.

Ethics approval: The study was approved by the ethics committee of Paris-Bichat University Hospital, Paris, France.

REFERENCES

1. **Plantier L**, Boczkowski J, Crestani B. Defect of alveolar regeneration in pulmonary emphysema: role of lung fibroblasts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;**2**:463–9.
2. **Hinz B**, Phan SH, Thannickal VJ, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;**170**:1807–16.
3. **Massaro GD**, Massaro D. Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol* 1996 Feb;**270**(2 Pt 1):L305–10.
4. **Liu B**, Harvey CS, McGowan SE. Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures. *Am J Physiol* 1993;**265**(5 Pt 1):L430–7.
5. **Baybutt RC**, Hu L, Molteni A. Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type II pneumocytes. *J Nutr* 2000;**130**:1159–65.
6. **Massaro GD**, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 1997;**3**:675–7.
7. **Ishizawa K**, Kubo H, Yamada M, et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett* 2004;**556**:249–52.
8. **Bastien J**, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004;**328**:1–16.
9. **Budhu AS**, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 2002;**22**:2632–41.
10. **Delva L**, Bastie JN, Rochette-Egly C, et al. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:7158–67.
11. **Manor D**, Schmidt EN, Budhu A, et al. Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. *Cancer Res* 2003;**63**:4426–33.
12. **Plantier L**, Marchand-Adam S, Marchal-Somme J, et al. Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;**288**:L641–7.
13. **Kim S**, Kim T. Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease. *Biotechniques* 2003;**35**:456–60.
14. **Gaub MP**, Lutz Y, Ghyselinck NB, et al. Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies. *J Histochem Cytochem* 1998;**46**:1103–11.
15. **Tsou HC**, Lee X, Si SP, et al. Regulation of retinoic acid receptor expression in dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994;**211**:74–81.
16. **Van den Bogaert AJ**, El Ghalbzouri A, Hensbergen PJ, et al. Differential expression of CRABP-II in fibroblasts derived from dermis and subcutaneous fat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**315**:428–33.
17. **McPherson LA**, Woodfield GW, Weigel RJ. AP2 transcription factors regulate expression of CRABP-II in hormone responsive breast carcinoma. *J Surg Res* 2007;**138**:71–8.
18. **Gimeno A**, Zaragoza R, Vina JR, et al. Vitamin E activates CRABP-II gene expression in cultured human fibroblasts, role of protein kinase C. *FEBS Lett* 2004;**569**:240–4.
19. **Muller KC**, Welker L, Paasch K, et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 2006;**7**:32.
20. **Holz O**, Zuhlke I, Jaksztat E, et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 2004;**24**:575–9.
21. **Sirianni FE**, Milaninezhad A, Chu FS, et al. Alteration of fibroblast architecture and loss of basal lamina apertures in human emphysematous lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;**173**:632–8.
22. **Takami Y**, Yamamoto I, Tsubouchi H, et al. Modulation of hepatocyte growth factor induction in human skin fibroblasts by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 2005;**1743**:49–56.
23. **Massaro GD**, Massaro D, Chan WY, et al. Retinoic acid receptor-beta: an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiol Genomics* 2000;**4**:51–7.
24. **Snyder JM**, Jenkins-Moore M, Jackson SK, et al. Alveolarization in retinoic acid receptor-beta-deficient mice. *Pediatr Res* 2005;**57**:384–91.
25. **Shapiro SD**, Endicott SK, Province MA, et al. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 1991;**87**:1828–34.
26. **Stone PJ**, Gottlieb DJ, O'Connor GT, et al. Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;**151**:952–9.
27. **Zhang X**, Shan P, Jiang G, et al. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest* 2006;**116**:3050–9.
28. **Houghton AM**, Quintero PA, Perkins DL, et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 2006;**116**:753–9.
29. **Kuhn C III**, Starcher BC. The effect of lathyrogens on the evolution of elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1980;**122**:453–60.
30. **Shifren A**, Durmowicz AG, Knutsen RH, et al. Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**292**:L778–87.
31. **Roth MD**, Connett JE, D'Armiento JM, et al. Feasibility of retinoids for the treatment of emphysema study. *Chest* 2006;**130**:1334–45.
32. **Stinchcombe SV**, Maden M. Retinoic acid induced alveolar regeneration: critical differences in strain sensitivity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;**38**:185–91.

Scadding-Morrison Davies Joint Fellowship in Respiratory Medicine 2009

This fellowship is available to support visits to medical centres in the United Kingdom or abroad for the purpose of undertaking studies related to respiratory medicine. Applications are invited from medical graduates practising in the United Kingdom, including consultants and irrespective of the number of years in that grade. **There is no application form** but a curriculum vitae should be submitted together with a detailed account of the duration and nature of the work and the centres to be visited, confirming that these have agreed to provide the facilities required. Please state the sum of money needed for travel and subsistence. A sum of up to £20 000 can be awarded to the successful candidate, or the sum may be divided to support two or more applications. Applications should be sent to Dr I A Campbell, Secretary to the Scadding-Morrison Davies Fellowship, Llandough Hospital, Penarth, Vale of Glamorgan CF64 2XX by 31 January 2009.

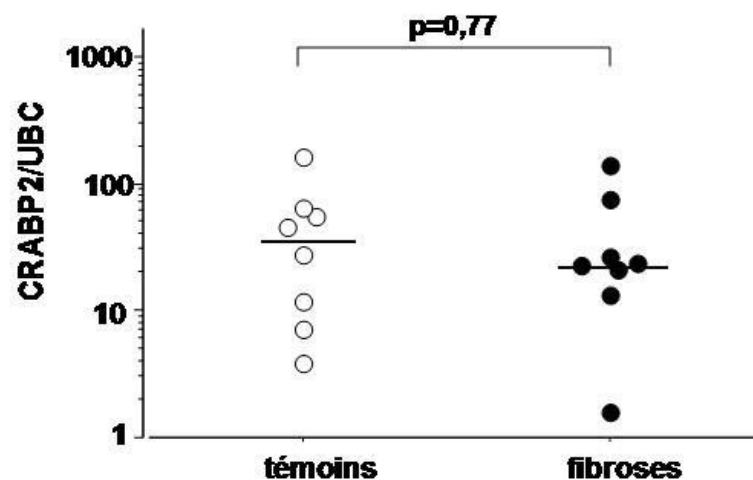
6.2.2. Résultats complémentaires

6.2.2.1. Expression de CRABP2 dans les fibroblastes de poumon atteint de fibrose pulmonaire idiopathique

Afin de préciser si les anomalies observées dans les fibroblastes d'emphysème étaient spécifiques ou non de l'emphysème par rapport à d'autres pathologies pulmonaires chroniques, ou si elles pouvaient être attribuées ou non aux conditions de prélèvement, en particulier dans le cadre des échantillons récupérés lors de transplantations pulmonaires, l'ARNm de CRABP2 a été quantifiée dans des fibroblastes pulmonaires cultivés à partir de poumon prélevé chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique au moment d'une transplantation pulmonaire³⁰⁵.

Dans ces expériences, l'expression de l'ARNm de CRABP2 était similaire dans les fibroblastes de poumon témoin et les fibroblastes de poumon atteint de fibrose idiopathique (figure 5), ce qui indique que le phénotype particulier des fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysemateux est bien spécifique de cette pathologie et ne peut être attribué au conditionnement immunosuppresseur reçu par les patients avant la transplantation pulmonaire.

Figure 5 : Expression de l'ARNm de CRABP2 par les fibroblastes de poumon sain (n=8) et les fibroblastes de poumon atteint de fibrose pulmonaire idiopathique (n=8), en l'absence de stimulation. * : $p < 0,05$



6.2.2.2. Expression de CRABP2 dans le poumon *in vivo*

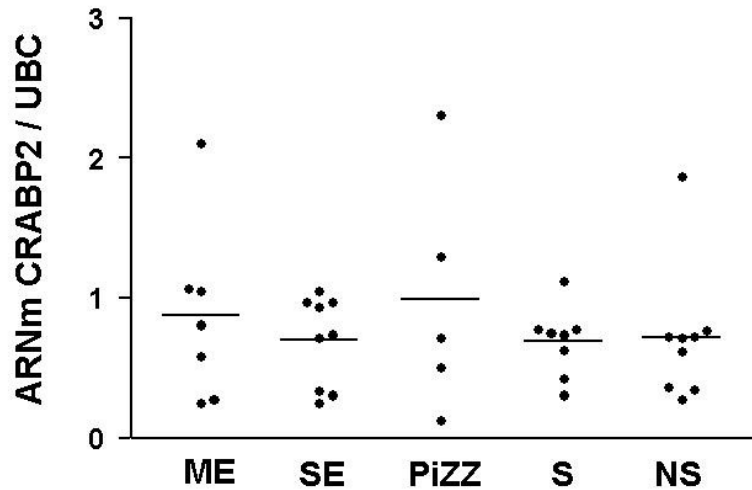
Nous avons cherché à déterminer si la faible expression de CRABP2 que nous avons observé dans les fibroblastes de poumon emphysémateux était un phénomène spécifique à ces cellules ou au contraire généralisé à l'ensemble du poumon. Pour répondre à cette question, nous avons d'abord mesuré le contenu pulmonaire total en ARNm de CRABP2 dans des échantillons de poumon recueilli au même moment que ceux utilisés pour la culture des cellules, immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Des échantillons provenant de patients atteints d'emphysème post-tabagique modéré ou sévère, d'emphysème par déficit en α -1-antitrypsine et de témoins fumeurs ou non ont été utilisés. Ensuite, l'expression de la protéine CRABP2 a été recherchée par immunohistochimie dans le poumon de patients atteints d'emphysème sévère et de patients témoins.

6.2.2.2.1. Expression de l'ARNm de CRABP2 dans l'homogénat de poumon total

L'expression de l'ARNm de CRABP2 a été mesurée par RTPCR quantitative dans des échantillons provenant de patients atteints d'emphysème post-tabagique modéré (n=7) ou sévère (n=9), d'emphysème par déficit en α -1-antitrypsine (n=5) et dans le poumon de témoins fumeurs (n=8) ou non fumeurs (n=9)³⁰².

Dans ces expériences, le niveau d'expression de l'ARNm de CRABP2 n'était pas différent d'un groupe à l'autre, comme représenté dans la figure 6.

Figure 6 : Expression de l'ARNm de CRABP2 dans le poumon de patients atteints d'emphysème post-tabagique modéré (ME) ou sévère (SE), d'emphysème par déficit en α -1-antitrypsine (PiZ) et dans le poumon de témoins fumeurs (S) ou non fumeurs (NS).

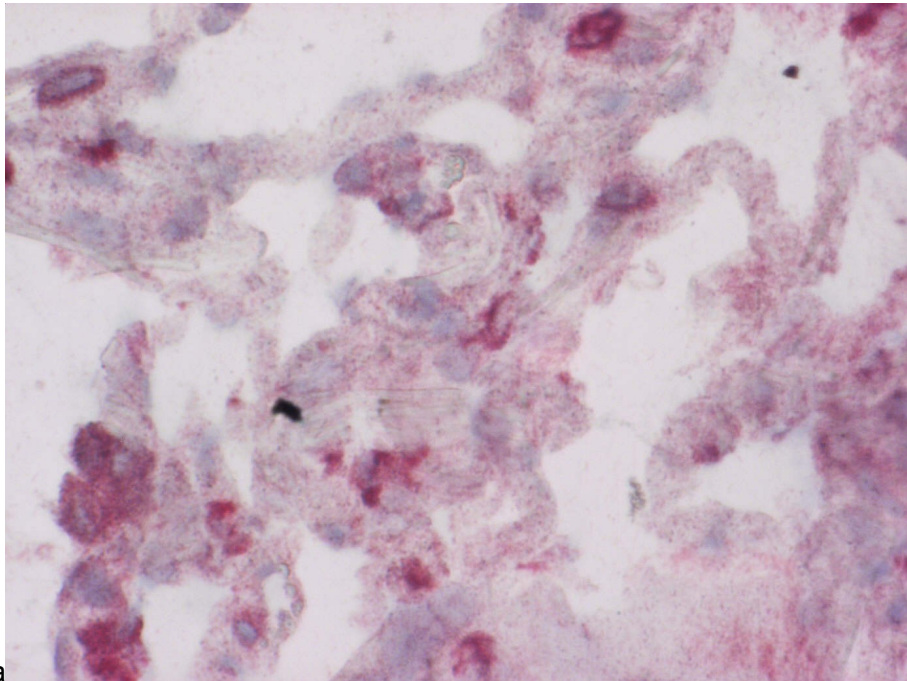


6.2.2.2.2. Détection de la protéine CRABP2 par immunohistochimie dans le poumon

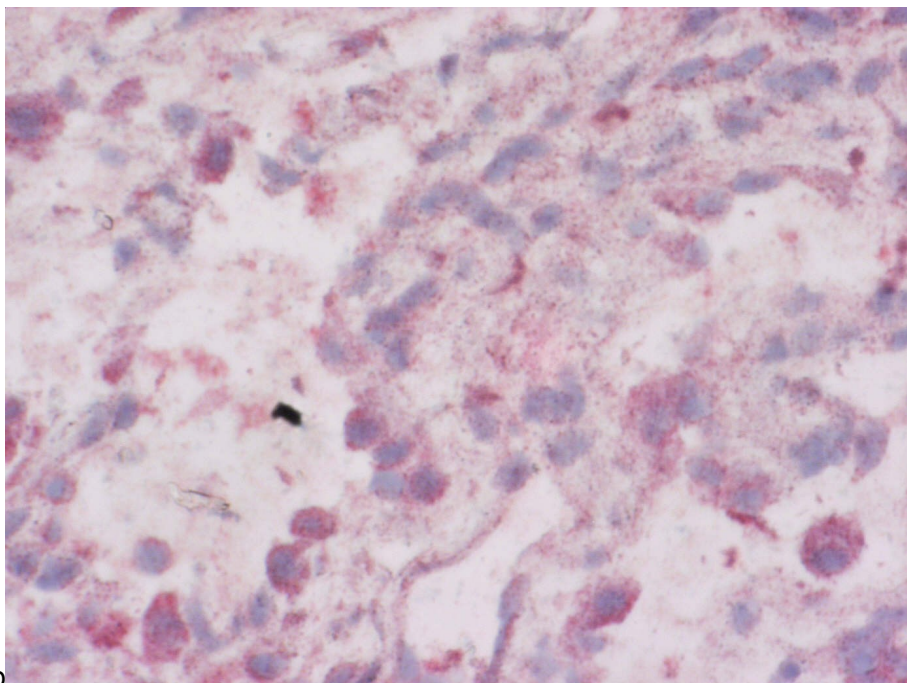
La protéine CRABP2 a été détectée par immunohistochimie sur des sections de poumon congelé provenant de 8 patients atteints d'emphysème post-tabagique sévère et de 9 patients indemnes d'emphysème. L'anticorps monoclonal anti-CRABP2 était appliqué à la dilution de 1/200 pendant une heure et révélé par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

CRABP2 était majoritairement exprimée dans le poumon sain comme dans le poumon emphysemateux par les macrophages alvéolaires et les pneumocytes de type 2 (figure 7a et 7b). Les fibroblastes étaient cependant marqués eux aussi. Il n'était pas possible de différencier l'intensité du marquage des fibroblastes par l'anticorps anti-CRABP2 entre les coupes de poumon sain et de poumon emphysemateux. Le poumon emphysemateux était caractérisé par une présence abondante de macrophages dans les espaces alvéolaires.

Figure 7a : Expression de CRABP2 détectée par immunohistochimie dans le poumon sain. CRABP2 est révélé en rouge. Figure 7b : Expression de CRABP2 dans le poumon emphysémateux. CRABP2 est révélé en rouge. Grossissement : X400.



7a



7b

6.2.3.Discussion

6.2.3.1.Discussion des méthodes

En dehors des questions en rapport avec les biais de sélection potentiels au niveau des groupes de patients ainsi qu'à celui des populations cellulaires obtenues par culture, discutées précédemment, les principales limites méthodologiques de ce travail sont d'une part la restriction au niveau de l'ARNm de l'étude de l'expression de l'élastine et d'autre part l'absence de surexpression expérimentale de CRABP2 dans les fibroblastes de poumon emphysémateux.

La mesure de l'expression de l'élastine par les fibroblastes reposait dans ce travail sur la quantification de son ARNm dans l'homogénat de ces cellules, et il est possible que des différences portant sur sa régulation post-transcriptionnelle aient été omises. Cependant, la mesure de l'expression de l'élastine au niveau de son ARNm est la plus utilisée dans la littérature^{247, 306}, notamment du fait que la quantification de l'élastine au niveau protéique est compliquée par l'existence de nombreuses formes de celle-ci. Bien que des auteurs aient rapporté la mise au point d'un système de quantification de la forme soluble de l'élastine, la tropo-élastine, sur le principe de l'ELISA³⁰⁷, ce dispositif n'est pas disponible sur le marché. Un kit de dosage colorimétrique de l'élastine soluble et insoluble est par ailleurs disponible sur le marché (Fastin assay, Carrickfergus, Royaume-Uni). Pour autant, la régulation de l'expression de l'élastine repose essentiellement sur des mécanismes transcriptionnels, notamment dans le poumon, *in vitro* et *in vivo*^{308, 309}.

Par ailleurs, les données présentées dans cet article ne permettent pas d'affirmer avec certitude que l'absence de stimulation de l'expression de l'élastine en réponse à l'ATRA dans les fibroblastes d'emphysème est en rapport avec l'expression faible de CRABP2 dans ces cellules. En effet, la démonstration formelle de ce point aurait nécessité l'observation d'une restauration du caractère stimuable de l'expression de l'élastine après le rétablissement d'un niveau d'expression de CRABP2 proche de celui des témoins. La réalisation de cette expérience n'a cependant pas été possible du fait de la cytotoxicité des réactifs de transfection disponibles sur le marché. Dans des expériences préliminaires, l'exposition à la Lipofectamine des fibroblastes pulmonaires obtenus par culture primaire entraînait très rapidement le décollement de la monocouche cellulaire. Pour autant, les résultats présentés, s'ils ne permettent pas de l'affirmer formellement, suggèrent fortement qu'il existe une relation de cause à effet entre l'absence d'induction de l'expression par l'ATRA dans les fibroblastes de poumon emphysémateux comme cela a été démontré en conditions expérimentales dans la lignée MRC-5.

6.2.3.2. Discussion des résultats

6.2.3.2.1. Synthèse des résultats

Les principaux résultats de ce travail sont 1) que l'ATRA induisait l'expression de l'ARNm de l'élastine par les fibroblastes provenant de poumon sain mais non par les fibroblastes de poumon emphysémateux, alors qu'il induisait l'expression de RAR- β dans les deux groupes, 2) que cette différence était associée à une faible expression par les fibroblastes d'emphysème de CRABP2, 3) que la répression de l'expression de CRABP2 dans une lignée de fibroblastes pulmonaires humains reproduisait le phénotype des fibroblastes d'emphysème et 4) que la faible expression de CRABP2 dans le poumon emphysémateux était limitée aux fibroblastes cultivés *in vitro* et n'était pas observable dans le poumon total. Ces résultats sont la première démonstration de l'implication de CRABP2 dans le contrôle de l'expression de l'élastine par les fibroblastes pulmonaires et suggèrent fortement que l'absence d'induction de l'expression de l'élastine par l'ATRA dans les fibroblastes de poumon emphysémateux soit due à leur faible expression de CRABP2.

6.2.3.2.2. CRABP2 est nécessaire à l'induction par l'ATRA de l'expression de l'élastine mais non de RAR- β dans les fibroblastes pulmonaires

Nos données obtenues aussi bien dans les cellules primaires que dans la lignée MRC-5 démontrent le rôle central joué par CRABP2 dans l'induction par l'ATRA de l'expression de l'élastine par les fibroblastes pulmonaires. Inversement, CRABP2 n'est pas nécessaire à l'induction de l'expression de RAR- β par ces cellules. Ce résultat est en contradiction avec ceux rapportés par d'autres équipes dans d'autres types cellulaires. Par exemple, CRABP2 est nécessaire à l'induction de l'expression de RAR- β dans les lignées de cellules myéloïdes HL-60 et NB-4²⁴⁴. Cette discordance souligne le caractère variable des effets de l'ATRA d'un type cellulaire à un autre, dont les mécanismes commencent à être décrits³¹⁰.

6.2.3.2.3. Faible expression de CRABP2 dans les fibroblastes de poumon emphysémateux

CRABP2 était faiblement exprimée dans les fibroblastes de poumon emphysémateux. Cette différence pourrait correspondre à une baisse globale de l'expression de CRABP2 dans les fibroblastes du poumon ou à la sélection d'une population de fibroblastes exprimant peu CRABP2, témoignant de la perte dans le poumon emphysémateux d'une population de fibroblastes exprimant fortement CRABP2 et jouant peut-être un rôle important dans les

processus de réparation tissulaire et d'alvéologénèse. En faveur de cette hypothèse, il a été rapporté que les fibroblastes de la peau expriment différemment CRABP2 selon leur localisation, les fibroblastes du derme exprimant fortement CRABP2 et les fibroblastes de l'hypoderme l'exprimant faiblement³¹¹.

Un certain nombre de médiateurs régulant l'expression de CRABP2 ont été identifiés, ayant pour certains une spécificité d'organe. Elle est augmentée dans les fibroblastes de peau par l'ATRA via l'activation des RAR³¹² et la vitamine E via la protéine kinase C³¹³, ainsi que par les facteurs de transcription de la famille AP2 dans les cellules épithéliales mammaires³¹⁴ et le 17- β -oestradiol dans les cellules endométriales³¹⁵. Elle est réprimée au niveau des neurones par TIS-7 (TPA-inducible sequence 7), un co-répresseur transcriptionnel³¹⁶ et dans les cellules souches de souris par le Leukemia Inhibitory Factor³¹⁷.

6.2.3.2.4. La faible expression de CRABP2 était limitée aux fibroblastes cultivés *in vitro* à partir de poumon emphysémateux

Il existe une discordance entre d'une part la diminution nette de l'expression de CRABP2 observée dans les fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysémateux par rapport à ceux cultivés à partir de poumon sain et d'autre part l'expression similaire de l'ARNm de CRABP2 dans le poumon total dans les deux groupes de patients. Les données recueillies lors des expériences d'immunomarquage permettent cependant d'avancer une hypothèse pour expliquer ce phénomène. Ainsi, il est possible que la présence en grand nombre dans le poumon emphysémateux de macrophages, qui expriment fortement CRABP2, compense la perte d'expression de CRABP2 au niveau des fibroblastes, aboutissant *in fine* à un contenu pulmonaire total en ARNm de CRABP2 similaire d'un groupe à l'autre. Cependant, si CRABP2 était détectable dans les fibroblastes observés *in situ* dans le poumon sain et dans le poumon emphysémateux, il n'était pas possible de déterminer par immunohistochimie une différence dans son niveau d'expression par ces cellules.

Au total, ce travail rapporte un défaut d'induction de l'expression de l'élastine, constituant essentiel de la matrice extracellulaire du poumon, par les fibroblastes pulmonaires, cellules-clés du développement et de l'homéostasie alvéolaire, en réponse à l'ATRA, médiateur central de l'alvéologénèse, au cours de l'emphysème pulmonaire. Ce phénomène contribue probablement à la perte progressive d'alvéoles pulmonaires qui définit cette maladie.

7. Résultats *in vivo*

7.1. Le KGF prévient l'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase chez la souris

Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, Bachoual R, Mailleux A, Boczkowski J, Crestani B.

Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema

in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Nov;293(5):L1230-9. Epub 2007 Aug 31.

PMID: 17766584

7.1.1. Objectifs et méthodes

Comme le HGF, le KGF est un puissant mitogène pour les cellules épithéliales alvéolaires jouant un rôle important au cours du développement pulmonaire et impliqué au cours des phénomènes de réparation et d'expansion épithéliales. Nous avons rapporté au cours du premier travail présenté dans ce mémoire une dérégulation de la production et de la sécrétion de ces deux facteurs par les fibroblastes de poumon emphysémateux humain. La sécrétion de HGF par les fibroblastes de poumon emphysémateux était réduite par rapport à celle des fibroblastes de poumon sain. La sécrétion de KGF par les fibroblastes de poumon emphysémateux, si elle était similaire à celle des fibroblastes de poumon sain en l'absence de stimulation, n'était pas stimulable. Les propriétés régénératrices du HGF ont été rapportées par d'autres auteurs dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase¹⁶⁰. Le rôle du KGF dans l'emphysème pulmonaire n'a jamais été exploré *in vivo*. Partant du postulat que le défaut d'expression de KGF par les fibroblastes pulmonaires jouerait un rôle dans la constitution des lésions s'emphysème, nous avons émis l'hypothèse que l'apport exogène de KGF pourrait avoir un effet protecteur vis-à-vis de l'emphysème, voire entraîner la régénération des structures alvéolaires une fois celui-ci constitué. Pour répondre à cette question, le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase chez la souris a été utilisé. Des animaux ayant reçu une instillation trachéale unique de sérum physiologique ou d'élastase ont été traités par le KGF recombinant humain durant les trois jours précédant l'instillation trachéale, dans l'hypothèse que le KGF exerce un effet protecteur dans ce modèle, ou du 20^e au 28^e jour suivant l'instillation, dans l'hypothèse que le KGF induise la régénération des alvéoles pulmonaires. Un troisième groupe d'animaux a été traité par le KGF durant les 8 jours faisant immédiatement suite à l'instillation trachéale.

Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice

Laurent Plantier,^{1,2,3} Sylvain Marchand-Adam,^{1,2,3} Valeria G. Antico,⁴ Laurent Boyer,¹ Cécile De Coster,¹ Joëlle Marchal,¹ Rafik Bachoual,¹ Arnaud Mailleux,⁵ Jorge Boczkowski,^{1,6} and Bruno Crestani^{1,2,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U700, Faculté Xavier Bichat, ²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Pneumologie, Hôpital Bichat, and ³Université Paris 7, Unité de Formation et de Recherche Médicale Denis Diderot, Faculté Bichat, Paris, France; ⁴Laboratory of Oxygen Metabolism, University Hospital, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ⁵Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; and ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CIC 07, Hôpital Bichat, Paris, France

Submitted 21 November 2006; accepted in final form 24 August 2007

Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, Bachoual R, Mailleux A, Boczkowski J, Crestani B. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L1230–L1239, 2007. First published August 31, 2007; doi:10.1152/ajplung.00460.2006.—Pulmonary emphysema is characterized by persistent inflammation and progressive alveolar destruction. The keratinocyte growth factor (KGF) favorably influences alveolar maintenance and repair and possesses anti-inflammatory properties. We aimed to determine whether exogenous KGF prevented or corrected elastase-induced pulmonary emphysema in vivo. Treatment with 5 mg·kg⁻¹·day⁻¹ KGF before elastase instillation prevented pulmonary emphysema. This effect was associated with 1) a sharp reduction in bronchoalveolar lavage fluid total protein and inflammatory cell recruitment, 2) a reduction in the pulmonary expression of the chemokines CCL2 (or monocyte chemoattractant protein-1) and CXCL2 (or macrophage inflammatory protein-2α) and of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1, 3) a reduction in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity at day 3, and 4) a major reduction in DNA damage detected by terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) in alveolar cells at day 7. Treatment with KGF after elastase instillation had no effect on elastase-induced emphysema despite the conserved expression of the KGF receptor in the lungs of elastase-instilled animals as determined by immunohistochemistry. In vitro, KGF abolished the elastase-induced increase in CCL2, CXCL2, and ICAM-1 mRNA in the MLE-12 murine alveolar epithelial cell line. We conclude that KGF pretreatment protected against elastase-induced pulmonary inflammation, activation of MMPs, alveolar cell DNA damage, and subsequent emphysema in mice.

inflammation; chronic obstructive pulmonary disease

SINCE THE FORMULATION of the elastase/antielastase imbalance hypothesis in 1964, considerable progress has been made in deciphering the mechanisms involved in the degradation of alveoli in the course of pulmonary emphysema. Our general hypothesis is that beside the excessive injury of alveolar structures, a defect in alveolar maintenance systems is implicated in this disease, and that the modulation of the normal pathways of lung repair could be an interesting therapeutic option for emphysema.

Lung fibroblasts play a key role in alveolar homeostasis, notably through their interaction with the other resident cells of

the lung. Growth factors secreted by fibroblasts have been shown to participate in those regulatory events. Among those factors, the keratinocyte growth factor (KGF), also known as fibroblast growth factor-7, promotes survival and induces proliferation, migration, and differentiation of cells that express its receptor. In the lung, the main targets of KGF are alveolar type 2 cells (25).

KGF is overexpressed in the lung in response to alveolar injury (24) and contributes to the preservation of alveolar structures in this context. Indeed, low levels of KGF in the lungs of neonates with hyaline membrane disease are associated with the further development of bronchopulmonary dysplasia, a disease that, like emphysema, is characterized by the enlargement of the distal airspaces of the lung (4). By contrast, supplemental exogenous KGF is protective in different models of acute or chronic lung injury (27). Altogether those data indicate that KGF plays an important role in protecting the injured lung from structural alteration.

In view of these data, we suspected that the levels of endogenous KGF in the emphysematous lung may not be sufficient to protect alveoli against chronic aggression. In support of this hypothesis, we observed that levels of KGF were not increased in the human emphysematous lung compared with normal lung in humans (3), and that secretion of KGF was deregulated in fibroblasts cultured from emphysematous lung samples (20). We hypothesized that the elevation of lung KGF levels may represent a new therapeutic option for emphysema. Therefore, the aim of this study was to determine whether the administration of exogenous KGF would prevent or reverse elastase-induced emphysema in mice and to explore the molecular mechanisms involved in its effect.

MATERIALS AND METHODS

Animal model. Studies were conducted in eight-week-old male C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France), in compliance with Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) guidelines regarding the fair treatment of animals, under a license from the French administration to conduct animal research as described in the protocol. Mice were anesthetized with ketamine (1.6 mg; Merial, Lyon, France) and xylazine (300 µg; Bayer, Puteaux, France).

In a first set of experiments, we evaluated whether KGF prevented elastase-induced emphysema. Naive mice did not receive any instillation. Saline mice received a tracheal instillation of 50 µl of saline.

Address for reprint requests and other correspondence: B. Crestani, Service de Pneumologie, Hôpital Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75877, Paris Cedex 18, France (e-mail: bruno.crestani@bch.aphp.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Elastase mice received 100 μ l/day saline subcutaneously for 3 days before the instillation of 5 U of porcine pancreatic elastase (Elastin Products, Owensville, MO) in 50 μ l of saline into the surgically exposed trachea. KGF+Elastase mice received 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ recombinant human KGF (Amgen, Thousand Oaks, CA) in 100 μ l of saline subcutaneously for 3 days before elastase instillation. For the determination of emphysema by computerized morphometry, 20 days after tracheal instillation mice were anesthetized with 50 mg of intraperitoneal halothane (Sigma, St-Quentin-Fallavier, France), and their lungs were removed. For the determination of the mechanisms involved in the effect of KGF, other mice were anesthetized in a similar way, and their lungs were removed for further analysis at the 6th hour and 1, 3, 7, and 20 days after instillation.

In a second set of experiments, a curative effect of KGF was sought in mice treated with KGF or its vehicle from day 0 to day 7 after elastase instillation and killed at day 20 and in mice treated with KGF or its vehicle from day 20 to day 27 after elastase instillation and killed at day 27. Five mice were used in each group unless otherwise described.

The concentration of bacterial endotoxin in the elastase preparation determined with the Lonza-Biowhittaker KQCL endotoxin test (Lonza France, Levallois-Perret, France) was 0.21 U/ml, below the 0.25 U/ml limit accepted under European Pharmacopeia rules.

Morphological analysis. The lungs were fixed with 2.5% glutaraldehyde at a transpleural pressure of 25 cmH_2O for 3 h and held in 4% paraformaldehyde (Sigma). Great-axis sagittal sections (5 μ m) of the left lung were cut in a systematic fashion and were stained with hematoxylin and eosin. Five black-and-white digital photomicrographs were acquired from the cranial, medial, and caudal regions of each slide at $\times 100$ magnification, excluding areas where large bronchi or vessels predominated, resulting in a total of 15 images per lung. Emphysema was then quantified by measurement of the mean chord length of alveoli (29) with Analysis software (Soft Imaging System, Münster, Germany) at a 5- μ m interval. This automated analysis was made vertically and horizontally on each photomicrograph. The analysis was performed in duplicate by two blinded observers (L. Plantier, R. Bachoual), resulting in a total of $\sim 900,000$ – $1,500,000$ measurements per slide. The mean chord length of alveoli was obtained by averaging those measurements.

Bronchoalveolar lavage fluid. The lungs were lavaged with 2 ml of saline, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was centrifuged at 300 g for 15 min. The supernatant was stored at -20°C until analysis, and cells were differentially counted with Diff-Quick stain (Baxter-Dade, Duding, Germany). Protein concentrations were determined with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Mame-La-Coquette, France). The concentrations of CCL2 [also known as monocyte chemoattractant protein (MCP)-1] and CXCL2 [also known as macrophage inflammatory protein (MIP)-2 α] were determined by ELISA (R&D Systems, Lille, France).

Zymography. For gelatin zymography, 5 μ l (6th hour time point) or 20 μ l (other time points) of BALF was electrophoresed onto 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml bovine gelatin (Sigma). Sodium dodecyl sulfate was removed from the gels by shaking in 2.5% Triton X-100 (Sigma) twice for 1 h. The gels were then incubated for 2 days at 37°C in pH 7.5 50 mM Tris-HCl with 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2 , and 150 μM NaN_3 . For elastin zymography, samples were electrophoresed onto 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml bovine soluble elastin (Elastin Products) and were incubated likewise for 5 days. Proteolysis bands were visualized by Coomassie staining and were quantified with the Bio-Vision system (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

RNA extraction and quantitative RT-PCR. RNA was extracted from lung homogenate with TRIzol reagent and was retrotranscribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNAs (cDNAs) were quantified by quantitative PCR (94°C for 30 s, 60°C for 1 min, 40 cycles) with SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix (Sigma). The quantity of CCL2, CXCL2, elastin, collagen-1 α 1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, -2, -3, and -4 cDNAs was compared with that of a standard prepared from pooled mouse lung RNA. Likewise, the amount of the endogenous control ribosomal protein (RP)L13 cDNA was measured in samples and compared with the standard. The expression of a specific gene in a given sample was then determined by the following formula: gene expression = (gene of interest in sample/gene of interest in standard)/(RPL13 in sample/RPL13 in standard). Primer sequences are listed in Table 1.

TUNEL assay. The lungs were insufflated ex vivo with 1 ml of a 1:1 mix of 0.9% saline with Tissue-Tek ornithine carbamoyltransferase fluid (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands) and were snap-frozen in liquid nitrogen. Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was performed on 5- μ m acetone-fixed slides of frozen lung with the DeadEnd System (Promega, Madison, WI). The number of TUNEL-positive nuclei was counted by a blinded observer (L. Plantier), compared with the total number of nuclei on five random fields taken at $\times 400$ magnification, and expressed as a percentage.

Immunohistochemistry for activated caspase-3. The expression of activated caspase-3, a marker of apoptosis, was determined by immunohistochemistry on frozen and acetone-fixed lung slides. The rabbit primary antibody (ref. 9664, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) was diluted 1:100 and incubated overnight at 4°C . Staining was revealed with a biotinylated anti-rabbit antibody (BA-1000, Vector, Burlingame, CA), Vectastain complex (Vector), and fast red substrate (Dako Cytomation).

Table 1. Sequences of primers used for quantitative PCR experiments

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
RPL13	GTGGTCCCTGCTGCTCCAA	CGATAGTGCATCTTGGCCTTTT
CCL2	CGGGCTTTGAATGTGAAGTTGACCCG	AGTGCTTGAGGTGGTTGTGGAA
CXCL2	CTTCAAGAACATCCAGAGCTTGAGT	CTTTGTTTCAGTATCTTTTGATGATTTTC
Collagen-1 α 1	CCAGTGGCGGTTATGACTTCA	GCTGCGGATGTTCTCAATCTG
Elastin	TGGTGACATGATCCCTCTCTCTT	CAGTGTGAGGAGCCATCTGACT
TIMP-1	CACTGCACAAGTCCCAGAACCGCAGTG	AGTACGCCAGGGGAACCAAGAAG
TIMP-2	GGCAGAGCTTTATCACTAACAA	GAACATTACAGGCTACCCAGAC
TIMP-3	TCCTAATATGGCGCTCCTGATC	CCTCATACTTAGGCCTCACCTCA
TIMP-4	AGATTCTCAGTGATGGAAGTCTTCAT	GGTACATGGCACTGCATAGCAA
ICAM-1	CGGAACATCACCGTGATTTCGTTCCG	GTGAGGTCTTGCCTACTTGCTG
VCAM-1	CGTAGTGGCCCTCACTTGACGACTACG	GGGCTGTCTATCTGGGTTCTCC

RPL13, ribosomal protein L13; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

Immunohistochemistry for KGF receptor. The KGF receptor was detected by immunohistochemistry on frozen lung slides with a goat anti-KGF receptor antibody diluted 1:16 (sc-122G, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) applied for 1 h at room temperature, a biotinylated anti-goat antibody (BA-9500, Vector), Vectastain complex (Vector), and fast red substrate (Dako Cytomation). Five hundred cells, excluding cells from large vessels or bronchi, were examined, and the number of cells showing expression of the KGF receptor was expressed as a percentage.

In vitro experiments. The MLE-12 murine alveolar epithelial cell line (LGC promochem, Molsheim, France) was cultured in 12-well plates at 37°C and 5% CO₂ in DMEM-F-12 culture medium supplemented with 0.005 mg/ml insulin, 0.01 mg/ml transferrin, 30 nM sodium selenite, 10 nM hydrocortisone, 10 nM β -estradiol, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and 4% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT). Cells were grown to 80% confluence, deprived of serum for 12 h, and incubated for 18 h in medium alone or in the presence of 5 U/ml porcine pancreatic elastase, 100 ng/ml KGF, or both. RNA was extracted with the RNeasy system (Macherey-Nagel, Hoerdt, France), and CCL2, CXCL2, ICAM-1, and VCAM-1 mRNAs were quantified as described above.

Statistical analysis. Data are expressed as means $\pm$ SE and were analyzed with Statview 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC). Data comparisons between experimental groups at each time point were analyzed with the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney U-test. *P* values <0.05 were considered significant.

RESULTS

KGF pretreatment prevented elastase-induced emphysema.

Intratracheal instillation of elastase induced pulmonary emphysema (Fig. 1). Mice from the Elastase group had diffuse emphysema lesions, and their mean chord length (63.8 ± 5.9 μ m, *n* = 8) was markedly increased compared with the Saline group (46.1 ± 0.6 μ m, *n* = 5; *P* = 0.02). By contrast, the lungs of most mice from the KGF+Elastase group showed only

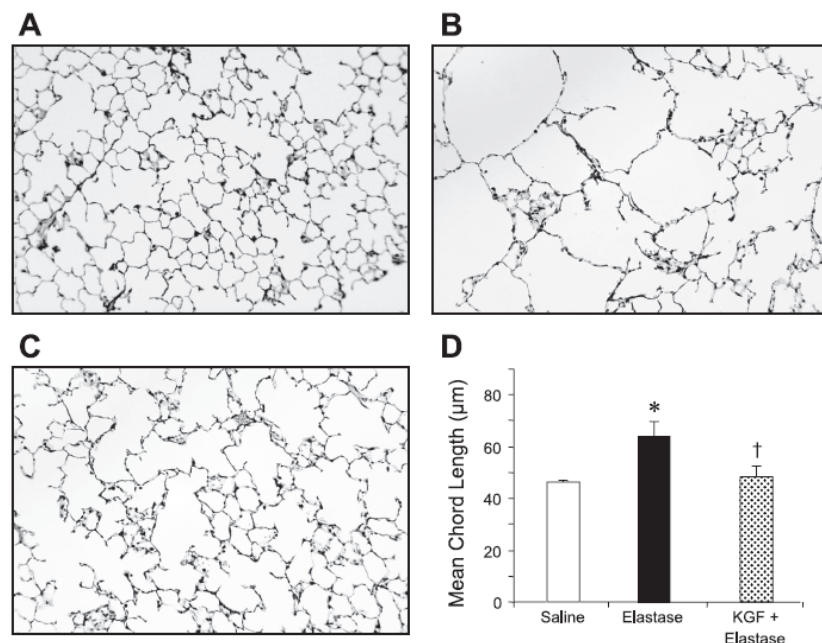
minimal and focal emphysematous changes. The mean chord length of KGF+Elastase mice (48.5 ± 4 μ m, *n* = 9) was lower than that of Elastase mice (*P* = 0.009) and was not different from that of Saline animals.

KGF prevented elastase-induced elevation in BALF proteins. The total protein concentration in BALF was determined to assess the degree of elastase-induced injury in the lung. A sharp increase in BALF proteins was observed in the Elastase group from the 6th hour to day 3 (Fig. 2A), reaching 742.5 ± 241.5 μ g/ml at day 3. In the KGF+Elastase group, BALF proteins were lower than in Elastase animals at the 6th hour (*P* = 0.008) and at day 3 (*P* = 0.02) after instillation, with the reduction reaching 75% at day 3.

KGF prevented elastase-induced influx of inflammatory cells in BALF. A sharp increase in BALF cellularity was observed in the Elastase group compared with the Saline group from the 6th hour to day 3 and at day 20 (Fig. 2B), with a maximum at the 6th hour (7-fold increase; *P* = 0.009). BALF cellularity in the KGF+Elastase group was markedly reduced compared with Elastase mice at the 6th hour (65% reduction; *P* = 0.014) and at day 3 (58% reduction; *P* = 0.014).

The composition of the inflammatory cell influx in BALF varied with time after elastase instillation. While neutrophils were very rare in BALF of animals from the Saline group at all time points, they formed the main fraction of BALF cells at the 6th hour after elastase instillation, with their numbers decreasing thereafter (Fig. 2C). KGF prevented the elastase-induced influx of neutrophils in BALF. Neutrophil numbers in BALF of mice from the KGF+Elastase group were reduced by 75% at the 6th hour (*P* = 0.014), 47% at day 1 (*P* = 0.021), and 83% at day 3 (*P* = 0.014) compared with mice from the Elastase group. Macrophage numbers increased in BALF of Elastase mice from the 6th hour to day 3 and at day 20 and were the

Fig. 1. Keratinocyte growth factor (KGF) pretreatment prevented elastase-induced pulmonary emphysema. Representative photomicrographs ($\times 100$ original magnification) of the lungs of mice treated with intratracheal saline (A), intratracheal elastase (B), and subcutaneous KGF (C) before intratracheal elastase. Mice were killed at day 20. D: mean chord length of alveoli in the lung of Saline (*n* = 5), Elastase (*n* = 8), and KGF (*n* = 9) mice. Data are means $\pm$ SE. **P* < 0.05 vs. Saline; †*P* < 0.05 vs. Elastase.



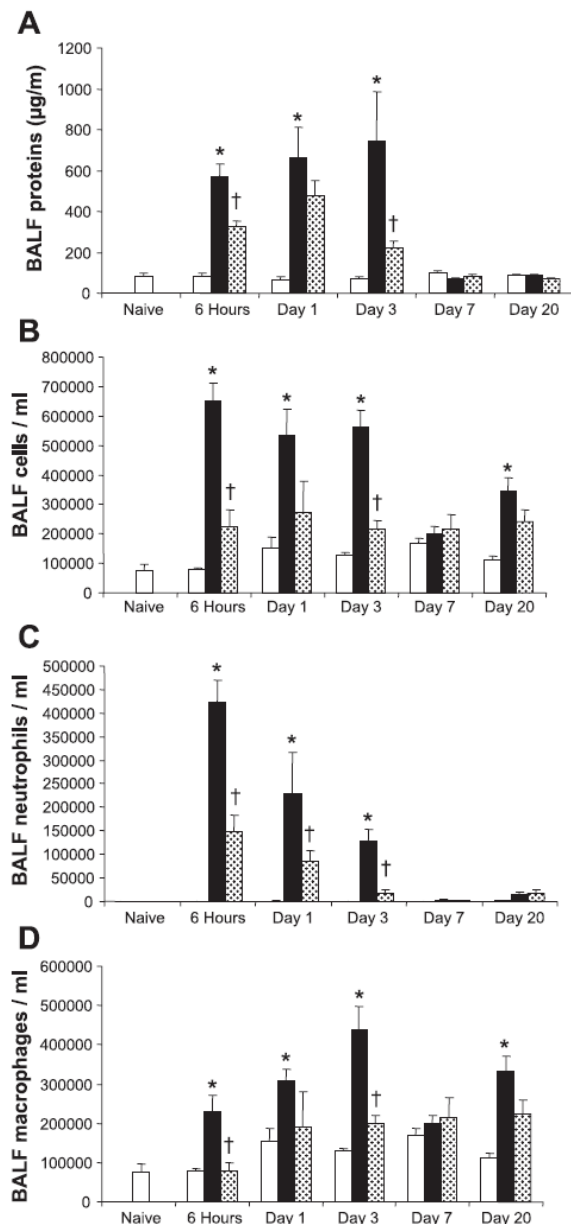


Fig. 2. KGF pretreatment prevented elastase-induced pulmonary inflammation. Total protein levels (A), total cellularity (B), polymorphonuclear neutrophil numbers (C), and macrophage numbers (D) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of naive mice and mice treated with intratracheal saline (open bars), mice treated with intratracheal elastase (filled bars), and mice treated with subcutaneous KGF before intratracheal elastase (dotted bars) are shown. Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$ vs. Saline, † $P < 0.05$ vs. Elastase. $n \geq 5$ in each group.

dominant cell type from day 1 onward (Fig. 2D), reaching a maximum at day 3 (4.3-fold increase compared with Saline group; $P = 0.034$). KGF pretreatment completely inhibited the elastase-induced increase in alveolar macrophages at all time points.

KGF reduced elastase-induced expression of CCL2 and CXCL2 in the lung. To determine the mechanisms involved in the inhibition of the inflammatory cell influx observed in KGF-treated mice, we studied the pulmonary expression of CCL2 and CXCL2, two chemokines that are the main stimulus for the recruitment of monocytes/macrophages and neutrophils, respectively, to the site of inflammation (14).

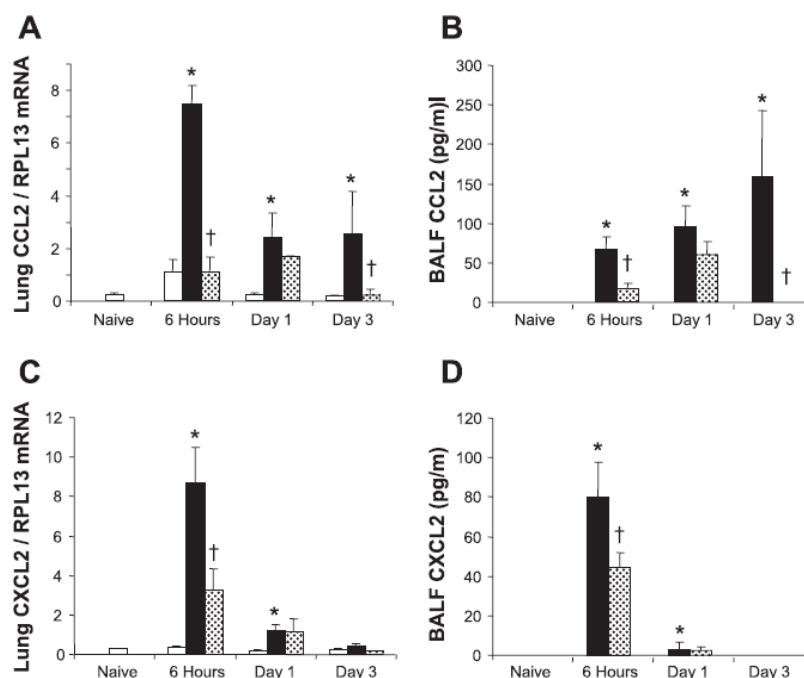
CCL2 mRNA was increased 15-fold in mice from the Elastase group compared with mice from the Saline group ($P = 0.009$) at the 6th hour and remained elevated from the 6th hour to day 3 (Fig. 3A). KGF pretreatment completely prevented the elastase-induced elevation in lung CCL2 mRNA at the 6th hour and day 3. CCL2 mRNA levels were similar in all groups of animals past day 3 after instillation. CCL2 protein was undetectable in BALF of Saline as well as Naive mice (Fig. 3B). In the Elastase group, CCL2 protein was detected in BALF at the 6th hour (66.6 ± 15.7 pg/ml), day 1 (97.1 ± 24.6 pg/ml), and day 3 (158.1 ± 85 pg/ml). BALF CCL2 levels in the KGF+Elastase group were markedly lower than in the Elastase group at the 6th hour (16.6 ± 7.8 pg/ml; $P = 0.011$) and were not detectable from day 3 onward.

CXCL2 mRNA was increased 19-fold in the Elastase group compared with the Saline group at the 6th hour after instillation ($P = 0.009$) and decreased thereafter (Fig. 3C). In the KGF+Elastase group, the increase in CXCL2 mRNA at the 6th hour was reduced by 64% compared with the Elastase group ($P = 0.027$). CXCL2 mRNA levels were similar in all groups of animals past day 3 after instillation. CXCL2 protein was not detected in BALF of Saline as well as Naive mice (Fig. 3D). CXCL2 protein was detectable in BALF of Elastase and KGF+Elastase animals at the 6th hour and day 1. At the 6th hour after instillation, BALF CXCL2 levels were reduced by 23% in the KGF+Elastase group (44.4 ± 7.2 pg/ml) compared with the Elastase group (80.5 ± 17.2 pg/ml; $P = 0.024$).

KGF reduced elastase-induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the lung. The coordinated expression of cell adhesion molecules, particularly ICAM-1 and VCAM-1, is implicated in the recruitment of macrophages and neutrophils to the site of injury in the lung (1). At the 6th hour after instillation, lung ICAM-1 mRNA was increased 6.5-fold in the Elastase group compared with the Saline group ($P = 0.009$; Fig. 4). This increase was blunted by 47% in the KGF+Elastase group compared with Elastase mice ($P = 0.027$). Likewise, the lung content of VCAM-1 mRNA was increased 3.8-fold in the Elastase group compared with the Saline group ($P = 0.009$), while the lung content of VCAM-1 mRNA was reduced by 39% in the KGF+Elastase group compared with Elastase mice ($P = 0.05$).

KGF prevented elastase-induced increase in CCL2, CXCL2, and ICAM-1 mRNA in MLE-12 cells in vitro. To determine whether elastase and KGF respectively induced and repressed CCL2 and CXCL2 expression in the lung through direct effects on alveolar epithelial cells, we exposed the MLE-12 murine alveolar epithelial cell line to both agents in vitro. Elastase induced a 3.6-fold increase in CCL2 mRNA ($P = 0.016$; $n = 6$), a 6.4-fold increase in CXCL2 mRNA ($P = 0.010$; $n = 6$), and a slight (25%) increase in ICAM-1 mRNA ($P = 0.049$, $n = 3$) compared with the control condition (Fig. 5). KGF completely prevented the elastase-induced increase in CCL2 ($P = 0.024$; $n = 6$), CXCL2 ($P = 0.01$; $n = 6$), and ICAM-1

Fig. 3. KGF pretreatment prevented the elastase-induced pulmonary expression of CCL2 and CXCL2. CCL2 mRNA in lung homogenate (A), CCL2 protein in BALF (B), CXCL2 mRNA in lung homogenate (C), and CXCL2 protein in BALF (D) of naive mice and mice treated with intratracheal saline (open bars), mice treated with intratracheal elastase (filled bars), and mice treated with subcutaneous KGF before intratracheal elastase (dotted bars) are shown. Data are means $\pm$ SE. * P < 0.05 vs. Saline, † P < 0.05 vs. Elastase, $n \geq 5$ in each group. RPL13, ribosomal protein L13.



($P = 0.049$; $n = 3$) mRNA. Elastase did not modulate the levels of VCAM-1 mRNA in MLE-12 cells (data not shown).

Altogether, these results point to a strong anti-inflammatory effect of KGF pretreatment mediated by a reduction in the pulmonary expression of chemokines and adhesion molecules. This effect seems to be exerted at least partly through direct effects on alveolar epithelial cells.

KGF did not modulate elastolytic activity in BALF. We asked whether the protective effect of KGF pretreatment may have been due to a reduction in the diffusion of the instilled

elastase from the proximal airway to the distal lung. At the 6th hour after instillation, elastin zymography showed the presence of two elastolytic bands located at 25 and 29 kDa in BALF of mice from the Elastase and KGF+Elastase groups, corresponding to endogenous neutrophil elastase and exogenous porcine pancreatic elastase, respectively (Fig. 6A). These bands were detected neither in the Saline group at all time points nor in the Elastase and KGF+Elastase groups past the 6th hour after instillation. The intensity of both bands was identical in Elastase and KGF+Elastase mice, demonstrating that the elastase instilled in the trachea of KGF-treated mice did reach the distal lung. This result also demonstrated that the preventive effect of KGF was not secondary to an increase in the anti-elastase shield before elastase instillation.

KGF decreased matrix metalloproteinase-2 and -9 activity in BALF at day 3. Macrophages and neutrophils secrete matrix metalloproteinases (MMPs) (5, 16). Since the development of elastase-induced emphysema has been previously linked to the elevated expression and activity of MMPs in the lung (2, 8), we determined whether the anti-inflammatory effect of KGF translated into the modulation of proteolytic activity in BALF.

Gelatin zymography allowed the detection of a 73-kDa and a 97-kDa gelatinase, corresponding to MMP-2 and MMP-9, respectively (Fig. 6B). MMP-9 activity (Fig. 6C) was detected in BALF of mice from the Saline group at the 6th hour and at day 1. It was markedly increased in BALF of mice from the Elastase group compared with Saline mice from the 6th hour (13-fold increase; $P = 0.021$) to day 3 (6-fold increase; $P = 0.034$). BALF MMP-9 activity in the KGF+Elastase group was reduced compared with the Elastase group at day 3 (91% reduction; $P = 0.05$).

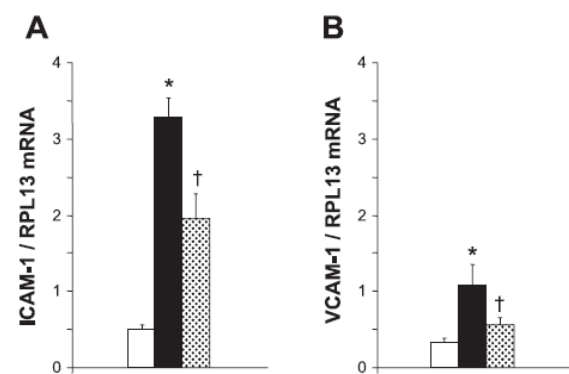


Fig. 4. KGF pretreatment prevented the elastase-induced increase in lung intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 mRNA. ICAM-1 (A) and VCAM-1 mRNA (B) in lung homogenate 6 h after the intratracheal instillation of saline (open bars), elastase (filled bars), and elastase preceded by subcutaneous KGF (dotted bars) are shown. Data are means $\pm$ SE. * P < 0.05 vs. Saline, † P < 0.05 vs. Elastase. $n = 5$ in each group.

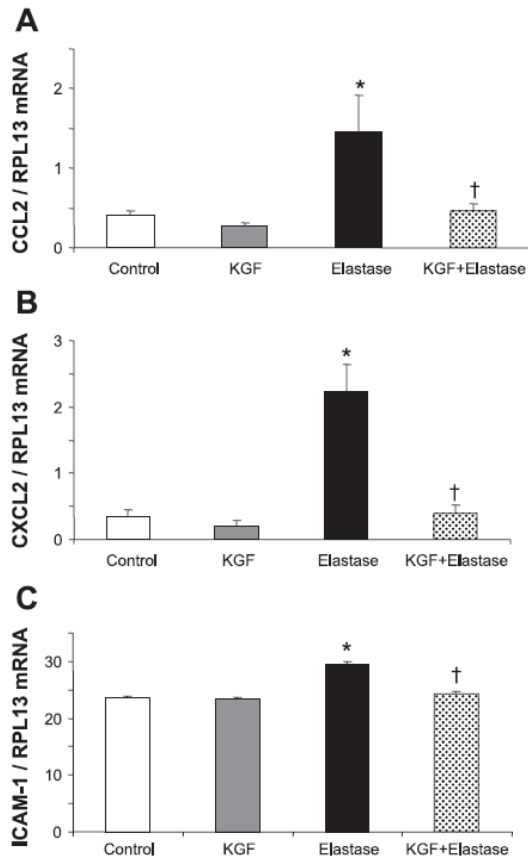


Fig. 5. KGF prevented the elastase-induced increase in CCL2, CXCL2, and ICAM-1 mRNA in the MLE-12 murine alveolar epithelial cell line in vitro. CCL2 (A), CXCL2 (B), and ICAM-1 (C) mRNA relative to RPL13 mRNA in MLE-12 cells exposed to culture medium alone (Control; open bars), 100 ng/ml KGF (gray bars), 1 U/ml elastase (filled bars), and KGF followed by elastase (dotted bars) are shown. Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$ vs. Control, † $P < 0.05$ vs. Elastase. $n = 6$ (CCL2, CXCL2) or 3 (ICAM-1) in each group.

MMP-2 activity was detected in all samples (Fig. 6D). Compared with the Saline group, MMP-2 activity was elevated in BALF of mice from the Elastase group at the 6th hour (59% increase; $P = 0.043$), day 1 (6.7-fold increase; $P = 0.05$), and day 3 (2.9-fold increase; $P = 0.049$) but was reduced at day 20 (49% reduction; $P = 0.021$). BALF MMP-2 activity in mice from the KGF+Elastase group was markedly lower than in animals from the Elastase group at day 3 (83% reduction; $P = 0.025$).

Therefore, the potent early anti-inflammatory effect of KGF was associated with the inhibition of MMP-2 and MMP-9 activity in BALF on the third day after elastase instillation.

KGF did not increase pulmonary expression of TIMPs. Since KGF pretreatment decreased the activity of MMP-2 and MMP-9 in the lung, we determined whether KGF modulated the pulmonary expression of their specific inhibitors, the TIMPs. TIMP-1 mRNA was sharply increased in the lungs of Elastase compared with Saline mice at all time points studied, reaching a maximum on day 1 (6-fold increase, $P = 0.014$;

Fig. 7A). In KGF+Elastase mice, the pulmonary TIMP-1 mRNA level was not superior to that of Elastase mice at any time point and was eventually reduced by 58% at day 3 ($P = 0.047$). The lung content of TIMP-2, -3, and -4 mRNA was not different in any group of animals at any time point (data not shown). These results suggest that the protective effect of KGF was not secondary to an increased anti-MMP shield.

KGF reduced pulmonary content in elastin and collagen-1 α 1 mRNA. To determine whether KGF pretreatment prevented the degradation of alveolar structures through an elevation in the synthesis of extracellular matrix components, we determined the content of elastin and collagen-1 α 1 mRNA in the lungs of mice from the Saline, Elastase, and KGF+Elastase groups. Elastase instillation was followed by a persistent increase in lung elastin mRNA peaking at day 7 (Fig. 7B). KGF pretreatment prevented that increase. Indeed, pulmonary elastin mRNA in mice from the KGF+Elastase group was reduced by 62% at day 3 and 68% at day 7 compared with mice from the Elastase group ($P = 0.014$). The lung content of collagen-1 α 1 mRNA was elevated in Elastase mice compared with Saline mice at the 6th hour, day 3, and day 7 (Fig. 7C). KGF pretreatment completely prevented the elastase-induced increase in lung collagen mRNA.

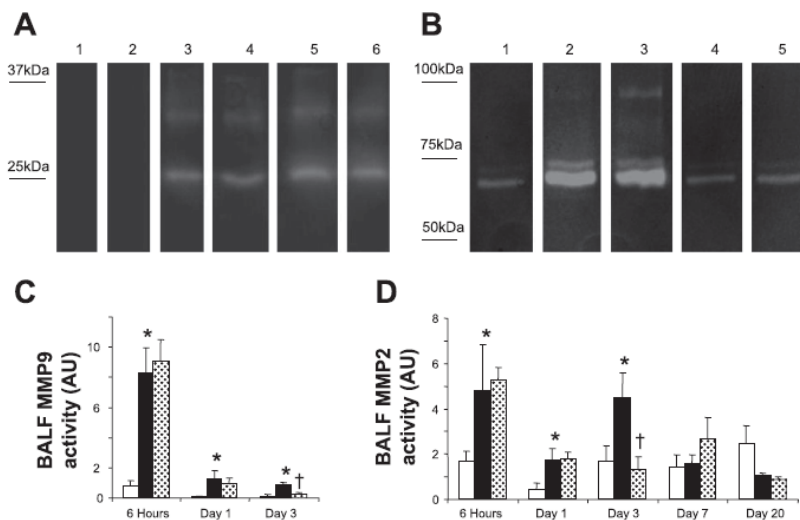
KGF prevented elastase-induced DNA damage in alveolar septal cells. We determined by the TUNEL method whether the protective effect of KGF was related to a reduction in DNA damage in alveolar cells on the 7th day after elastase instillation (Fig. 8). In contrast to animals from the Saline group, in which pulmonary cell DNA damage was very rare ($1.2 \pm 0.8\%$ TUNEL-positive cells, $n = 3$), large numbers of alveolar cell nuclei were stained by TUNEL in Elastase animals on day 7 ($67.5 \pm 12.4\%$; $P = 0.045$, $n = 3$). KGF greatly reduced the number of alveolar septal cells showing DNA damage ($9.5 \pm 5.6\%$, $n = 3$) after elastase instillation ($P = 0.045$).

Activated caspase-3 was not detected in the lung of elastase-treated animals. While activated caspase-3 could be detected in thymus cells and sporadically in alveolar macrophages, activated caspase-3 was not detected in alveolar septal cells in any group of animals at 6 h and 1, 3, 7 and 20 days after elastase or saline instillation (data not shown).

KGF posttreatment had no effect on elastase-induced emphysema. In view of the strong protective effect of KGF pretreatment on elastase-induced emphysema, we asked whether KGF could have a curative effect in this model. In a first set of experiments, KGF was administered early after elastase instillation, from day 0 to day 7, and mice were killed at day 20. Early KGF treatment did not prevent the development of emphysema since the mean chord length of mice treated with KGF was $68.6 \pm 4 \mu\text{m}$ compared with $66.7 \pm 10.9 \mu\text{m}$ for mice treated with subcutaneous saline ($P = 0.99$, $n = 4$; Fig. 9). In a second set of experiments, we investigated whether KGF could induce alveolar regeneration after emphysema had been allowed to develop. KGF was administered later after elastase instillation, from day 20 to day 27, and mice were killed at day 27. Late KGF treatment did not induce alveolar regeneration. The mean chord length of mice treated with KGF was $76.3 \pm 4.3 \mu\text{m}$ compared with $76.1 \pm 5.5 \mu\text{m}$ for mice treated with subcutaneous saline ($n = 4$; $P = 0.99$).

We asked whether the lack of a curative effect of KGF was due to a reduced expression of the KGF receptor in the lung of elastase-treated animals. We determined the expression of the

Fig. 6. KGF pretreatment did not modulate elastolytic activity in the lung after elastase instillation but prevented the elastase-induced increase in matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 activity at day 3. **A**: representative elastin zymography at the 6th hour after instillation. *Lanes 1 and 2*, mice treated with intratracheal saline; *lanes 3 and 4*, mice treated with intratracheal elastase; *lanes 5 and 6*, mice treated with subcutaneous KGF before intratracheal elastase. Elastase activity was not detected in BALF after the 6th hour time point in any group. **B**: representative gelatin zymography at day 3 after instillation. *Lane 1*, Saline mouse; *lanes 2 and 3*, Elastase mice; *lanes 4 and 5*, KGF+Elastase mice. **C**: MMP-9 activity in BALF of Saline (open bars), Elastase (filled bars), and KGF+Elastase mice (dotted bars). MMP-9 activity was not detected in BALF after the day 3 time point in any group. **D**: MMP-2 activity in BALF of Saline, Elastase, and KGF+Elastase mice. Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$ vs. Saline, † $P < 0.05$ vs. Elastase. $n = 5$ in each group. AU, arbitrary units.

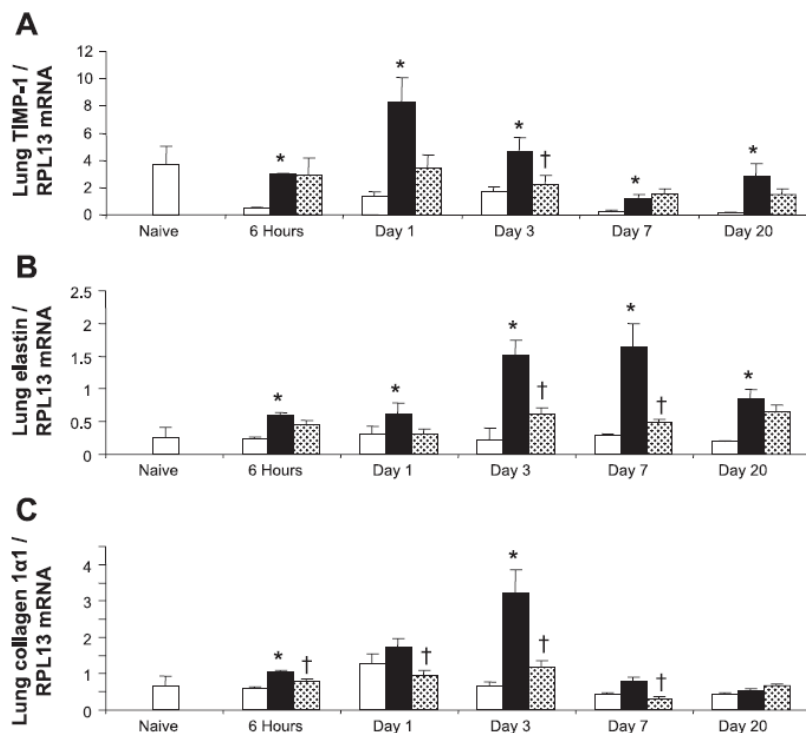


KGF receptor in the lungs of elastase-instilled animals ($n = 3$) compared with saline-instilled mice ($n = 3$) at day 20 after instillation. The KGF receptor was detected in alveolar type 2 cells at the membrane level (Fig. 10). The percentage of alveolar cells expressing the KGF receptor was not different in saline ($3.4 \pm 0.8\%$)- and elastase ($4.4 \pm 0.8\%$; $P = 0.38$)-instilled mice.

DISCUSSION

The main findings of this study are that KGF protected against elastase-induced pulmonary inflammation, activation of MMP-2 and MMP-9, alveolar cell DNA damage, and the subsequent development of emphysema in mice. The anti-inflammatory effect of KGF was related to a reduction in the

Fig. 7. KGF pretreatment prevented the elastase-induced increase in lung tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, elastin, and collagen-1 α 1 mRNA. TIMP-1 (**A**), elastin (**B**), and collagen-1 α 1 (**C**) mRNA in the lung of naive mice and mice treated with intratracheal saline (open bars), mice treated with intratracheal elastase (filled bars), and mice treated with subcutaneous KGF before intratracheal elastase (dotted bars) are shown. Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$ vs. Saline, † $P < 0.05$ vs. Elastase. $n \geq 5$ in each group.



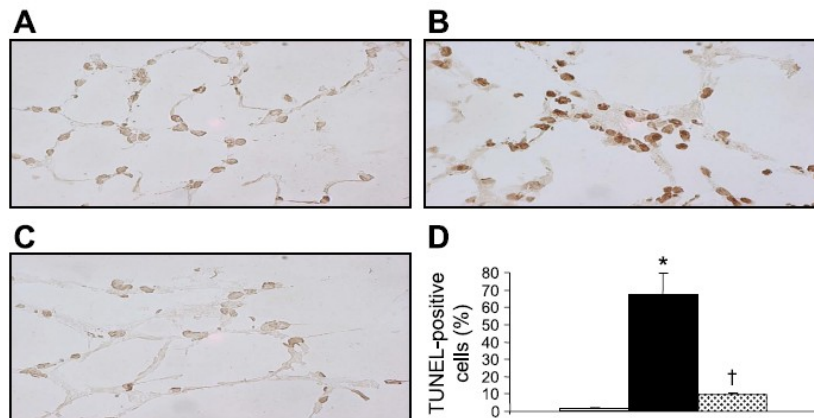


Fig. 8. KGF pretreatment prevented elastase-induced DNA damage in alveolar cells. Representative photomicrographs ($\times 250$ original magnification) of terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-stained lungs of mice treated with intratracheal saline (A), intratracheal elastase (B), and subcutaneous KGF (C) before intratracheal elastase are shown. Numerous nuclei of alveolar cells are stained brown in elastase-treated mice. D: % of TUNEL-positive cells in the lung of saline (open bars), elastase (filled bars), and KGF+Elastase mice (dotted bars). Data are means $\pm$ SE. * $P < 0.05$ vs. Saline. † $P < 0.05$ vs. Elastase. $n = 3$ in each group.

pulmonary expression of the proinflammatory chemokines CCL2 and CXCL2 and of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. In addition to its protective effect *in vivo*, KGF abolished the elastase-induced increase in CCL2, CXCL2, and ICAM-1 mRNA in a murine alveolar epithelial cell line *in vitro*.

The elastase-induced emphysema model has been used in research for more than 30 years (10) and has brought considerable insight into the pathogenesis of human disease. Previous data indicate a strong relationship between inflammation and emphysematous changes in this model (13). In support of a crucial role of inflammation in the development of emphysema, we observed that one of the main effects of KGF in this model was a marked reduction in the inflammatory reaction following the instillation of elastase as determined by total protein levels and the number of neutrophils and macrophages in BALF. An anti-inflammatory effect of KGF in the lung was

previously reported in the acid aspiration-induced lung injury model (18).

To explore the mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of KGF, we determined the pulmonary expression of the chemokines CCL2 and CXCL2, which are the main signals involved in the recruitment of macrophages and neutrophils, respectively, as well as that of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1, which play an essential role in leukocyte adherence and migration. In accordance with a major role of CCL2, CXCL2, ICAM-1, and VCAM-1 in the recruitment of inflammatory cells, these four factors were markedly up-regulated in the lung after elastase instillation, while the levels observed in KGF-treated mice were markedly lower. It must be noted that a direct cause-and-effect relationship between the elevation of CXCL2 and CCL2 and the recruitment of neutrophils and macrophages in BALF of elastase-instilled animals was not demonstrated in this study.

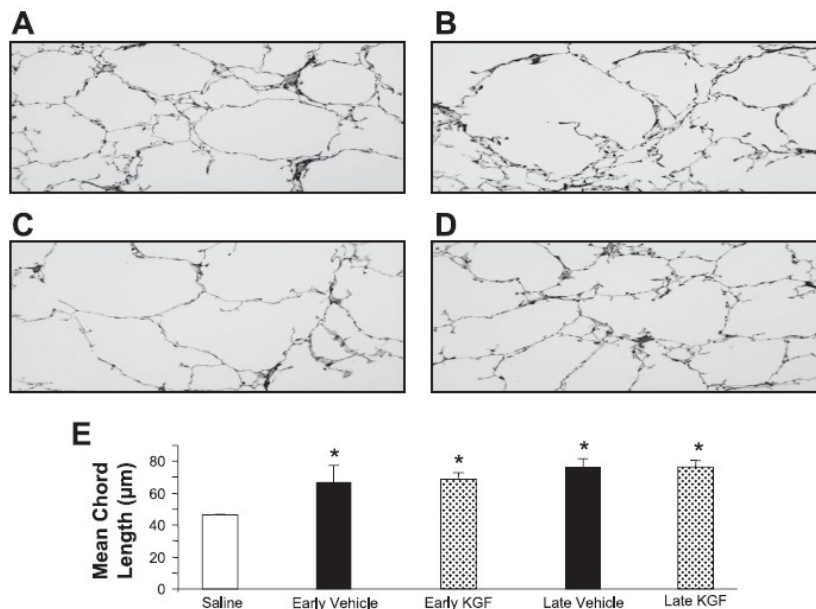


Fig. 9. KGF posttreatment did not alter the course of elastase-induced emphysema despite the presence of the KGF receptor in the lung of elastase-treated mice. Representative photomicrographs ($\times 100$ original magnification) of the lungs of mice treated from day 0 to day 7 after the tracheal instillation of elastase with subcutaneous saline (Early Vehicle; A) or KGF (Early KGF; B) and killed at day 20 after instillation and mice treated from day 20 to day 28 with subcutaneous saline (Late Vehicle; C) or KGF (Late KGF; D) and killed at day 28 are shown. Emphysema is evident in the lungs of all animals. E: mean chord length of alveoli in mice treated with intratracheal saline and killed at day 20 (Saline), Early Vehicle and Early KGF mice, and Late Vehicle and Late KGF mice. * $P < 0.05$ vs. Saline.

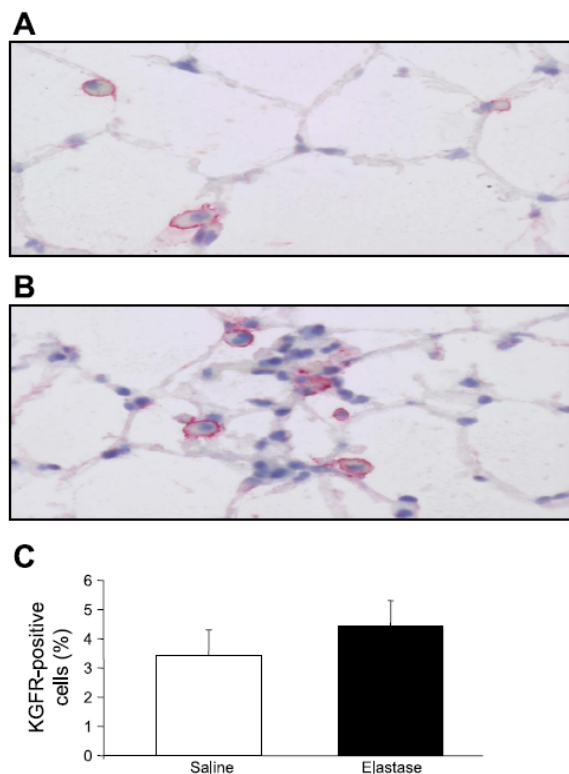


Fig. 10. The KGF receptor (KGFR) was preserved in the lung of elastase-instilled mice. Representative photomicrographs ($\times 400$ original magnification) demonstrating the immunohistochemical detection of KGFR at day 20 after the instillation of saline (A) or elastase (B) are shown. C: % of KGFR-expressing cells in the lungs of Saline (open bar) and Elastase (filled bar) mice.

Alveolar type 2 cells have been shown to express CCL2, CXCL2, ICAM-1, and VCAM-1 (17, 26). Since the KGF receptor is predominantly expressed by alveolar type 2 cells, the fact that KGF could efficiently reduce the expression of CCL2, CXCL2, ICAM-1, and VCAM-1 indicated a probable role of those cells. This hypothesis is supported by the fact that elastase induced an increase in CCL2, CXCL2, and ICAM-1 mRNA in the MLE-12 murine alveolar epithelial cell line and that this effect was completely prevented by KGF. However, this last result should be considered with caution because it was obtained in a transformed cell line. The demonstration that alveolar epithelial cells play an important role in elastase-induced pulmonary inflammation would require the repetition of those experiments in primary alveolar epithelial cells. Moreover, it is unclear how the elastase concentration used for the *in vitro* experiments relates to those obtained in the lungs of mice.

While our results highlight the essential role of inflammation in the mechanisms leading to pulmonary emphysema, they also bring some insight into the role of MMPs in this model. MMPs are considered to be crucial for tissular remodeling processes in most organs, including the lung, and a role of MMPs in the development of pulmonary emphysema has been suspected. A gain-of-function polymorphism in the promoter of MMP-9 is

linked to the occurrence of pulmonary emphysema in humans (9), and the pharmacological inhibition of MMPs protects against emphysema in hamsters exposed to elastase (15). It was therefore interesting that while an elevation in MMP-2 and MMP-9 activity was initially detected at similar levels in BALF of mice early after elastase instillation (6th hour and day 1), MMP activation resolved much faster in KGF-treated mice. We suspect that the protective effect of KGF was mediated at least in part by this reduction in MMP-2 and MMP-9 activity in BALF. While alveolar epithelial cells have the capacity to secrete MMPs (19), alveolar macrophages are a main source of MMPs in the inflamed lung (6). The reduction in the numbers of BALF macrophages in KGF-treated mice may have contributed to the reduction in BALF MMP-2 and MMP-9 activity in these animals.

In addition to a reduction in elastase-induced pulmonary inflammation and protease excess, we observed that KGF pretreatment prevented elastase-induced DNA damage in alveolar septal cells as detected by the TUNEL method. Meanwhile, active caspase-3 was not detected in those cells at any time point, indicating that in our experiments DNA damage in the lung of elastase-exposed mice could not be attributed to caspase-dependent apoptosis. Indeed, apart from apoptosis, TUNEL staining has been shown to indicate other cell death processes such as necrosis or autolytic cell death (7). Nonetheless, the cytoprotective effect of KGF, which has been well described *in vitro* as well as *in vivo* and seems to be mediated principally by the Akt signaling axis (21), may have contributed to the prevention of emphysema in our experiments.

KGF favorably influences tissular repair in various organs, including the skin (23), cornea (22), and digestive tract (28), and we hypothesized that the beneficial effect of KGF in this model could have been related to the enhancement of lung repair. After elastase instillation in rodents, the initial acute inflammatory reaction is followed by a reparative phase during which several components of the extracellular matrix are up-regulated in the lung, including collagen and elastin (12). While this process fails to reestablish the normal pulmonary architecture *ad integrum*, it somehow manages to limit the extent of emphysematous changes since the pharmacological inhibition of elastin cross-linking leads to worsened emphysema (11). Unexpectedly, the increase in lung elastin and collagen-1 α 1 mRNA following elastase instillation was blunted in KGF-treated animals, suggesting that KGF exerted its protective effect by limiting the extent of the initial inflammatory injury rather than by enhancing alveolar repair systems. This conclusion is supported by the fact that in the present work, as in previous studies, KGF exerted a beneficial effect only when administered before the insult, although we verified that the expression of the KGF receptor was preserved in the lungs of elastase-treated animals.

While we were able to show only a protective and not a curative effect of KGF, the peculiarities of the elastase-induced emphysema model should be kept in mind when evaluating the therapeutic implications of this result. In particular, while in this model lung injury is unique and limited in time, in the case of human patients injurious events are repeated and span decades. For this reason, we think that therapeutic strategies aimed at protecting the alveolar epithelium from injury may prove useful for slowing the presently inexorable progression of pulmonary emphysema.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Olivier Thibaudou (Plate-Forme de Morphologie, IFR 02, Hôpital Bichat) for his assistance with preparing anatomic specimens and Dr. Cyril Vadrot (Laboratoire de Microbiologie, Etablissement Pharmaceutique des Hôpitaux de Paris) for his help with endotoxin quantification in elastase samples.

GRANTS

L. Plantier was supported by a research fellowship from INSERM (Poste d'Accueil) and a grant from the Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF). S. Marchand-Adam is the recipient of a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (Prix Mariane Jossa). J. Boczkowski was supported by INSERM and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Contrat d'Interface). L. Boyer was supported by a grant from SPLF. Part of this project was supported by a grant from the Chancellerie des Universités (Legs Poix).

REFERENCES

- Albelda SM. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 195–203, 1991.
- Birrell MA, Wong S, Hele DJ, McCluskie K, Hardaker E, Belvisi MG. Steroid-resistant inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease is associated with a lack of nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 74–84, 2005.
- Bonay M, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal J, Soler P, Fournier M, Leseche G, Dehoux M, Crestani B. Hepatocyte and keratinocyte growth factors and their receptors in human lung emphysema. *BMC Pulm Med* 5: 13, 2005.
- Danan C, Franco ML, Jarreau PH, Dassieu G, Chailley-Heu B, Bourbon J, Delacourt C. High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1384–1387, 2002.
- Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 240–247, 1997.
- Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1145–1154, 1999.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21: 1465–1468, 1995.
- Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, Shapiro SD. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 116: 753–759, 2006.
- Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1378–1382, 2005.
- Kaplan PD, Kuhn C, Pierce JA. The induction of emphysema with elastase. I. The evolution of the lesion and the influence of serum. *J Lab Clin Med* 82: 349–356, 1973.
- Kuhn C 3rd, Starcher BC. The effect of lathyrogens on the evolution of elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 122: 453–460, 1980.
- Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 555–564, 1998.
- Lucey EC, Keane J, Kuang PP, Snider GL, Goldstein RH. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. *Lab Invest* 82: 79–85, 2002.
- Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338: 436–445, 1998.
- Ma D, Jiang Y, Chen F, Gong LK, Ding K, Xu Y, Wang R, Ge A, Ren J, Li J, Ye Q. Selective inhibition of matrix metalloproteinase isozymes and in vivo protection against emphysema by substituted gamma-keto carboxylic acids. *J Med Chem* 49: 456–458, 2006.
- Mackarel AJ, Cottell DC, Russell KJ, FitzGerald MX, O'Connor CM. Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1209–1219, 1999.
- Manzer R, Wang J, Nishina K, McConville G, Mason RJ. Alveolar epithelial cells secrete chemokines in response to IL-1beta and lipopolysaccharide but not to ozone. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 158–166, 2006.
- Nemzek JA, Ebong SJ, Kim J, Bolgos GL, Remick DG. Keratinocyte growth factor pretreatment is associated with decreased macrophage inflammatory protein-2alpha concentrations and reduced neutrophil recruitment in acid aspiration lung injury. *Shock* 18: 501–506, 2002.
- Pardo A, Ridge K, Uhal B, Sznajder JJ, Selman M. Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinases A and B in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 901–910, 1997.
- Plantier L, Marchand-Adam S, Marchal-Somme J, Leseche G, Fournier M, Dehoux M, Aubier M, Crestani B. Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L641–L647, 2005.
- Ray P, Devaux Y, Stolz DB, Yarlagadda M, Watkins SC, Lu Y, Chen L, Yang XF, Ray A. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6098–6103, 2003.
- Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S. Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1524–1529, 1995.
- Staiano-Coico L, Krueger JG, Rubin JS, D'Lim S, Vallat VP, Valentini L, Fahey T 3rd, Hawes A, Kingston G, Madden MR, Mathwich M, Gottlieb A, Aaronson SA. Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. *J Exp Med* 178: 865–878, 1993.
- Stern JB, Fierobe L, Paugam C, Rolland C, Dehoux M, Petiet A, Dombret MC, Mantz J, Aubier M, Crestani B. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 28: 2326–2333, 2000.
- Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 93: 1298–1306, 1994.
- Wang SZ, Hallsworth PG, Dowling KD, Alpers JH, Bowden JJ, Forsyth KD. Adhesion molecule expression on epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J* 15: 358–366, 2000.
- Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L924–L940, 2002.
- Zeeh JM, Procaccino F, Hoffmann P, Aukerman SL, McRoberts JA, Soltani S, Pierce GF, Lakshmanan J, Lacey D, Eysselein VE. Keratinocyte growth factor ameliorates mucosal injury in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology* 110: 1077–1083, 1996.
- Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ Jr, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 106: 1081–1093, 2000.

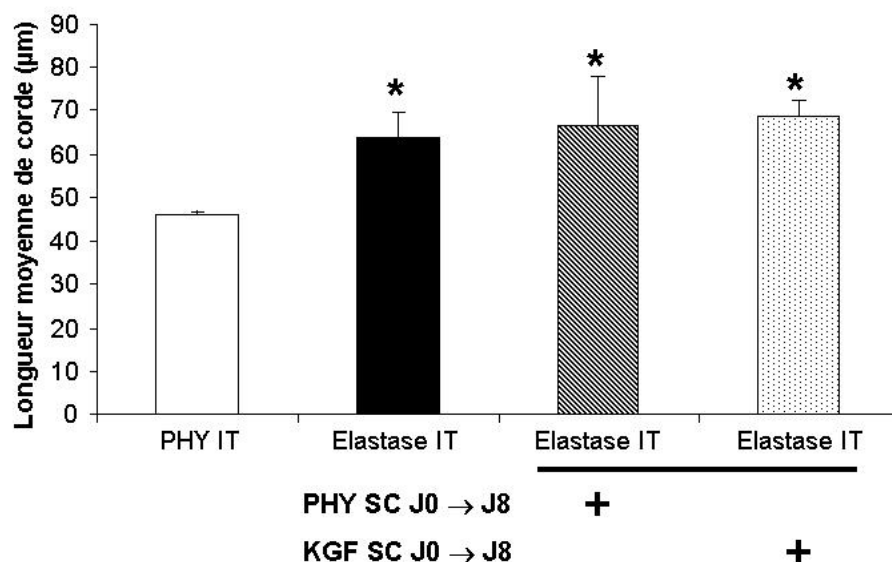
7.1.2.Résultats complémentaires

7.1.2.1.Souris traitées par le KGF de J0 à J8 post-instillation

Nous avons cherché à déterminer si l'administration du KGF avant l'instillation d'élastase était nécessaire à l'exercice de son effet protecteur vis-à-vis de la constitution des lésions d'emphysème après instillation d'élastase. Des souris ont donc été traitées durant les 8 jours faisant immédiatement suite à l'instillation trachéale d'élastase.

Les lésions d'emphysème n'étaient pas atténuées dans le groupe des souris ayant reçu un traitement quotidien par le KGF durant les 8 jours faisant immédiatement suite à l'instillation trachéale d'élastase (figure 8).

Figure 8 : Longueur moyenne de corde dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale de sérum physiologique (histogramme blanc), une instillation trachéale d'élastase (histogramme noir), une instillation trachéale d'élastase suivie d'une injection sous-cutanée quotidienne de 100 μ l de sérum physiologique (histogramme hachuré) ou une instillation trachéale d'élastase suivie d'une injection sous-cutanée quotidienne de 100 μ g de KGF humain (histogramme pointillé). Les souris étaient sacrifiées 20 jours après l'instillation trachéale. * : $p < 0,05$.

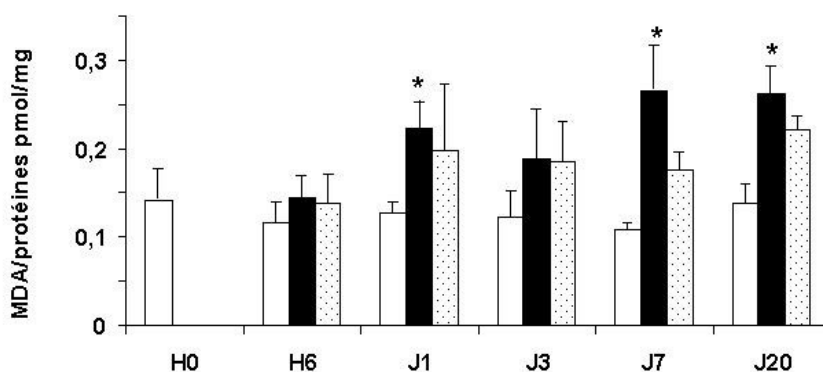


7.1.2.2. Contenu pulmonaire en malone dialdéhyde

Le malone dialdéhyde (MDA), de formule $C(C=O)C=O$, est une espèce réactive produite lors de la peroxidation des lipides. Ce composé est utilisé comme un biomarqueur de l'excès d'oxydants dans les tissus³¹⁸. Pour déterminer le niveau d'excès d'oxydants dans le poumon dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase et l'effet éventuel du pré-traitement par le KGF sur ce paramètre, nous avons déterminé le contenu en MDA du poumon des animaux comme décrit précédemment³¹⁹.

Le contenu pulmonaire en MDA dans le poumon des animaux ayant subi une instillation trachéale d'élastase était supérieur à celui des animaux témoins à 24h, 7 jours et 20 jours après l'instillation trachéale, indiquant un excès d'oxydants dans ce modèle. Le pré-traitement par le KGF n'avait pas d'effet sur le contenu pulmonaire en MDA, ce qui compte tenu de l'effet protecteur du KGF suggère que l'excès d'oxydant n'ait pas joué pas un rôle central dans le développement de l'emphysème pulmonaire dans nos expériences (figure 9).

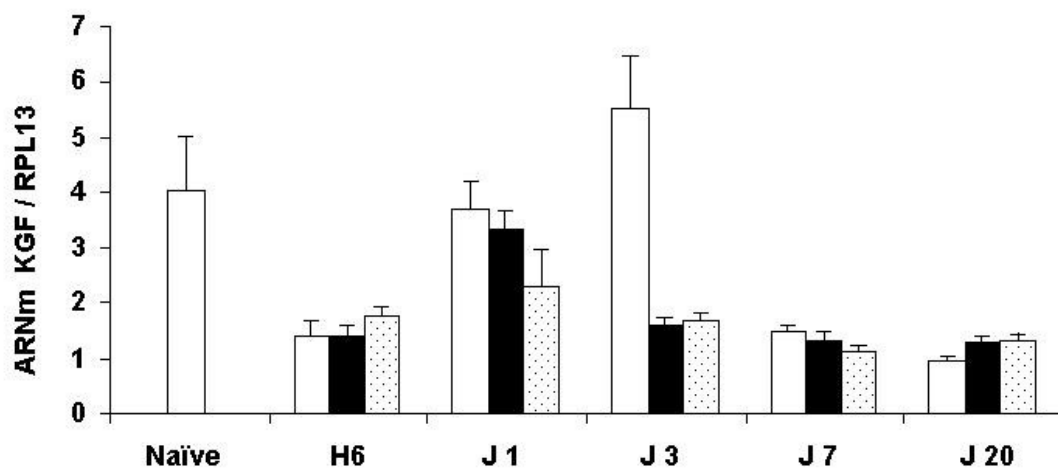
Figure 9 : Contenu pulmonaire en malone dialdéhyde rapporté aux protéines totales dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale de sérum physiologique (histogrammes blancs), une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de sérum physiologique (histogrammes noirs), ou une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de KGF humain (histogrammes pointillés). Les souris étaient sacrifiées 6 heures ou 1, 3, 7 et 20 jours après l'instillation trachéale. * : <0,05.



7.1.2.3.Expression pulmonaire de l'ARNm du KGF

Nous avons déterminé le contenu pulmonaire en ARNm du KGF dans les suites de l'instillation trachéale de sérum physiologique ou d'élastase. Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de l'ARNm du KGF dans ce modèle (figure 10).

Figure 10 : Contenu pulmonaire en ARNm du KGF rapporté à celui de la RPL13 dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale de sérum physiologique (histogrammes blancs), une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de sérum physiologique (histogrammes noirs), ou une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de KGF humain (histogrammes pointillés). Les souris étaient sacrifiées 6 heures ou 1, 3, 7 et 20 jours après l'instillation trachéale. * : $p < 0,05$.



7.1.2.4.Expression pulmonaire des ARNm des NO synthases

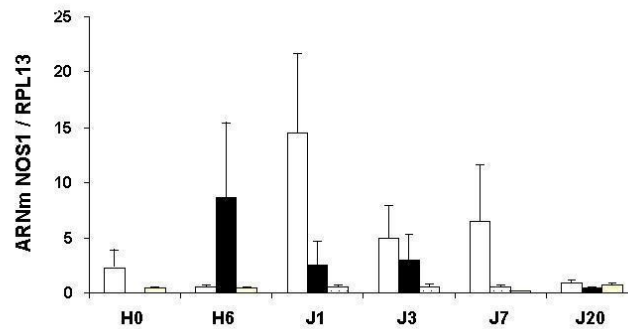
Les NO synthases (NOS), dont il existe trois isoformes (NOS1 ou NOS neuronale, NOS2 ou NOS inductible et NOS3 ou NOS endothéliale) participent à de nombreux processus physiologiques et semblent intervenir dans plusieurs pathologies dégénératives chroniques caractérisées comme l'emphysème pulmonaire par un excès d'espèces réactives de l'oxygène, notamment par l'intermédiaire de la production de peroxynitrite (ONOO.-) formé par la réaction du NO avec l'anion superoxyde³²⁰.

Ce phénomène pourrait jouer un rôle dans le développement de l'emphysème. En effet, plusieurs arguments suggèrent qu'il existe dans le poumon emphysémateux une activation de la voie de production du NO conduisant à la nitrosylation des protéines. L'iNOS est fortement exprimée par les cellules épithéliales alvéolaires chez les patients emphysémateux alors qu'elle n'est pas exprimée chez les sujets fumeurs indemnes d'emphysème¹⁴⁴. De même, des concentrations élevées de NO alvéolaire ont été mesurées chez les patients atteints d'emphysème pulmonaire sévère par rapport aux patients fumeurs indemnes d'emphysème³²¹. L'inactivation de l'HDAC2 macrophagique, qui contribue à la perpétuation de l'inflammation pulmonaire au cours de la BPCO, est attribuée à sa nitrosylation¹³⁰.

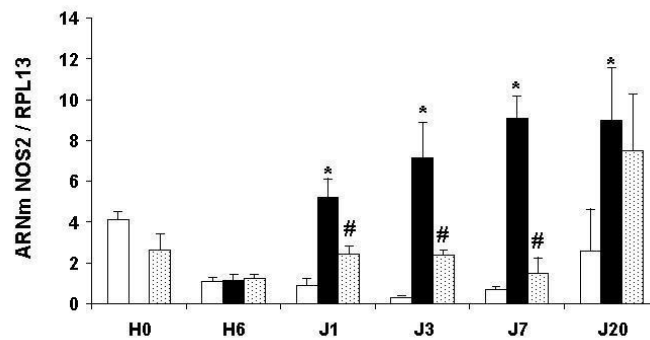
Dans l'hypothèse que les NOS jouent un rôle dans la physiopathologie de l'emphysème, nous avons quantifié le contenu pulmonaire en ARNm de NOS-1, NOS-2 et NOS-3 dans le poumon des animaux. Alors que l'expression de NOS-1 n'était pas modifiée, l'expression pulmonaire de NOS-2 et NOS-3 s'élevait de façon très importante dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale d'élastase, et ce de façon soutenue dans le temps puisque l'augmentation de l'expression de NOS-2 et NOS-3 était encore présente 20 jours après l'instillation d'élastase. De plus, l'augmentation de l'expression de NOS-2 était atténuée chez les souris ayant été traitées par le KGF avant l'instillation d'élastase, indiquant une association entre la surexpression de NOS-2 dans le poumon et le développement des lésions d'emphysème (figure 11). Ces résultats nous ont conduits à explorer plus avant le rôle de NOS-2 et NOS-3 dans la constitution des lésions d'emphysème dans ce modèle (voir la section 10-2).

Figure 11 : Contenu pulmonaire en ARNm de 11a) NOS-1, 11b) NOS-2 et 11c) NOS-3 rapporté à celui de la RPL13 dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale de sérum physiologique (histogrammes blancs), une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de sérum physiologique (histogrammes noirs), ou une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de KGF humain (histogrammes pointillés). Les souris étaient sacrifiées 6 heures ou 1, 3, 7 et 20 jours après l'instillation trachéale. * : $p < 0,05$.

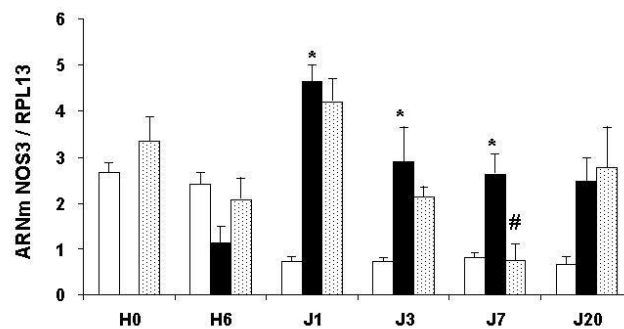
11a



11b



11c



7.1.3.Discussion

7.1.3.1.Discussion des méthodes : Modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase

Nous avons fait pour cette étude le choix du modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase. Le modèle d'emphysème induit par la fumée de cigarette est certes plus proche de l'emphysème post-tabagique humain et reste la référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans cette maladie. Les limites de ce dernier modèle doivent cependant être signalées. Tout d'abord, la susceptibilité à développer des lésions d'emphysème est dépendante de la lignée de souris utilisée³²². Surtout, ce modèle nécessite 6 mois d'exposition à la fumée de cigarette, à raison de 2 cigarettes par jour, 6 jours sur 7¹⁰¹. Cette contrainte est importante, en particulier dans le cadre d'une étude pharmacologique.

Le modèle d'emphysème induit par une instillation trachéale d'élastase unique a été établi il y a plus de 40 ans et a depuis été largement utilisé. Contre-intuitivement, ce modèle est proche de l'emphysème humain dans la mesure où le développement des lésions d'emphysème est lent et s'accompagne d'une réaction inflammatoire chronique essentiellement macrophagique, comme nous l'avons observé. Dans cet ordre d'idée, nos résultats préliminaires montrant une augmentation progressive du contenu pulmonaire en ARNm d'iNOS atteignant un plateau au 7^{ème} jour et persistant par la suite mettent en lumière le caractère chronique de ce modèle. De plus, les mécanismes physiopathologiques mis en jeu sont également très proches de ceux impliqués dans le cadre de l'emphysème humain. Enfin, il peut être argumenté que ce modèle est particulièrement proche de la pathologie observée chez les patients déficitaires en alpha-1-antitrypsine.

7.1.3.2.Discussion des résultats

7.1.3.2.1.Synthèse des résultats

Les principaux résultats de ce travail sont que 1) le KGF protège de l'inflammation pulmonaire, de l'activation dans le poumon des MMP-2 et -9, de la dégradation de l'ADN et du développement de l'emphysème pulmonaire dans les suites d'une instillation trachéale d'élastase, 2) qu'il est nécessaire pour que le KGF exerce son effet protecteur qu'il soit administré avant l'instillation d'élastase, et 3) que l'administration parentérale de KGF une fois l'emphysème constitué ne semble pas induire d'alvéologénèse compensatoire dans ce modèle. Par ailleurs, de même que chez l'homme emphysémateux, nous n'avons pas

observé d'augmentation de l'expression du KGF dans le poumon des animaux ayant reçu une instillation d'élastase.

7.1.3.2.2. Le KGF protège de l'emphysème induit par l'élastase mais n'induit pas d'alvéologénèse compensatoire

Il apparaît clairement de nos résultats que le KGF ne peut exercer un effet protecteur vis-à-vis du développement de l'emphysème que s'il est administré avant l'instillation trachéale d'élastase. Il est possible que l'effet anti-inflammatoire du KGF soit impliqué de façon prépondérante dans l'obtention de cet effet. Il est également possible que le développement de l'emphysème soit la conséquence retardée de phénomènes cytotoxiques directement imputables à l'élastase initialement instillée, et que les propriétés cytoprotectrices bien décrites du KGF, impliquant au premier chef la voie de signalisation Akt³²³, soient responsables de son effet protecteur.

7.1.3.2.3. Absence d'augmentation de l'expression pulmonaire du KGF dans le poumon emphysémateux

De même que chez les patients atteints d'emphysème, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression pulmonaire du KGF chez les souris ayant reçu une instillation trachéale d'élastase. Ce résultat est frappant si l'on considère d'une part que l'expression du KGF par les cellules mésenchymateuses est induite de façon intense par divers stimulus pro-inflammatoires, tels que l'interleukine-1 ou la prostaglandine E2²¹⁷, et d'autre part qu'une réaction inflammatoire chronique est présente dans le poumon emphysémateux, aussi bien chez l'homme qu'en conditions expérimentales chez l'animal. Ce résultat soutient l'hypothèse qu'un défaut d'activation des systèmes impliqués dans l'homéostasie de l'alvéole s'intègre à la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire.

7.1.3.2.4. Absence d'apoptose des cellules de l'alvéole après instillation d'élastase

Par ailleurs, un des résultats surprenants de ce travail est qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence d'apoptose dépendante des caspases dans les cellules alvéolaires des animaux ayant reçu une instillation trachéale d'élastase, en contradiction avec les données de la littérature¹⁶⁰. Dans nos expériences, un marquage nucléaire des cellules de l'alvéole par la méthode TUNEL, qui n'est pas spécifique de l'apoptose mais peut également détecter les cellules nécrotiques ou en cours de mort autophagique, était certes présent, mais ces

cellules n'étaient pas marquées par un anticorps anti-caspase-3 activée, caractéristique de l'apoptose dépendante des caspases. Avec ce dernier anticorps, un très net marquage des cellules thymiques, correspondant à un témoin positif chez des animaux de cet âge, était présent. Ces résultats nous ont conduit à interpréter le marquage par la méthode TUNEL comme indiquant une dégradation de l'ADN chromosomique non spécifique de l'apoptose et remettent en question le rôle de ce phénomène dans la constitution de l'emphysème induit par l'élastase.

7.2. Rôle de CRABP2 *in vivo* dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase

Ces expériences ont été menées en complément du deuxième article présenté dans le cadre de cette thèse (chapitre 6.2)

7.2.1.Objectifs

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si l'instillation trachéale d'élastase était suivie d'une modification du niveau d'expression de l'ARNm de CRBP2 dans le poumon de souris de fond génétique C57B6.

Nous avons ensuite cherché à déterminer *in vivo* si la faible expression de CRABP2 constatée dans les fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysémateux humain ainsi que dans le poumon des souris exposées à l'élastase jouait un rôle causal dans le développement de l'emphysème. Pour répondre à cette question, des souris dont le gène de CRABP2 avait été inactivé (CRABP2 $-/-$) par l'insertion d'une cassette néomycine ont été exposées à une instillation trachéale d'élastase, dans l'hypothèse que les souris CRABP2 $-/-$ développeraient un emphysème plus sévère que les souris sauvages.

7.2.2.Méthodes

Les souris CRABP2 $-/-$ qui ont été utilisées pour cette expérience ont été réalisées par l'équipe du Pr Pierre Chambon à Strasbourg sur un fond génétique 129/Sv. Leur phénotype en l'absence d'intervention est normal en dehors d'une fréquence plus élevée de la polydactylie³²⁴. Pour nos expériences, quatre mâles de génotype CRABP2 $-/-$ ont été croisés avec des femelles de même fond génétique. Les gestations ont ensuite été poursuivies chez des souris de fond génétique C57B6 après transfert d'embryon vers des souris porteuses. Les souriceaux étaient génotypés par PCR à partir de fragments de queue. L'élevage a été poursuivi à partir des animaux de génotype CRABP2 $+/-$ obtenus lors de ce premier croisement.

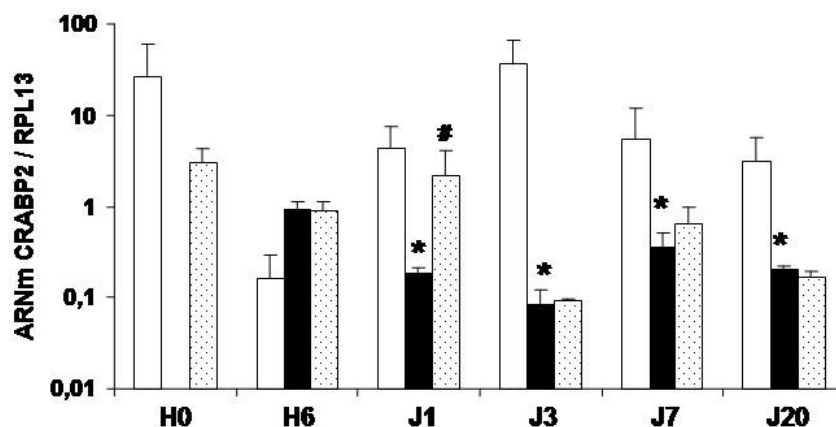
Des souris appartenant aux troisième et quatrième générations issues des mâles fondateurs ont subi une instillation d'élastase. Les animaux ont été sacrifiés au 20^e jour après l'instillation et les lésions d'emphysème ont été quantifiées par morphométrie informatisée sur le poumon fixé par le glutaraldéhyde comme décrit dans le chapitre précédent.

7.2.3.Résultats

7.2.3.1.L'expression pulmonaire de CRABP2 est durablement diminuée après une instillation trachéale d'élastase chez les souris sauvages

Afin de déterminer si des modifications de l'expression pulmonaire de CRABP2 étaient associées au développement de l'emphysème, le contenu pulmonaire en ARNm de CRABP2 a été déterminé. L'instillation d'élastase entraînait une diminution du contenu pulmonaire en ARNm de CRABP2, présente dès la 24^e heure après l'instillation et persistant les 20 jours suivants. Le pré-traitement par le KGF retardait la diminution du contenu pulmonaire en ARNm de CRABP2 induite par l'élastase (figure 12).

Figure 12 : Contenu pulmonaire en ARNm de CRABP2 rapporté à celui de la RPL13 dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale de sérum physiologique (histogrammes blancs), une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de sérum physiologique (histogrammes noirs), ou une instillation trachéale d'élastase précédée de trois injections sous-cutanées de 100 µg de KGF humain (histogrammes pointillés). Les souris étaient sacrifiées 6 heures ou 1, 3, 7 et 20 jours après l'instillation trachéale. * : $p < 0,05$ contre le groupe sérum physiologique. # : $p < 0,05$ contre le groupe élastase. Echelle logarithmique.



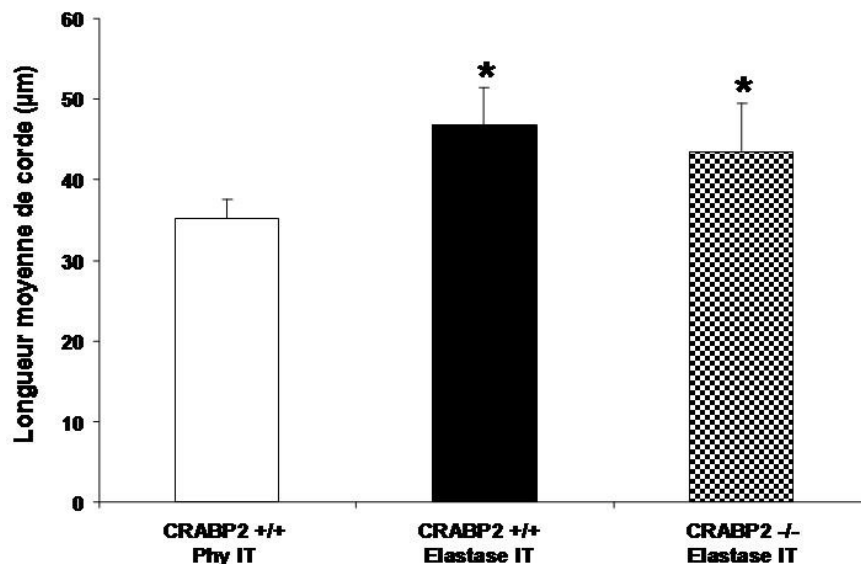
7.2.3.2. L'emphysème induit par l'élastase n'était pas aggravé chez les souris de génotype CRABP2^{-/-}

Le génotype CRABP2^{-/-} était sous-représenté parmi les souriceaux nés de parents CRABP2^{+/-}, représentant 16,4% des animaux contre 26,5% pour les animaux de génotype CRABP2^{+/+} et 57,1% pour les animaux CRABP2^{+/-}, indiquant une viabilité moindre des souris de génotype CRABP2^{-/-}.

Treize souris de génotype CRABP2^{-/-} et 21 souris de génotype CRABP2^{+/+} ont subi une instillation trachéale d'élastase pancréatique porcine. En raison du faible nombre de souris CRABP2^{-/-} disponibles et du phénotype pulmonaire normal précédemment rapporté chez ces animaux, seules 4 souris de génotype CRABP2^{+/+} ont subi une instillation trachéale d'élastase.

Les lésions d'emphysème étaient de sévérité équivalente chez les souris CRABP2^{+/+} et CRABP2^{-/-} (figure 13).

Figure 13 : Longueur moyenne de corde dans le poumon des souris CRABP2^{+/+} et CRABP2^{-/-} 20 jours après une instillation trachéale de sérum physiologique ou d'élastase. Barres : Moyennes et écarts-types. * : $p < 0,05$ contre CRABP2^{+/+}-phy IT.



7.2.4.Discussion

7.2.4.1.Diminution de l'expression pulmonaire de CRABP2 dans le poumon des souris exposées à l'élastase

Le premier résultat de cette série d'expériences est que l'expression de CRABP2, du moins au niveau de son ARNm, est réduite dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale d'élastase par rapport à celles ayant reçu une instillation de sérum physiologique, et ce de façon prolongée puisque cette diminution était encore présente 20 jours après l'agression initiale. Ce résultat renforce la notion que le développement des lésions d'emphysème dans ce modèle témoigne de modifications profondes et durables du métabolisme de l'organe induites par l'élastase, et non uniquement de la simple activité protéolytique de cette enzyme. La réduction de l'expression de CRABP2 dans le poumon semble par ailleurs être un point de convergence supplémentaire des voies physiopathologiques impliquées dans l'emphysème tabagique humain et l'emphysème induit par l'élastase chez l'animal.

Nous n'avons pas pu vérifier de façon fiable si la diminution du contenu pulmonaire en ARNm de CRABP2 se traduisait par une diminution de son expression au niveau protéique, l'anticorps anti-CRABP2 dont nous disposons ayant été développé chez la souris.

7.2.4.2.Absence d'inactivation conditionnelle de CRABP2 dans les fibroblastes pulmonaires

L'inactivation du gène CRABP2 ne semble pas modifier la sensibilité des souris vis-à-vis de l'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase. Ce résultat va à l'encontre mais ne permet cependant pas d'écarter un rôle dans le développement de l'emphysème de la faible expression de CRABP2 observée dans les fibroblastes de poumon emphysemateux humain. En effet, chez ces animaux, le gène CRABP2 était inactivé dans toutes les cellules de l'organisme, ce qui a pu entraîner de nombreux effets additionnels par rapport à une expression faible de CRABP2 limitée aux fibroblastes de poumon. En particulier, nous avons rapporté dans la deuxième partie des résultats que CRABP2 est fortement exprimé par les pneumocytes de type 2. CRABP2 étant impliquée dans la régulation de la mort cellulaire programmée²⁴⁴, il est envisageable que son inactivation globale ait limité l'étendue des phénomènes cytotoxiques au niveau des pneumocytes 2. La principale limite de cette expérience est donc l'absence de suppression conditionnelle, limitée aux fibroblastes pulmonaires, de CRABP2.

7.2.4.3. Absence de traitement par l'acide rétinoïque exogène

Par ailleurs, l'expérience a été conduite en l'absence de traitement des animaux par l'ATRA, n'explorant donc que la modulation par CRABP2 de l'effet des acides rétinoïques endogènes dans le développement de l'emphysème. Des expériences complémentaires incluant un groupe d'animaux traités par l'ATRA pourraient permettre de mettre en évidence le rôle de CRABP2 dans ce contexte, dans l'hypothèse où l'alvéologénèse compensatoire induite par l'ATRA chez les animaux emphysémateux serait abolie chez les animaux de génotype CRABP2^{-/-}.

8. Discussion générale, perspectives

8.1. Altération des systèmes d'alvéologénèse impliquant les fibroblastes pulmonaires dans le poumon emphysémateux humain

Nos résultats confirment la présence d'une profonde altération du phénotype des fibroblastes dans le poumon emphysémateux, intéressant particulièrement leurs fonctions impliquées au cours de l'alvéologénèse. Les fibroblastes de poumon emphysémateux sont caractérisés par une réduction de leur capacité de prolifération^{269, 281, 282}, un état sénescence¹⁷⁵, une diminution de leur sécrétion de HGF et une dérégulation de leur production de KGF³²⁵, enfin un défaut d'expression de l'ARNm de l'élastine en réponse à l'ATRA³²⁶. La perte par les fibroblastes pulmonaires de ces fonctions essentielles à l'alvéologénèse pourrait contribuer de façon majeure au développement de l'emphysème, maladie au cours de laquelle une absence de réparation ou de régénération des alvéoles aboutit à la perte de tissu pulmonaire.

L'emphysème est sur le plan anatomique une pathologie unique en ce sens qu'il est caractérisé essentiellement par une perte nette de parenchyme pulmonaire, à l'inverse de la plupart des autres pathologies chroniques dégénératives du poumon au cours desquelles les processus fibrosants sont au premier plan. De ce fait, les données recueillies dans d'autres modèles pathologiques peuvent difficilement être extrapolées à l'emphysème. Une des rares pathologies proches de l'emphysème, en ce sens qu'elle est également caractérisée par une perte de substance d'un tissu et intéresse un tissu riche en fibres élastiques, est la constitution d'ulcères cutanés chroniques. Il est notable qu'au cours de cette pathologie une capacité de prolifération plus faible et une sénescence précoce des fibroblastes soient associées à un retard de cicatrisation^{327, 328}.

Dans l'ensemble, ces données indiquent une association entre une dérive des fibroblastes vers un phénotype sénescence et la constitution d'une perte de substance dans deux tissus certes très distincts sur le plan structurel mais ayant en commun une grande richesse en fibres élastiques, et soutiennent l'hypothèse que cette association posséderait un caractère causal au cours de l'emphysème pulmonaire.

8.2. Implication du KGF et de CRABP2 dans le poumon adulte emphysémateux *in vivo* chez l'animal

L'implication possible des systèmes d'alvéologénèse dans le poumon emphysémateux a été démontrée par l'induction dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase d'une régénération alvéolaire compensatoire en réponse à des agents pharmacologiques ou à l'implantation dans le poumon de populations cellulaires particulières (Cf chapitre 4.5). Le HGF, aux propriétés angiogéniques remarquables, semble jouer un rôle central dans ce phénomène. Nos données recueillies *in vitro* avec les fibroblastes cultivés à partir de poumon emphysémateux humain nous ont amené à explorer le rôle du KGF et de CRABP2 dans ce modèle.

8.2.1. Implication du KGF ?

Dans l'hypothèse où le KGF, un facteur de croissance ciblant les cellules épithéliales, puisse induire une alvéologénèse compensatoire dans ce modèle, nous avons traité des souris exposées à une instillation trachéale d'élastase par ce facteur. Dans ces expériences, le KGF ne protégeait du développement de l'emphysème que s'il était administré avant l'instillation d'élastase, et n'induisait pas de régénération alvéolaire quand il était administré à distance, une fois les lésions constituées. Ce résultat mis en parallèle avec l'effet régénérateur bien documenté du HGF suggère qu'un signal angiogénique fort soit indispensable à l'alvéologénèse dans le poumon adulte, ce qui est cohérent avec les données recueillies dans le cadre de l'alvéologénèse développementale²⁵⁴.

8.2.2. Implication de CRABP2 ?

L'acide rétinoïque, qui semble favoriser dans certaines espèces la régénération pulmonaire, stimule également la néoangiogénèse dans le poumon des chiens ayant subi une pneumonectomie²⁵². Nos données indiquent que la voie de signalisation classique des acides rétinoïques, c'est-à-dire celle des RAR et RXR, ne jouerait peut-être pas un rôle essentiel dans le développement de l'emphysème chez les souris exposées à l'élastase. En effet, l'inactivation du gène CRABP2, qui potentialise de façon majeure la liaison des acides rétinoïques aux RAR et qui est fortement exprimé par les pneumocytes de type 2 et les fibroblastes pulmonaires dans le poumon humain, ne modifiait pas la sévérité ou le type des lésions d'emphysème induit par l'élastase par rapport au génotype sauvage.

Ce résultat soulève l'hypothèse que les propriétés régénératrices et homéostatiques de l'acide rétinoïque endogène puissent soit être balancées par d'autres propriétés de cette molécule qui seraient délétères au maintien de l'architecture du poumon normal, soit ne pas être médiées par les RAR. De fait, d'autres protéines cytoplasmiques ont la capacité de lier les acides rétinoïques, certains de ces récepteurs accessoires aux acides rétinoïques fonctionnant comme des facteurs de transcription. Par exemple, il a été très récemment rapporté que peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR- β/δ), qui comme les RAR exerce une activité de facteur de transcription après formation d'un dimère avec un RXR, peut lier l'ATRA quand CRABP2 est faiblement exprimée dans les cellules comparativement à la protéine Fatty Acid Binding Protein 5 (FABP-5), avec pour conséquence des effets opposés sur le contrôle de la survie cellulaire³¹⁰. La détermination du niveau d'expression de PPAR- β/δ et FABP-5 dans le poumon emphysémateux humain, les fibroblastes cultivés à partir de ces échantillons humains et à partir du poumon des souris CRABP2^{-/-}, ainsi que l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes de ce récepteur pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de l'ATRA, de CRABP2 et des RAR dans le développement de l'emphysème.

Par ailleurs, la démonstration d'une expression faible de CRABP2 dans les fibroblastes de poumon emphysémateux humain, mis en parallèle avec l'absence d'effet thérapeutique de cette molécule chez les patients atteints d'emphysème, amène à proposer l'évaluation en temps que thérapeutique de l'emphysème de rétinoïdes synthétiques ayant la capacité de lier et d'activer les RAR en l'absence de CRABP2.

8.3.Conséquences en termes de projets thérapeutiques pour l'homme

8.3.1.Les cibles potentielles pour un traitement régénérateur ne sont pas présentes dans le poumon emphysémateux

Les données disponibles concernant le rôle des systèmes d'alvéologénèse au cours de l'emphysème pulmonaire peuvent se résumer de la façon suivante :

- La stimulation pharmacologique des récepteurs du HGF et de l'ATRA induit l'alvéologénèse dans un modèle animal d'emphysème, celle du récepteur du KGF stimule celle-ci dans le modèle d'alvéologénèse induite dans le poumon restant par la pneumonectomie,
- Les fibroblastes pulmonaires, qui sont source ou cible de ces composés dans le poumon et jouent un rôle central au cours de l'alvéologénèse, présentent au cours de

l'emphysème un phénotype altéré, expriment le HGF et le KGF de façon faible ou dérégulée et présentent une altération significative du point de vue physiopathologique de la voie de réponse à l'ATRA.

Cet état de fait amène à la conclusion que les principaux effecteurs d'un traitement à visée régénératrice ne sont pas présents dans le poumon emphysémateux humain, et que l'obtention d'une régénération alvéolaire dans ce contexte pourrait nécessiter le rétablissement dans le poumon d'une population de fibroblastes pulmonaires de phénotype conservé, ayant la capacité de synthétiser et d'organiser la matrice extracellulaire du poumon ainsi que de stimuler l'expansion des autres populations cellulaires de l'alvéole.

8.3.2.Hypothèses pour le rétablissement d'une population de fibroblastes ayant le potentiel de régénérer le tissu alvéolaire

Le rétablissement d'une population de fibroblastes sains et ayant le potentiel de régénérer le poumon atteint d'une pathologie dégénérative chronique telle que l'emphysème est un objectif ambitieux. Un certain nombre de voies possibles pour tendre vers cet objectif peuvent cependant être évoquées. D'une part, l'implantation dans le poumon de cellules mésenchymateuses d'origine extra-pulmonaire, nommées fibrocytes, a été rapportée par plusieurs auteurs. D'autre part, le recrutement de fibroblastes sains pourrait être obtenu à partir de cellules d'origine locale, qu'il s'agisse de progéniteurs mésenchymateux ou des cellules épithéliales et endothéliales par l'intermédiaire d'une transition de ces cellules vers un phénotype mésenchymateux.

8.3.2.1.Apport de cellules mésenchymateuses d'origine extra-pulmonaire : Fibrocytes

L'implantation dans le poumon de cellules d'origine extra-pulmonaire et en particulier d'origine hématopoïétique a été rapportée dans plusieurs modèles de déplétion alvéolaire, dont le modèle d'emphysème induit par l'élastase²⁸⁷ et le modèle d'alvéologénèse induite par la pneumonectomie¹⁹⁸, ces cellules adoptant alors un phénotype épithélial ou endothélial. Dans ces modèles, l'implantation de ces cellules restait limitée en termes quantitatifs et ne semblait pas jouer un rôle majeur. En revanche, l'implantation dans le poumon de cellules mésenchymateuses d'origine hématopoïétique, dénommées fibrocytes, semble jouer un rôle important au cours du processus de fibrogénèse et pourrait être manipulée dans le sens de l'induction d'une régénération du poumon.

Les fibrocytes sont des cellules circulantes possédant des caractéristiques propres aux cellules mésenchymateuses, gagnant les tissus lésés et participant à leur réparation, comme cela a été décrit au niveau de la peau³²⁹. Ils sont définis par la coexpression des marqueurs de surface CD45 et CD34, respectivement caractéristiques des leucocytes et des cellules d'origine hématopoïétique, et du collagène-1, caractéristique des cellules mésenchymateuses³³⁰. L'extravasation des fibrocytes vers les tissus lésés et leur implantation dans ceux-ci est sous la dépendance d'un réseau complexe de facteurs chimiotactiques et de molécules d'adhésion. Les fibrocytes humains expriment les récepteurs des chimiokines CCR3, CCR5, CCR7 et CXCR4³³¹. La chimiokine CXCL12, qui lie le récepteur CXCR4, semble avoir une position centrale dans le recrutement des fibrocytes vers les tissus³³². Ces facteurs solubles pourraient être utilisés pour induire le recrutement de fibrocytes dans le poumon emphysémateux.

8.3.2.2.Utilisation de cellules d'origine locale

8.3.2.2.1.Cellules souches mésenchymateuses pulmonaires

Les cellules souches mésenchymateuses sont une population de progéniteurs cellulaires possédant la capacité de se différencier en cellules mésenchymateuses de différents types. Ces cellules peuvent être isolées à partir du tissu hématopoïétique mais aussi à partir de tissus non hématopoïétiques, dont les bronches³³³.

Les cellules souches mésenchymateuses résident au long cours dans le poumon et appartiennent aux cellules résidentes de l'alvéole. En effet, il a été rapporté qu'il était possible de les isoler à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire jusqu'à 11 ans après une transplantation pulmonaire, ce qui démontre leur capacité à rester dans le poumon au moins pour cette période³³⁴. Ces cellules souches pourraient représenter une source de fibroblastes alvéolaires aptes à régénérer le tissu alvéolaire.

8.3.2.2.2.Transition épithélio-mésenchymateuse ou endothélio-mésenchymateuse

Transition épithélio-mésenchymateuse

Le terme de transition épithélio-mésenchymateuse recouvre les phénomènes de glissement phénotypique amenant une cellule de phénotype initialement épithélial vers un phénotype mésenchymateux, généralement celui de myofibroblaste. Elle a été rapportée d'abord dans une lignée de cellules épithéliales mammaires sous l'influence du Transforming Growth

Factor- β (TGF- β) via son récepteur de type 1³³⁵. Les principales étapes de ce phénomène sont la perte par les cellules épithéliales de leurs jonctions serrées et de leur polarité, une réorganisation de leur cytosquelette d'actine puis l'expression de marqueurs caractéristiques des fibroblastes.

La transition épithélio-mésenchymateuse pourrait représenter une source de cellules mésenchymateuses dans le poumon, notamment à partir des pneumocytes de type 2. *In vitro*, le traitement de pneumocytes 2 de rat par le TGF- β pendant 6 jours induit leur transformation en cellules de type fibroblastique, apprécié par des critères morphologiques et immunohistochimiques. Les cellules exposées au TGF- β perdent l'expression du Thyroid Transcription Factor-1, de l'aquaporine-5, de la zonula occludens-1 et des cytokératines, marqueurs des pneumocytes de type 2, adoptent une morphologie de type fibroblastique, enfin gagnent l'expression de marqueurs fibroblastiques tels que l' α -actine du muscle lisse, le collagène I, la vimentine et la desmine³³⁶. *In vivo*, la surexpression dans le poumon du TGF- β induit la transformation d'une partie de l'épithélium alvéolaire en cellules de type fibroblastique comme cela a pu être suivi chez des souris exprimant la β -galactosidase au niveau des cellules épithéliales alvéolaires³³⁷. De plus, il est intéressant de noter que la présence de TGF- β sous forme soluble n'est pas nécessaire à l'activation de son récepteur. En effet, la mise en culture de cellules épithéliales alvéolaires sur un substrat riche en fibronectine, le composant principal de la matrice extracellulaire provisoire présente dans les tissus lésés, induit directement l'activation de cette voie de signalisation par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha v \beta 6$ ³³⁷.

Transition endothélio-mésenchymateuse

De façon similaire aux phénomènes observés dans le cadre de la transition épithélio-mésenchymateuse, la transformation de cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux a été rapportée, sous le nom de transition endothélio-mésenchymateuse. Ces observations démontrent de façon plus large la plasticité du phénotype d'un type cellulaire donné et récusent la notion d'irréversibilité de la différenciation cellulaire. Les principaux inducteurs de la transition endothélio-mésenchymateuse sont le TGF- β , Wnt, la voie Notch. Les mécanismes de ce phénomène sont proches de ceux de la transition épithélio-mésenchymateuse. Celui-ci peut aboutir à la formation à partir de l'endothélium de cellules spécialisées tout à fait fonctionnelles comme par exemple des cardiomyocytes³³⁸.

Il est notable qu'un des acteurs centraux de l'activation du récepteur du TGF- β , l'intégrine $\alpha v \beta 6$, ait également été impliqué dans le développement de lésions pulmonaires de type emphysemateux, les souris dont le gène de l'intégrine $\alpha v \beta 6$ a été inactivé développant

spontanément de telles lésions³³⁹. Il est envisageable que l'entretien à un faible niveau de phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse ou endothélio-mésenchymateuse sous l'influence de cette voie participe au maintien au long cours d'une population de fibroblastes actifs dans le tissu alvéolaire et préserve ainsi le potentiel de régénération de ce tissu au fil du temps, du moins chez la souris. Dans cette optique, la stimulation thérapeutique du récepteur du TGF- β pourrait représenter une des approches possibles pour la reconstitution d'une population de fibroblastes alvéolaires dans le poumon emphysémateux humain.

Le recrutement de cellules mésenchymateuses à partir de fibrocytes circulants, de cellules souches mésenchymateuses d'origine locale ou enfin par l'intermédiaire de la transition vers un phénotype mésenchymateux des autres types cellulaires de l'alvéole pourrait permettre de rétablir une population de fibroblastes fonctionnels dans le poumon emphysémateux, aptes à organiser la régénération du tissu alvéolaire. Il faut cependant noter qu'à ce jour ces voies n'ont pas été impliquées dans l'alvéologénèse.

8.3.3.Problèmes thérapeutiques

En plus des difficultés liées au rétablissement d'une population de fibroblastes fonctionnels, d'autres problèmes potentiels peuvent être soulevés concernant la faisabilité de l'induction thérapeutique de l'alvéologénèse dans le poumon emphysémateux. L'utilisation de facteurs de croissance, vraisemblablement un des piliers de ces thérapeutiques, n'est pas anodine et peut être à l'origine de pathologies secondaires. De plus, les interactions mécaniques entre la paroi thoracique et le poumon, qui jouent un rôle essentiel au cours du développement pulmonaire comme au cours de l'alvéologénèse post-pneumonectomie, sont considérablement modifiées dans le poumon emphysémateux siège d'une hyperinflation statique et contenu dans une cage thoracique distendue.

8.3.3.1.Problèmes liés à l'utilisation thérapeutique de facteurs de croissance

8.3.3.1.1.Risque de cancer

L'administration au long cours de facteurs de croissance tels que le HGF ou le KGF, en particulier à des patients par ailleurs à risque élevé du fait de leur passé tabagique quasi-constant, pose la question du risque de développement de néoplasies pulmonaires ou extra-pulmonaires. En effet, l'activation endogène des récepteurs de ces facteurs de croissance est une des étapes de la tumorigénèse, et il a été démontré chez la souris que la

surexpression du HGF dans les voies aériennes entraînait une plus grande fréquence des carcinomes bronchiques en cas d'exposition à la nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, un carcinogène présent dans la fumée de tabac³⁴⁰. Chez l'homme atteint d'un carcinome broncho-pulmonaire, l'expression par la tumeur du HGF et de son récepteur c-met est un marqueur de mauvais pronostic³⁴¹, de même que celle du KGF et de son récepteur FGFR2IIIb³⁴², alors que l'angiogénèse est une étape importante de la diffusion métastatique des tumeurs¹⁹⁴. Le contrôle du risque néoplasique pourrait être une des difficultés majeures des stratégies thérapeutiques visant l'induction de l'alvéologénèse dans le poumon adulte.

8.3.3.1.2. Risque de fibrose pulmonaire

L'induction des mécanismes de réparation du tissu alvéolaire pourrait aboutir à une accumulation dans les cloisons alvéolaires néoformées de composants de la matrice extracellulaire en excès, c'est-à-dire à une fibrose pulmonaire. Ce risque est d'autant plus envisageable que certains facteurs candidats à une utilisation thérapeutique sont impliqués également dans la physiopathologie des pathologies interstitielles fibrosantes pulmonaires. Le TGF- β joue un rôle important dans l'homéostasie de l'alvéole. L'activation de son récepteur via l'intégrine $\alpha\beta 6$ est d'ailleurs nécessaire à celle-ci³³⁹. Ces éléments font supposer qu'un certain degré d'activation de cette voie puisse être nécessaire à l'induction de l'alvéologénèse. L'utilisation du TGF- β serait cependant probablement délicate dans la mesure où ce facteur semble occuper une place centrale dans les processus de fibrogénèse dans le poumon. Le TGF- β est fortement exprimé dans le poumon atteint de fibrose pulmonaire idiopathique³⁴³ et sa surexpression dans le poumon de rats entraîne le développement d'une fibrose pulmonaire³⁴⁴. Un contrôle très fin de l'activation du récepteur du TGF- β serait probablement indispensable à l'obtention d'un tissu pulmonaire fonctionnel après induction thérapeutique de l'alvéologénèse. De même, le PDGF, qui est nécessaire à l'alvéologénèse développementale²³⁴, est impliqué dans la physiopathologie de la sclérodermie²³⁵, maladie caractérisée par une activation excessive des fibroblastes aboutissant à une fibrose touchant de nombreux organes, ainsi que dans celle de la fibrose pulmonaire idiopathique³⁴⁵.

8.3.3.2.Problématique des interactions paroi-poumon dans une cage thoracique de taille fixe

Les interactions mécaniques s'établissant entre le poumon et la cage thoracique sont un des stimulus majeurs de la croissance pulmonaire au cours du développement et interviennent également chez l'adulte dans le contexte de l'alvéologénèse compensatoire dans les suites d'une pneumonectomie, par l'intermédiaire du déplacement du médiastin²¹⁶. Dans ces situations, la force transmise par la paroi thoracique, via le vide pleural, au poumon en croissance tend à en augmenter le volume et exerce une traction sur les parois alvéolaires existantes.

La situation est toute différente dans le cas du poumon emphysémateux placé dans une cage thoracique adulte de taille fixe. En effet, dans ces conditions, l'hyperinflation caractéristique du poumon emphysémateux et la perte considérable de sa force de rétraction élastique par rapport à celle de la paroi aboutit à une positivation de la pression intra pleurale lorsque le poumon est au repos, c'est-à-dire à la capacité résiduelle fonctionnelle, ainsi que durant la plus grande partie du cycle ventilatoire. Ce renversement du régime de pression aboutit à ce que la force ne soit plus transmise depuis la paroi thoracique vers le poumon mais depuis le poumon vers la cage thoracique, la déformant peu à peu et en augmentant le volume. Dans ces conditions, aucune traction n'est exercée depuis la cage thoracique vers les cloisons alvéolaires qui à l'extrême peuvent se collaber comme cela est parfois observé au voisinage de bulles d'emphysème volumineuses.

Le retentissement de l'absence de transmission de forces de rétraction élastique depuis la paroi thoracique vers les cloisons alvéolaires sur le développement des lésions d'emphysème et en particulier sur l'absence de réparation des structures alvéolaires n'est pas connu, mais il pourrait représenter un obstacle important aux thérapeutiques visant à induire une alvéologénèse compensatoire chez ces patients. Une approche susceptible de rétablir un équilibre plus proche de la normale entre les forces de rétraction élastiques de la paroi thoracique et du poumon pourrait être la résection chirurgicale du parenchyme le plus distendu, comme cela est déjà proposé aux patients atteints d'emphysème hétérogène⁶, parallèlement à l'activation des voies de signalisation contribuant à l'alvéologénèse.

8.3.3.3. Une compréhension plus complète des mécanismes du développement pulmonaire est nécessaire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Il est vraisemblable que la mise au point éventuelle de thérapeutiques permettant l'induction de l'alvéologénèse dans le poumon adulte dérive en grande partie des données recueillies dans le cadre de l'alvéologénèse développementale, domaine de recherche dans lequel des progrès majeurs sont régulièrement accomplis. L'alvéologénèse développementale est un événement extrêmement complexe mettant en jeu de nombreux types cellulaires gouvernés par de nombreux facteurs solubles et facteurs de transcription fonctionnant en réseau, l'interaction par exemple d'un facteur de transcription donné avec différents partenaires moléculaires entraînant des effets différents^{346, 347}. Les principaux facteurs solubles et facteurs de transcription identifiés comme jouant un rôle au cours de cette phase du développement sont rassemblés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Facteurs solubles et facteurs de transcription participant à l'organisation de la phase d'alvéologénèse du développement pulmonaire, d'après³⁴⁷

	Facteur	Sources ou distribution	Cibles
Facteurs solubles	EMAP II	Mésenchyme	Endothélium Mésenchyme,
	FGF-2	Mésenchyme	endothélium
	FGF-7	Mésenchyme	Epithélium
	FGF-18	Mésenchyme	Mésenchyme
	IGF-1	Epithélium, macrophages	Mésenchyme
	Midkine	Epithélium, mésenchyme	Multiples
	PDGFA	Epithélium, macrophages	Mésenchyme
	TGF- β 1	Epithélium, mésenchyme	Epithélium, mésenchyme
	VEGF	Epithélium	Endothélium
Facteurs de Transcription	FOXA2	Epithélium	
	GATA6	Epithélium	
	RAR α	Mésenchyme, épithélium	
	RAR β	Mésenchyme, épithélium	
	RAR γ /RXR α	Mésenchyme, épithélium	

Par ailleurs, dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes de l'emphysème, au cours duquel une absence d'alvéologénèse est observée, l'identification de facteurs répresseurs de l'alvéologénèse, dont l'expression marquerait la fin de cette phase du développement, pourrait avoir un grand intérêt. Or, dans une étude menée spécifiquement sur les fibroblastes recueillis à partir de poumon prélevé à différents stades

du développement chez le rat, deux gènes, *Sfn4* et *Opn*, étaient fortement exprimés à la fin de la phase d'alvéologénèse, leur expression augmentant d'un facteur compris entre 23 et 28 entre le 7^e et le 21^e jour de vie extra-utérine. Les fonctions de *Sfn4* et *Opn* sont, pour le premier, de réprimer la prolifération cellulaire et pour le deuxième, sous sa forme soluble, d'induire le remodelage de la matrice extra cellulaire. Ces deux gènes pourraient jouer un rôle au cours de l'emphysème.

Enfin, il est possible que la récapitulation de l'alvéologénèse dans le poumon adulte ne puisse suffire à elle seule à améliorer la fonction de l'appareil respiratoire dans son entier, compte tenu de l'atteinte bronchique et bronchiolaire qui est associée à la destruction des alvéoles et qui participe grandement à l'altération des échanges gazeux au cours de cette maladie¹⁷⁸, et qu'il soit nécessaire dans ce but de réactiver les mécanismes actifs au cours de la troisième phase du développement pulmonaire, c'est-à-dire ceux gouvernant le développement non dichotomique des voies aériennes.

9. Conclusion

L'établissement de thérapeutiques régénératrices, induisant l'alvéologénèse, pour le traitement de l'emphysème voire est un des objectifs majeurs de la médecine respiratoire. Déjà ambitieux, ce projet est rendu plus difficile encore par l'existence de modifications majeures du phénotype des cellules qui en seraient les premiers effecteurs, les fibroblastes pulmonaires.

Au cours de l'emphysème, les fibroblastes pulmonaires présentent une sénescence précoce et prolifèrent peu. De plus, comme nous l'avons vu dans le cadre de cette thèse, ces cellules sécrètent de façon réduite ou non stimuable le HGF et le KGF, des facteurs de croissance essentiels à la prolifération des autres types cellulaires du poumon profond et jouant un rôle important dans l'homéostasie du tissu alvéolaire, alors que leur capacité à synthétiser l'élastine, le composant principal de la matrice extra cellulaire du poumon, en réponse à l'acide rétinolique, un stimulus majeur de l'alvéologénèse, est abolie.

Du fait de ces altérations, il est vraisemblable que la seule stimulation des cellules résidentes de l'alvéole, en premier lieu les fibroblastes, ne puisse suffire à induire l'alvéologénèse dans le poumon emphysemateux. Dans ces conditions, il apparaît nécessaire que l'effort de recherche consacré à l'élucidation des mécanismes de l'alvéologénèse développementale, indispensable à l'identification des systèmes biologiques devant être activés ou réprimés dans ce but, s'accompagne en parallèle d'un effort visant à rétablir dans le poumon une population de fibroblastes normaux, que ce soit par l'intermédiaire du recrutement de cellules d'origine pulmonaire ou extra-pulmonaire.

L'emphysème pulmonaire est une pathologie dont le poids en termes de santé publique est majeur et croissant, ce qui justifie que des ressources significatives soient attribuées à l'exploration de ses mécanismes et à la recherche de nouvelles thérapeutiques pour cette maladie. Par ailleurs, même si l'éradication souhaitable du tabagisme entraînerait à long terme une quasi-disparition de cette maladie, les éventuelles thérapeutiques alvéologéniques mises au point pour son traitement pourraient être appliquées à l'ensemble des pathologies caractérisées par la perte de parenchyme pulmonaire.

10. Annexes

10.1. Annexe 1 : Defect of alveolar regeneration in pulmonary emphysema : role of lung fibroblasts

Plantier L, Boczkowski J, Crestani B.

Defect of alveolar regeneration in pulmonary emphysema: role of lung fibroblasts.

Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2007;2(4):463-9. Review. PMID: 18268920

10.2. Annexe 2 : Role of the inducible nitric oxide synthase in elastase-induced emphysema

Devant la forte induction de l'expression de NOS-2 dans le poumon des souris ayant reçu une instillation trachéale d'élastase, prévenue de la même façon que le développement des lésions d'emphysème par le pré-traitement par le KGF, nous avons émis l'hypothèse que NOS-2 joue un rôle causal dans le développement de l'emphysème. Cette hypothèse a été testée dans le même modèle à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de NOS-2, le 1400W, et de souris NOS-2 $-/-$. Ce travail a été réalisé par le Dr Laurent Boyer dans le cadre de son M2 puis de sa thèse, et a fait l'objet d'un résumé présenté lors du congrès de l'American Thoracic Society en mai 2008 à Toronto.

Role of the inducible nitric oxide synthase in Elastase- induced emphysema

Laurent Boyer¹, Laurent Plantier^{1,2}, Delphine Goven¹, Jacques Callebert¹, Bruno Crestani^{1,2}, Jorge Boczkowski¹

¹ :INSERM U700, ² : Services de Pneumologie, Hôpital Bichat, Paris, France

laurent.plantier@bch.aphp.fr

Background

The inducible nitric oxide synthase (iNOS) produces large amounts of NO which in combination with superoxide induces protein nitrosylation and contributes to a number of chronic degenerative diseases. iNOS is overexpressed in the lung of patients with pulmonary emphysema but the pathophysiological significance of this finding is unknown. The aim of this study was to determine whether iNOS plays a role in elastase-induced emphysema.

Methods

C57B6 mice received a tracheal instillation of elastase or saline and were treated subcutaneously with 1400W, a specific iNOS inhibitor, or placebo. The influx of inflammatory cells was determined in BALF at day 1 post-instillation. At day 7, the pulmonary expression of iNOS was determined by RTPCR, western blotting and confocal microscopy while the expression of 3-nitrotyrosine, a marker of protein nitrosylation, was determined by fluorescence and confocal microscopy. Emphysema lesions were quantified by the measurement of the mean chord length of airspaces at day 20.

Results

iNOS was upregulated at the mRNA and protein level in the lung of elastase-treated mice. Its expression seemed to involve multiple cell types. A 12-fold increase in the number of 3-nitrotyrosine-expressing cells was observed in the lung of elastase-treated mice. These cells had the morphological characteristics of alveolar type 2 cells. 1400W reduced by 73% the elastase-induced elevation in the number of cells expressing 3-nitrotyrosine but had no anti-inflammatory effect and did not prevent emphysema.

Conclusion

After a tracheal instillation of elastase, iNOS is upregulated in the lung and induces the accumulation of nitrosylated proteins in alveolar type 2 cells. These phenomenon are not involved in the development of emphysema in this model.

11. Références

1. Halbert, R. J. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 28, 523-32 (2006).
2. Giraud, V., Ameille, J. & Chinet, T. [Epidemiology of COPD in France]. *Presse Med* 37, 377-84 (2008).
3. Fuhrman, C., Delmas, M., Nicolau, J. & E, J. Mortalité liée à la BPCO en France métropolitaine, 1979-2003. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 242-245 (2007).
4. Sutherland, E. R. & Cherniack, R. M. Management of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350, 2689-97 (2004).
5. Calverley, P. M. et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 356, 775-89 (2007).
6. Fishman, A. et al. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 348, 2059-73 (2003).
7. Wood, D. E. et al. A multicenter trial of an intrabronchial valve for treatment of severe emphysema. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133, 65-73 (2007).
8. Hosenpud, J. D. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: fifteenth official report--1998. *J Heart Lung Transplant* 17, 656-68 (1998).
9. Thabut, G. et al. Survival after bilateral versus single lung transplantation for patients with chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective analysis of registry data. *Lancet* 371, 744-51 (2008).
10. Thielen, A., Klus, H. & Muller, L. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Exp Toxicol Pathol* 60, 141-156 (2008).
11. Maritz, G. S. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation of rats induce microscopic emphysema in the offspring. *Exp Lung Res* 28, 391-403 (2002).
12. Zhang, J. J. & Smith, K. R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: measurements, health impacts, and interventions. *Environ Health Perspect* 115, 848-55 (2007).
13. Matheson, M. C. et al. Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 60, 645-51 (2005).
14. Hart, J. E., Laden, F., Schenker, M. B. & Garshick, E. Chronic obstructive pulmonary disease mortality in diesel-exposed railroad workers. *Environ Health Perspect* 114, 1013-7 (2006).
15. Snider, G. L., Hayes, J. A., Korthy, A. L. & Lewis, G. P. Centrilobular emphysema experimentally induced by cadmium chloride aerosol. *Am Rev Respir Dis* 108, 40-8 (1973).
16. Chen, H. W. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J* 20, 2393-5 (2006).
17. Goldstein, D. S., Karpel, J. P., Appel, D. & Williams, M. H., Jr. Bullous pulmonary damage in users of intravenous drugs. *Chest* 89, 266-9 (1986).
18. Schmidt, R. A. et al. Panlobular emphysema in young intravenous Ritalin abusers. *Am Rev Respir Dis* 143, 649-56 (1991).
19. Diaz, P. T., Clanton, T. L. & Pacht, E. R. Emphysema-like pulmonary disease associated with human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med* 116, 124-8 (1992).
20. Petrache, I. et al. HIV associated pulmonary emphysema: a review of the literature and inquiry into its mechanism. *Thorax* 63, 463-9 (2008).
21. Coxson, H. O. et al. Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 748-52 (2004).
22. Sahebji, H. & Wirman, J. A. Emphysema-like changes in the lungs of starved rats. *Am Rev Respir Dis* 124, 619-24 (1981).

23. Burrows, B., Knudson, R. J., Cline, M. G. & Lebowitz, M. D. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 115, 195-205 (1977).
24. McCloskey, S. C. et al. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1419-24 (2001).
25. Lieberman, J., Winter, B. & Sastre, A. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest* 89, 370-3 (1986).
26. Venembre, P. et al. Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 346, 171-4 (1994).
27. Perlmutter, D. H. Pathogenesis of chronic liver injury and hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatr Res* 60, 233-8 (2006).
28. Lomas, D. A. & Parfrey, H. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 59, 529-35 (2004).
29. Stoller, J. K. & Aboussouan, L. S. alpha1-Antitrypsin deficiency . 5: intravenous augmentation therapy: current understanding. *Thorax* 59, 708-12 (2004).
30. Parmar, J. S. et al. Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 723-30 (2002).
31. Mahadeva, R. et al. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol* 166, 377-86 (2005).
32. Samilchuk, E. I. & Chuchalin, A. G. Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene and chronic lung disease. *Lancet* 342, 624 (1993).
33. Collod-Beroud, G. & Boileau, C. Marfan syndrome in the third Millennium. *Eur J Hum Genet* 10, 673-81 (2002).
34. Wood, J. R., Bellamy, D., Child, A. H. & Citron, K. M. Pulmonary disease in patients with Marfan syndrome. *Thorax* 39, 780-4 (1984).
35. Robbesom, A. A. et al. Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. *Mod Pathol* 21, 297-307 (2008).
36. Ayres, J. G., Pope, F. M., Reidy, J. F. & Clark, T. J. Abnormalities of the lungs and thoracic cage in the Ehlers-Danlos syndrome. *Thorax* 40, 300-5 (1985).
37. Cupo, L. N. et al. Ehlers-Danlos syndrome with abnormal collagen fibrils, sinus of Valsalva aneurysms, myocardial infarction, panacinar emphysema and cerebral heterotopias. *Am J Med* 71, 1051-8 (1981).
38. Ringpfeil, F. Selected disorders of connective tissue: pseudoxanthoma elasticum, cutis laxa, and lipoid proteinosis. *Clin Dermatol* 23, 41-6 (2005).
39. Urban, Z., Gao, J., Pope, F. M. & Davis, E. C. Autosomal dominant cutis laxa with severe lung disease: synthesis and matrix deposition of mutant tropoelastin. *J Invest Dermatol* 124, 1193-9 (2005).
40. Huchtagowder, V. et al. Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet* 78, 1075-80 (2006).
41. Loeys, B. et al. Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Mol Genet* 11, 2113-8 (2002).
42. Wisnieski, J. J. et al. Hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. Clinical and serologic findings in 18 patients. *Medicine (Baltimore)* 74, 24-41 (1995).
43. Seifart, C. et al. TNF-alpha-, TNF-beta-, IL-6-, and IL-10-promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens* 65, 93-100 (2005).
44. van der Pouw Kraan, T. C. et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun* 3, 436-9 (2002).
45. Rohde, G. et al. Association of the ASP299GLY TLR4 polymorphism with COPD. *Respir Med* 100, 892-6 (2006).
46. Celedon, J. C. et al. The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 13, 1649-56 (2004).

47. Su, Z. G., Wen, F. Q., Feng, Y. L., Xiao, M. & Wu, X. L. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease in Chinese population. *Acta Pharmacol Sin* 26, 714-20 (2005).
48. Hirano, K. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 18, 748-52 (2001).
49. Joos, L. et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 11, 569-76 (2002).
50. Demeo, D. L. et al. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 78, 253-64 (2006).
51. Zhu, G. et al. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 167-73 (2007).
52. He, J. Q. et al. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 323-8 (2002).
53. Lee, Y. L. et al. Polymorphisms of p53 and p21 genes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Lab Clin Med* 147, 228-33 (2006).
54. Minematsu, N. et al. Common functional polymorphisms in the cathepsin S promoter in Japanese subjects: possible contribution to pulmonary emphysema. *Respirology* 13, 498-504 (2008).
55. Sakao, S. et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism with low attenuation areas on high-resolution CT in patients with COPD. *Chest* 122, 416-20 (2002).
56. Ito, I. et al. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1378-82 (2005).
57. Minematsu, N., Nakamura, H., Tateno, H., Nakajima, T. & Yamaguchi, K. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 116-9 (2001).
58. Yamada, N. et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 66, 187-95 (2000).
59. Smith, C. A. & Harrison, D. J. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350, 630-3 (1997).
60. Korkmaz, B., Moreau, T. & Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90, 227-42 (2008).
61. Kawabata, K., Hagio, T. & Matsuoka, S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol* 451, 1-10 (2002).
62. Yoshioka, A. et al. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 2127-32 (1995).
63. Damiano, V. V. et al. Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. *J Clin Invest* 78, 482-93 (1986).
64. Shapiro, S. D. et al. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol* 163, 2329-35 (2003).
65. Churg, A., Wang, R. D., Xie, C. & Wright, J. L. alpha-1-Antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 199-207 (2003).
66. Wright, J. L., Farmer, S. G. & Churg, A. A neutrophil elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced remodelling of lung vessels. *Eur Respir J* 22, 77-81 (2003).
67. Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A. & Campbell, E. J. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 87, 1828-34 (1991).
68. Kao, R. C., Wehner, N. G., Skubitz, K. M., Gray, B. H. & Hoidal, J. R. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 82, 1963-73 (1988).

69. Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-75 (2006).
70. Zheng, T. et al. Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 174, 8106-15 (2005).
71. Greenlee, K. J., Werb, Z. & Kheradmand, F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87, 69-98 (2007).
72. Kahari, V. M. & Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6, 199-213 (1997).
73. Newby, A. C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85, 1-31 (2005).
74. Selman, M. et al. Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in Guinea pigs. *Chest* 123, 1633-41 (2003).
75. Rossiter, H. B., Scadeng, M., Tang, K., Wagner, P. D. & Breen, E. C. Doxycycline treatment prevents alveolar destruction in VEGF-deficient mouse lung. *J Cell Biochem* 104, 525-35 (2008).
76. Imai, K. et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 786-91 (2001).
77. Segura-Valdez, L. et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 117, 684-94. (2000).
78. Selman, M. et al. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J Physiol* 271, L734-43 (1996).
79. D'Armiento, J., Dalal, S. S., Okada, Y., Berg, R. A. & Chada, K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 71, 955-61 (1992).
80. Shiomi, T. et al. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. *Exp Lung Res* 29, 1-15 (2003).
81. Kononov, S. et al. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1920-6 (2001).
82. Ohnishi, K., Takagi, M., Kurokawa, Y., Satomi, S. & Kontinen, Y. T. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 78, 1077-87 (1998).
83. Plantier, L. et al. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L1230-9 (2007).
84. Zheng, T. et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 106, 1081-93 (2000).
85. Taraseviciene-Stewart, L. et al. An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 171, 734-42 (2005).
86. Kirschvink, N. et al. Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats. *Toxicology* 211, 36-48 (2005).
87. Boschetto, P. et al. Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 61, 1037-42 (2006).
88. Russell, R. E. et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 602-9 (2002).
89. Ma, B. et al. Role of CCR5 in IFN-gamma-induced and cigarette smoke-induced emphysema. *J Clin Invest* 115, 3460-72 (2005).
90. Lappalainen, U., Whitsett, J. A., Wert, S. E., Tichelaar, J. W. & Bry, K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 311-8 (2005).
91. Bonniaud, P. et al. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 173, 2099-108 (2004).

92. Churg, A. et al. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 492-8 (2004).
93. Glasser, S. W. et al. Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice. *J Biol Chem* 278, 14291-8 (2003).
94. Lanone, S. et al. Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest* 110, 463-74 (2002).
95. Foronjy, R. et al. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 causes adult-onset emphysema in mice associated with the loss of alveolar elastin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1149-L1157 (2008).
96. Lavigne, M. C. & Eppihimer, M. J. Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 194-203 (2005).
97. Molet, S. et al. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res* 54, 31-6 (2005).
98. Demedts, I. K. et al. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 61, 196-201 (2006).
99. Stevenson, C. S. et al. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L1183-93 (2007).
100. Bracke, K. R. et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol* 177, 4350-9 (2006).
101. Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M. & Shapiro, S. D. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277, 2002-4 (1997).
102. Leco, K. J. et al. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 108, 817-29 (2001).
103. Brissenden, J. E. & Cox, D. W. α 2-Macroglobulin in patients with obstructive lung disease, with and without α 1-antitrypsin deficiency. *Clin Chim Acta* 128, 241-8 (1983).
104. Wang, Z. et al. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 192, 1587-600. (2000).
105. Retamales, I. et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 469-73 (2001).
106. Finkelstein, R., Fraser, R. S., Ghezzi, H. & Cosio, M. G. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 1666-72 (1995).
107. Meshi, B. et al. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 52-7 (2002).
108. Ofulue, A. F., Ko, M. & Abboud, R. T. Time course of neutrophil and macrophage elastolytic activities in cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Physiol* 275, L1134-44 (1998).
109. Ofulue, A. F. & Ko, M. Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Physiol* 277, L97-105 (1999).
110. Lacoste, J. Y. et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 92, 537-48 (1993).
111. Dhami, R. et al. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by α 1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 244-52 (2000).
112. Sullivan, A. K. et al. Activated oligoclonal CD4⁺ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 3, 486 (2006).

113. Saetta, M. et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 711-7 (1999).
114. Saetta, M. et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1404-9 (2002).
115. van der Strate, B. W. et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 173, 751-8 (2006).
116. D'Hulst A, I., Vermaelen, K. Y., Brusselle, G. G., Joos, G. F. & Pauwels, R. A. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 26, 204-13 (2005).
117. Maeno, T. et al. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol* 178, 8090-6 (2007).
118. D'Hulst A, I. et al. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respir Res* 6, 147 (2005).
119. Holt, P. G. & Stumbles, P. A. Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells: the respiratory tract as a paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 105, 421-9 (2000).
120. Soler, P., Moreau, A., Basset, F. & Hance, A. J. Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis* 139, 1112-7 (1989).
121. Demedts, I. K. et al. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 998-1005 (2007).
122. Wright, J. L., Hobson, J. E., Wiggs, B., Pare, P. D. & Hogg, J. C. Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, current and ex-smokers. *Lung* 166, 277-86 (1988).
123. Seagrave, J., Barr, E. B., March, T. H. & Nikula, K. J. Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice. *Exp Lung Res* 30, 1-15 (2004).
124. Senior, R. M., Griffin, G. L. & Mecham, R. P. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* 66, 859-62 (1980).
125. Fulop, T., Jr. et al. Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca²⁺ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 141, 92-8 (1986).
126. Houghton, A. M. et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 116, 753-9 (2006).
127. Lee, S. H. et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 13, 567-9 (2007).
128. Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 89195 (2007).
129. Ito, K., Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20, 6891-903 (2000).
130. Ito, K. et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 352, 1967-76 (2005).
131. Yang, S. R. et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L46-57 (2006).
132. Pryor, W. A. & Stone, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 686, 12-27; discussion 27-8 (1993).
133. Hubbard, R. C. et al. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 80, 1289-95 (1987).

134. Morrison, D., Rahman, I., Lannan, S. & MacNee, W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 473-9 (1999).
135. Wallaert, B., Aerts, C., Gressier, B., Gosset, P. & Voisin, C. Oxidative inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type II cells. *J Appl Physiol* 75, 2376-82 (1993).
136. Chapman, K. E. et al. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L834-41 (2005).
137. Amara, N. et al. Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L170-81 (2007).
138. Saito, S., Ogawa, J. & Minamiya, Y. Pulmonary reexpansion causes xanthine oxidase-induced apoptosis in rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L400-6 (2005).
139. Dekhuijzen, P. N. et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 813-6 (1996).
140. Montuschi, P. et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1175-7 (2000).
141. Rahman, I. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 490-5 (2002).
142. Pinamonti, S. et al. Detection of xanthine oxidase activity products by EPR and HPLC in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Free Radic Biol Med* 25, 771-9 (1998).
143. Cho, H. Y., Reddy, S. P. & Kleeberger, S. R. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 76-87 (2006).
144. Maestrelli, P. et al. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J* 21, 971-6 (2003).
145. Goven, D. et al. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax* (2008).
146. Harju, T. et al. Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. *Eur Respir J* 24, 765-71 (2004).
147. Sato, A. et al. Thioredoxin-1 ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 380-8 (2008).
148. Rubio, M. L., Martin-Mosquero, M. C., Ortega, M., Peces-Barba, G. & Gonzalez-Mangado, N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 125, 1500-6 (2004).
149. Kinoshita, T. et al. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 712-9 (2007).
150. Foronjy, R. F. et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 623-31 (2006).
151. Petrache, I. et al. Superoxide Dismutase Protects against Apoptosis and Alveolar Enlargement Induced by Ceramide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2008).
152. Rangasamy, T. et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 114, 1248-59 (2004).
153. Ishii, Y. et al. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. *J Immunol* 175, 6968-75 (2005).
154. Yao, H. et al. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *Am J Pathol* 172, 1222-37 (2008).

155. Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 270, 30334-8 (1995).
156. Yokohori, N., Aoshiba, K. & Nagai, A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125, 626-32 (2004).
157. Imai, K., Mercer, B. A., Schulman, L. L., Sonett, J. R. & D'Armiento, J. M. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 25, 250-8 (2005).
158. Calabrese, F. et al. Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res* 6, 14 (2005).
159. Kasahara, Y. et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 106, 1311-9 (2000).
160. Shigemura, N. et al. Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with hepatocyte growth factor in rats. *Circulation* 111, 1407-14 (2005).
161. Bartalesi, B. et al. Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J* 25, 15-22 (2005).
162. Aoshiba, K., Yokohori, N. & Nagai, A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 555-62 (2003).
163. Petrache, I. et al. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 1222-8 (2006).
164. Petrache, I. et al. alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol* 169, 1155-66 (2006).
165. Tsao, P. N. et al. Overexpression of placenta growth factor contributes to the pathogenesis of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 505-11 (2004).
166. Cheng, S. L., Wang, H. C., Yu, C. J. & Yang, P. C. Increased expression of placenta growth factor in COPD. *Thorax* 63, 500-6 (2008).
167. Fehrenbach, H. et al. Nitrogen dioxide induces apoptosis and proliferation but not emphysema in rat lungs. *Thorax* 62, 438-46 (2007).
168. Hagimoto, N., Kuwano, K., Nomoto, Y., Kunitake, R. & Hara, N. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 91-101 (1997).
169. Kuwano, K. et al. Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 104, 13-9 (1999).
170. Gilmore, A. P. Anoikis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1473-7 (2005).
171. Hodge, S. et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 748-55 (2007).
172. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-40 (2007).
173. Janssens, J. P., Pache, J. C. & Nicod, L. P. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 13, 197-205 (1999).
174. Tsuji, T., Aoshiba, K. & Nagai, A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 886-93 (2006).
175. Muller, K. C. et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 7, 32 (2006).
176. Tsuji, T., Aoshiba, K. & Nagai, A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 643-9 (2004).
177. Sato, T. et al. Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 530-7 (2006).
178. Hogg, J. C. et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350, 2645-53 (2004).
179. Kim, W. D. et al. The association between small airway obstruction and emphysema phenotypes in COPD. *Chest* 131, 1372-8 (2007).

180. Mall, M. A. et al. Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na⁺ channel-overexpressing mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 730-42 (2008).
181. Burri, P. H. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 89, 313-22 (2006).
182. Massaro, D., Massaro, G. D., Baras, A., Hoffman, E. P. & Clerch, L. B. Calorie-related rapid onset of alveolar loss, regeneration, and changes in mouse lung gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L896-906 (2004).
183. Massaro, D. J. et al. Rapid onset of gene expression in lung, supportive of formation of alveolar septa, induced by refeeding mice after calorie restriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2007).
184. Cagle, P. T. & Thurlbeck, W. M. Postpneumonectomy compensatory lung growth. *Am Rev Respir Dis* 138, 1314-26 (1988).
185. Wandel, G., Berger, L. C. & Burri, P. H. Morphometric analysis of adult rat lung after bilobectomy. *Am Rev Respir Dis* 128, 968-72 (1983).
186. Fehrenbach, H. et al. Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice. *Eur Respir J* 31, 515-22 (2008).
187. Voswinckel, R. et al. Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. *Eur Respir J* 24, 524-32 (2004).
188. Fernandez, L. G., Mehta, C. K., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Reinitiation of compensatory lung growth after subsequent lung resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134, 1300-5 (2007).
189. Eisen, E. J. Results of growth curve analyses in mice and rats. *J Anim Sci* 42, 1008-23 (1976).
190. Hsia, C. C., Herazo, L. F., Fryder-Doffey, F. & Weibel, E. R. Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest* 94, 405-12 (1994).
191. Takeda, S. et al. Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy. *J Appl Physiol* 86, 1301-10 (1999).
192. Laros, C. D. & Westermann, C. J. Dilatation, compensatory growth, or both after pneumonectomy during childhood and adolescence. A thirty-year follow-up study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 93, 570-6 (1987).
193. Shi, Q. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-7 (1998).
194. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57 (2000).
195. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-82 (2000).
196. Orlic, D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-9 (2001).
197. Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-34 (2000).
198. Voswinckel, R. et al. Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth. *Circ Res* 93, 372-9 (2003).
199. Cagle, P. T., Langston, C., Goodman, J. C. & Thurlbeck, W. M. Autoradiographic assessment of the sequence of cellular proliferation in postpneumonectomy lung growth. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3, 153-8 (1990).
200. Boussat, S. et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L371-8 (2000).
201. Aso, Y., Yoneda, K. & Kikkawa, Y. Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 35, 558-68 (1976).
202. Rennard, S. I., Bitterman, P. B. & Crystal, R. G. Response of the lower respiratory tract to injury. Mechanisms of repair of the parenchymal cells of the alveolar wall. *Chest* 84, 735-9 (1983).

203. Giangreco, A., Reynolds, S. D. & Stripp, B. R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 161, 173-82 (2002).
204. Giangreco, A., Shen, H., Reynolds, S. D. & Stripp, B. R. Molecular phenotype of airway side population cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L624-30 (2004).
205. Kim, C. F. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823-35 (2005).
206. Nolen-Walston, R. D. et al. Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1158-65 (2008).
207. Koh, D. W., Roby, J. D., Starcher, B., Senior, R. M. & Pierce, R. A. Postpneumectomy lung growth: a model of reinitiation of tropoelastin and type I collagen production in a normal pattern in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 611-23 (1996).
208. Alescio, T. & Cassini, A. Induction in vitro of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *J Exp Zool* 150, 83-94 (1962).
209. Shannon, J. M. Induction of alveolar type II cell differentiation in fetal tracheal epithelium by grafted distal lung mesenchyme. *Dev Biol* 166, 600-14 (1994).
210. Deimling, J. et al. Mesenchymal maintenance of distal epithelial cell phenotype during late fetal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L725-41 (2007).
211. Stern, J. B. et al. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 28, 2326-33. (2000).
212. Cohen, M. et al. HGF synthesis in human lung fibroblasts is regulated by oncostatin M. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L1097-103 (2006).
213. McGowan, S. E. & Torday, J. S. The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu Rev Physiol* 59, 43-62 (1997).
214. Sirianni, F. E., Chu, F. S. & Walker, D. C. Human alveolar wall fibroblasts directly link epithelial type 2 cells to capillary endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1532-7 (2003).
215. Adzick, N. S. et al. Diaphragmatic hernia in the fetus: prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. *J Pediatr Surg* 20, 357-61 (1985).
216. Hsia, C. C., Wu, E. Y., Wagner, E. & Weibel, E. R. Preventing mediastinal shift after pneumonectomy impairs regenerative alveolar tissue growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1279-87 (2001).
217. Ware, L. B. & Matthay, M. A. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L924-40. (2002).
218. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *Faseb J* 4, 176-87 (1990).
219. Morishita, R. et al. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr Gene Ther* 4, 199-206 (2004).
220. Sakamaki, Y. et al. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 525-33. (2002).
221. Gillis, P. et al. Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J Cell Sci* 112, 2049-57. (1999).
222. Peters, K. et al. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *Embo J* 13, 3296-301 (1994).
223. Tichelaar, J. W., Lu, W. & Whitsett, J. A. Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem* 275, 11858-64 (2000).

224. Kaza, A. K., Kron, I. L., Leuwerke, S. M., Tribble, C. G. & Laubach, V. E. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation* 106, 1120-4. (2002).
225. Kaner, R. J. & Crystal, R. G. Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung. *Mol Med* 7, 240-6 (2001).
226. Klekamp, J. G., Jarzecka, K. & Perket, E. A. Exposure to hyperoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult rat lungs. *Am J Pathol* 154, 823-31 (1999).
227. Tang, J. R. et al. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L344-51 (2004).
228. Ankoma-Sey, V. et al. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 17, 115-21 (1998).
229. Sakurai, M. K. et al. Vascular endothelial growth factor accelerates compensatory lung growth after unilateral pneumectomy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L742-7 (2007).
230. Krein, P. M. & Winston, B. W. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. *Chest* 122, 289S-293S (2002).
231. Uh, S. T. et al. Morphometric analysis of insulin-like growth factor-I localization in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 1626-35 (1998).
232. McAnulty, R. J., Guerreiro, D., Cambrey, A. D. & Laurent, G. J. Growth factor activity in the lung during compensatory growth after pneumectomy: evidence of a role for IGF-1. *Eur Respir J* 5, 739-47 (1992).
233. Price, W. A. et al. Expression of the insulin-like growth factor system in postpneumectomy lung growth. *Exp Lung Res* 24, 203-17 (1998).
234. Leveen, P. et al. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8, 1875-87 (1994).
235. Baroni, S. S. et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 354, 2667-76 (2006).
236. Yuan, S. et al. A role for platelet-derived growth factor-BB in rat postpneumectomy compensatory lung growth. *Pediatr Res* 52, 25-33 (2002).
237. Kovar, J., Willet, K. E., Hislop, A. & Sly, P. D. Impact of postnatal glucocorticoids on early lung development. *J Appl Physiol* 98, 881-8 (2005).
238. Bennett, R. A., Colony, P. C., Addison, J. L. & Rannels, D. E. Effects of prior adrenalectomy on postpneumectomy lung growth in the rat. *Am J Physiol* 248, E70-4 (1985).
239. Rannels, D. E., Karl, H. W. & Bennett, R. A. Control of compensatory lung growth by adrenal hormones. *Am J Physiol* 253, E343-8 (1987).
240. Massaro, G. D., Mortola, J. P. & Massaro, D. Estrogen modulates the dimensions of the lung's gas-exchange surface area and alveoli in female rats. *Am J Physiol* 270, L110-4 (1996).
241. Patrone, C. et al. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol* 23, 8542-52 (2003).
242. Germain, P. et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58, 760-72 (2006).
243. Germain, P. et al. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58, 712-25 (2006).
244. Delva, L. et al. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19, 7158-67 (1999).
245. Kang, J. X., Bell, J., Leaf, A., Beard, R. L. & Chandraratna, R. A. Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13687-91. (1998).

246. Notario, B., Zamora, M., Vinas, O. & Mampel, T. All-trans-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition. *Mol Pharmacol* 63, 224-31. (2003).
247. Liu, B., Harvey, C. S. & McGowan, S. E. Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures. *Am J Physiol* 265, L430-7 (1993).
248. Massaro, G. D., Massaro, D. & Chambon, P. Retinoic acid receptor- α regulates pulmonary alveolus formation in mice after, but not during, perinatal period. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L431-3. (2003).
249. McGowan, S. et al. Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 162-7. (2000).
250. Massaro, G. D. et al. Retinoic acid receptor- β : an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiol Genomics* 4, 51-7. (2000).
251. Kaza, A. K. et al. Retinoic acid enhances lung growth after pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 71, 1645-50. (2001).
252. Yan, X. et al. Retinoic acid induces nonuniform alveolar septal growth after right pneumonectomy. *J Appl Physiol* 96, 1080-9 (2004).
253. Dane, D. M. et al. Retinoic acid-induced alveolar cellular growth does not improve function after right pneumonectomy. *J Appl Physiol* 96, 1090-6 (2004).
254. Schittny, J. C., Mund, S. I. & Stamanoni, M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L246-54 (2008).
255. Leuwerke, S. M., Kaza, A. K., Tribble, C. G., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L1272-8 (2002).
256. Landesberg, L. J., Ramalingam, R., Lee, K., Rosengart, T. K. & Crystal, R. G. Upregulation of transcription factors in lung in the early phase of postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1138-49 (2001).
257. Haber, B. A., Mohn, K. L., Diamond, R. H. & Taub, R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest* 91, 1319-26 (1993).
258. Searce, L. M., Laz, T. M., Hazel, T. G., Lau, L. F. & Taub, R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J Biol Chem* 268, 8855-61 (1993).
259. Semenza, G. L. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in pulmonary pathophysiology. *Chest* 128, 592S-594S (2005).
260. Zhang, Q., Moe, O. W., Garcia, J. A. & Hsia, C. C. Regulated expression of hypoxia-inducible factors during postnatal and postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L880-9 (2006).
261. Zhang, Q. et al. Postpneumonectomy lung expansion elicits hypoxia-inducible factor-1 α signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L497-504 (2007).
262. McDonough, P., Dane, D. M., Hsia, C. C., Yilmaz, C. & Johnson, R. L., Jr. Long-term enhancement of pulmonary gas exchange after high-altitude residence during maturation. *J Appl Physiol* 100, 474-81 (2006).
263. Lechner, A. J. & Banchemo, N. Lung morphometry in guinea pigs acclimated to hypoxia during growth. *Respir Physiol* 42, 155-69 (1980).
264. Zeltner, T. B. & Burri, P. H. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respir Physiol* 67, 269-82 (1987).
265. Ishii, T. et al. Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1189-95 (2001).
266. Carnevali, S. et al. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L955-63. (2003).
267. Bagloli, C. J. et al. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L19-29 (2006).

268. Nakamura, Y. et al. Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 483-8 (1995).
269. Nobukuni, S. et al. Cigarette smoke inhibits the growth of lung fibroblasts from patients with pulmonary emphysema. *Respirology* 7, 217-23. (2002).
270. Nyunoya, T. et al. Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 681-8 (2006).
271. Gao, S. et al. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts. *Toxicol Sci* 87, 197-203 (2005).
272. Laurent, P., Janoff, A. & Kagan, H. M. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. *Am Rev Respir Dis* 127, 189-92 (1983).
273. Zhong, C. Y., Zhou, Y. M., Joad, J. P. & Pinkerton, K. E. Environmental tobacco smoke suppresses nuclear factor-kappaB signaling to increase apoptosis in infant monkey lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 428-36 (2006).
274. Osman, M., Kaldany, R. R., Cantor, J. O., Turino, G. M. & Mandl, I. Stimulation of lung lysyl oxidase activity in hamsters with elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 131, 169-70 (1985).
275. Hoidal, J. R. & Niewoehner, D. E. Cigarette smoke inhalation potentiates elastase-induced emphysema in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 127, 478-81 (1983).
276. Shifren, A., Durmowicz, A. G., Knutsen, R. H., Hirano, E. & Mecham, R. P. Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L778-87 (2007).
277. Sirianni, F. E., Milaninezhad, A., Chu, F. S. & Walker, D. C. Alteration of fibroblast architecture and loss of Basal lamina apertures in human emphysematous lung. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 632-8 (2006).
278. Parker, M. A., Bell, M. L. & Barlow, L. A. Cell contact-dependent mechanisms specify taste bud pattern during a critical period early in embryonic development. *Dev Dyn* 230, 630-42 (2004).
279. Warburton, D. & Bellusci, S. The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A, S283-7 (2004).
280. Warburton, D. et al. Do lung remodeling, repair, and regeneration recapitulate respiratory ontogeny? *Am J Respir Crit Care Med* 164, S59-62 (2001).
281. Noordhoek, J. A. et al. Different proliferative capacity of lung fibroblasts obtained from control subjects and patients with emphysema. *Exp Lung Res* 29, 291-302. (2003).
282. Holz, O. et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 24, 575-9 (2004).
283. Muller, K. C. et al. In contrast to lung fibroblasts - no signs of senescence in skin fibroblasts of patients with emphysema. *Exp Gerontol* (2008).
284. Togo, S. et al. Lung Fibroblast Repair Functions in COPD Patients are Altered by Multiple Mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* (2008).
285. Shigemura, N. et al. Induction of compensatory lung growth in pulmonary emphysema improves surgical outcomes in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 171, 1237-45 (2005).
286. Massaro, G. D. & Massaro, D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 3, 675-7. (1997).
287. Ishizawa, K. et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett* 556, 249-52 (2004).
288. Tepper, J. et al. Can retinoic acid ameliorate the physiologic and morphologic effects of elastase instillation in the rat? *Chest* 117, 242S-4S (2000).
289. Lucey, E. C. et al. Retinoic acid does not affect alveolar septation in adult FVB mice with elastase-induced emphysema. *Respiration* 70, 200-5. (2003).
290. Fujita, M. et al. Retinoic acid fails to reverse emphysema in adult mouse models. *Thorax* 59, 224-30 (2004).

291. March, T. H. et al. Inhalation administration of all-trans-retinoic acid for treatment of elastase-induced pulmonary emphysema in Fischer 344 rats. *Exp Lung Res* 30, 383-404 (2004).
292. Mancini, G. B. et al. Reduction of morbidity and mortality by statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Coll Cardiol* 47, 2554-60 (2006).
293. Morishita, R. et al. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 44, 203-9 (2004).
294. Ishizawa, K. et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 276-80 (2004).
295. Ichiki, Y. et al. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 338, 6-10 (1994).
296. Miyashita, K. et al. The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential. *Endocrinology* 147, 1642-53 (2006).
297. Wang, H. et al. Sequential expression of adrenomedullin and its receptor during gastric ulcer healing in rats. *Dig Dis Sci* 45, 591-8 (2000).
298. Nakamura, R. et al. Beneficial effects of adrenomedullin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 56, 373-80 (2002).
299. Murakami, S. et al. Adrenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 581-9 (2005).
300. Shigemura, N. et al. Lung tissue engineering technique with adipose stromal cells improves surgical outcome for pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 1199-205 (2006).
301. Shigemura, N. et al. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cells ameliorates pulmonary emphysema. *Am J Transplant* 6, 2592-600 (2006).
302. Bonay, M. et al. Hepatocyte and keratinocyte growth factors and their receptors in human lung emphysema. *BMC Pulm Med* 5, 13 (2005).
303. Liu, D. & Hornsby, P. J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67, 3117-26 (2007).
304. Baybutt, R. C., Hu, L. & Molteni, A. Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type II pneumocytes. *J Nutr* 130, 1159-65. (2000).
305. Marchand-Adam, S. et al. Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1156-61 (2003).
306. Morris, S. M., Thomas, K. M., Rich, C. B. & Stone, P. J. Degradation and repair of elastic fibers in rat lung interstitial fibroblast cultures. *Anat Rec* 250, 397-407. (1998).
307. Shinohara, T., Okada, M., Suzuki, K., Ohsuzu, F. & Katayama, M. Quantitative analysis for soluble elastin in circulation and cell culture fluids using monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. *J Immunoassay Immunochem* 26, 189-202 (2005).
308. Chailley-Heu, B., Boucherat, O., Barlier-Mur, A. M. & Bourbon, J. R. FGF-18 is upregulated in the postnatal rat lung and enhances elastogenesis in myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L43-51 (2005).
309. Rich, C. B. et al. Transcriptional regulation of pulmonary elastin gene expression in elastase-induced injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L354-62 (2003).
310. Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N. & Noy, N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129, 723-33 (2007).
311. Van den Bogaerdt, A. J. et al. Differential expression of CRABP-II in fibroblasts derived from dermis and subcutaneous fat. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 428-33 (2004).

312. Astrom, A., Pettersson, U., Chambon, P. & Voorhees, J. J. Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing. *J Biol Chem* 269, 22334-9 (1994).
313. Gimeno, A., Zaragoza, R., Vina, J. R. & Miralles, V. J. Vitamin E activates CRABP-II gene expression in cultured human fibroblasts, role of protein kinase C. *FEBS Lett* 569, 240-4 (2004).
314. McPherson, L. A., Woodfield, G. W. & Weigel, R. J. AP2 transcription factors regulate expression of CRABP II in hormone responsive breast carcinoma. *J Surg Res* 138, 71-8 (2007).
315. Li, X. H. & Ong, D. E. Cellular retinoic acid-binding protein II gene expression is directly induced by estrogen, but not retinoic acid, in rat uterus. *J Biol Chem* 278, 35819-25 (2003).
316. Dieplinger, B. et al. The transcriptional corepressor TPA-inducible sequence 7 regulates adult axon growth through cellular retinoic acid binding protein II expression. *Eur J Neurosci* 26, 3358-67 (2007).
317. Lane, M. A. et al. LIF removal increases CRABPI and CRABP II transcripts in embryonic stem cells cultured in retinol or 4-oxoretinol. *Mol Cell Endocrinol* 280, 63-74 (2008).
318. Moore, K. & Roberts, L. J., 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 28, 659-71 (1998).
319. Taille, C. et al. Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 753-61 (2001).
320. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424 (2007).
321. Brindicci, C. et al. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur Respir J* 26, 52-9 (2005).
322. Guerassimov, A. et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 974-80 (2004).
323. Ray, P. et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6098-103 (2003).
324. Lampron, C. et al. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or in both CRABPI and CRABP II are essentially normal. *Development* 121, 539-48 (1995).
325. Plantier, L. et al. Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L641-7 (2005).
326. Plantier, L. et al. Dysregulation of elastin expression by fibroblasts in pulmonary emphysema : Role of Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2. *Thorax* (2008).
327. Mendez, M. V. et al. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 28, 876-83 (1998).
328. Stanley, A. & Osler, T. Senescence and the healing rates of venous ulcers. *J Vasc Surg* 33, 1206-11 (2001).
329. Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M. & Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1, 71-81 (1994).
330. Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R. & Metz, C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166, 7556-62 (2001).
331. Gomperts, B. N. & Strieter, R. M. Fibrocytes in lung disease. *J Leukoc Biol* 82, 449-56 (2007).
332. Phillips, R. J. et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 114, 438-46 (2004).

333. Sabatini, F. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* 85, 962-71 (2005).
334. Lama, V. N. et al. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest* 117, 989-96 (2007).
335. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127, 2021-36 (1994).
336. Willis, B. C. et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166, 1321-32 (2005).
337. Kim, K. K. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13180-5 (2006).
338. Condorelli, G. et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10733-8 (2001).
339. Morris, D. G. et al. Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422, 169-73 (2003).
340. Stabile, L. P. et al. Transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor in the airways show increased susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 27, 1547-55 (2006).
341. Siegfried, J. M. et al. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57, 433-9 (1997).
342. Yamayoshi, T. et al. Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis. *J Pathol* 204, 110-8 (2004).
343. Broekelmann, T. J., Limper, A. H., Colby, T. V. & McDonald, J. A. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6642-6 (1991).
344. Sime, P. J., Xing, Z., Graham, F. L., Csaky, K. G. & Gauldie, J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100, 768-76 (1997).
345. Martinet, Y., Rom, W. N., Grotendorst, G. R., Martin, G. R. & Crystal, R. G. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 317, 202-9 (1987).
346. Maeda, Y., Dave, V. & Whitsett, J. A. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev* 87, 219-44 (2007).
347. Bourbon, J., Boucherat, O., Chailley-Heu, B. & Delacourt, C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 57, 38R-46R (2005).

Laurent PLANTIER

Réparation alvéolaire et emphysème pulmonaire : Rôle des systèmes d'alvéologénèse

Les mécanismes de l'emphysème pulmonaire, caractérisé par la destruction des alvéoles pulmonaire, sont incomplètement connus. L'hypothèse défendue par cette thèse est qu'une altération des systèmes d'alvéologénèse et de réparation alvéolaire portés par les fibroblastes pulmonaires contribue au développement des lésions au cours de cette maladie. Les travaux présentés ici ont permis d'établir que les fibroblastes pulmonaires cultivés *in vitro* à partir de poumon emphysémateux présentaient un phénotype altéré dans le sens d'une perte de leur capacité à participer à la régénération et à la réparation des alvéoles : Ces cellules sécrétaient à un niveau faible ou non stimuable le Hepatocyte Growth Factor et le Keratinocyte Growth Factor (KGF), qui ciblent les cellules épithéliales et endothéliales de l'alvéole. De plus, l'expression par ces cellules de l'élastine, le composant majeur de la matrice extracellulaire pulmonaire, n'était pas induite par l'acide tout-trans rétinoïque, stimulus central de l'alvéologénèse, du fait d'une faible expression de Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 (CRABP2). Le rôle du KGF dans l'homéostasie de l'alvéole a été démontré dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase *in vivo* : Les souris traitées par le KGF avant l'instillation d'élastase étaient protégées de l'emphysème. Les souris dont le gène de CRABP2 était inactivé de façon globale n'étaient pas sensibilisées vis-à-vis de l'emphysème dans ce modèle. Les données physiopathologiques présentées dans ce mémoire pourraient contribuer à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'emphysème.

Mots-clés : Emphysème, BPCO, Réparation, Alvéologénèse, Fibroblastes, Facteurs de croissance, Rétinoïdes

Alveolar repair and pulmonary emphysema : Role of alveologenesis systems

The mechanisms of pulmonary emphysema, characterized by the destruction of alveolar walls, remain incompletely understood. Our hypothesis is that a deficiency in fibroblast-borne alveolar repair systems accounts partly for the constitution of lesions in this disease. In our experiments, we show that fibroblasts isolated *in vitro* from human emphysematous lung express the Hepatocyte Growth Factor and the Keratinocyte Growth Factor (KGF), which target alveolar epithelial and endothelial cells, at low or unstimulable levels. Additionally, emphysema fibroblasts did not increase their expression of elastin, the main component of the pulmonary extracellular matrix, in response to retinoic acid, due to a low expression of Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 (CRABP2). The role of KGF in alveolar homeostasis was demonstrated *in vivo* in the elastase-induced emphysema model: Mice treated with KGF before elastase instillation were protected against emphysema. CRABP2-knockout mice were not protected against emphysema in this model. Our pathophysiological data may help in the identification of novel therapeutic targets for emphysema.

Keywords : Emphysema, COPD, Repair, Alveologenesis, Fibroblasts, Growth factors, Retinoids

INSERM U700, Faculté Xavier Bichat

16 rue Henri Huchard, 75018 Paris