

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Rôle de l'hyaluronidase 2 (Hyal2) dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

Veltri, Anthony

Award date:
2012

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**RÔLE DE L'HYALURONIDASE 2 (HYAL2) DANS UN MODÈLE MURIN DE
FIBROSE PULMONAIRE INDUITE PAR LA BLÉOMYCINE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Anthony VELTRI

Janvier 2012

Rôle de l'hyaluronidase 2 (HYAL2) dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

VELTRI Anthony

Résumé

Le métabolisme de l'hyaluronan (HA) repose sur les HA synthases et les hyaluronidases, dont l'hyaluronidase-2 (Hyal2). Le rôle de celle-ci a été investigué dans le poumon ainsi que dans les macrophages alvéolaires et péritonéaux durant la genèse d'une fibrose pulmonaire (FP). Un modèle murin de FP induite par une instillation unique de bléomycine chez des souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) a été utilisé. Le tissu pulmonaire ainsi que les macrophages, cellules inflammatoires capables de synthèse et de dégradation de l'HA, ont été étudiés aux jours 7, 14 et 21 post-instillation.

L'analyse tissulaire consiste en l'observation de la phase inflammatoire puis fibrotique de la FP. La phase inflammatoire est visualisée grâce à une coloration HES alors que la phase fibrotique est évaluée et quantifiée par la coloration au rouge de picrosirius des collagènes I/III. L'HA est localisé par un marquage pseudo-immunohistochimique et dosé. Ses synthases (HAS1, 2, 3) et hyaluronidases (HYAL1, 2) sont quantifiées par PCR quantitative. Enfin, l'activité hyaluronidasique tissulaire d'Hyal1 est détectée à l'aide d'une zymographie. L'analyse des cellules macrophagiques consiste en leur numération et une observation morphologique par coloration au Diff-Quick™. Ensuite, l'IL-1β et l'HA sont dosés dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire (BALF) ; l'HA est aussi dosé dans le fluide du lavage péritonéal. Sur les macrophages alvéolaires et péritonéaux, les récepteurs membranaires d'HA (CD44 et RHAMM) sont localisés et CD44 est quantifié soit par FACS soit par imagerie. Enfin, afin de mesurer la capacité d'endocytose en phase fluide des macrophages (processus dépendant vraisemblablement d'Hyal2), l'endocytose de l'HRP est quantifiée.

Au bout de ce travail, nous observons, qu'au cours de la genèse d'une FP, la délétion du gène Hyal2: 1) ne modifie pas l'histologie pulmonaire ; 2) induit une déposition de collagène plus importante en condition physiologique mais qui n'augmentent pas au cours de la pathologie ; la délétion pourrait dans une certaine mesure protéger contre la fibrose post-bléomycine ; 3) n'influence pas le recrutement des cellules inflammatoires ; 4) induit une phase inflammatoire non régulée de manière importante par l'IL-1β; 5) n'influence pas la localisation de l'HA; 6) augmente la quantité d'HA tissulaire et du BALF durant les deux premières semaines post-traitement ; 7) ne modifie pas la localisation de CD44 et de RHAMM ; 9) ne modifie pas la quantité de CD44 ; 10) ne modifie pas l'endocytose en phase fluide chez le macrophage.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2012

Promoteur: B. Flamion



LABORATOIRE DE
PHYSIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE
URPHYM

Rôle de l'hyaluronidase-2 (HYAL2) dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

Anthony Veltri

Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de master en
biochimie et biologie cellulaire et moléculaire

Membres du jury

Professeur Nathalie Caron

Laboratoire de physiologie générale - FUNDP

Professeur Martine Raes

Laboratoire de biologie moléculaire - FUNDP

Madame Sophie Dogné

Laboratoire de physiologie et pharmacologie - FUNDP

Monsieur Julien Lemaire

Laboratoire de biologie cellulaire - FUNDP

Promoteur

Professeur Bruno Flamion

Laboratoire de physiologie et pharmacologie - FUNDP

Encadrant

Docteur Rachid Seqqat

Laboratoire de physiologie et pharmacologie - FUNDP

Année académique 2011-2012

REMERCIEMENTS

« Beaucoup remercier signifie secrètement demander davantage. »

Proverbe anglais

*M*es premières pensées vont au personnel du laboratoire de Physiologie humaine et Pharmacologie.

Tout d'abord, j'aimerais adresser ma plus sincère gratitude au Professeur Bruno Flamion pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir mis à ma disposition l'infrastructure nécessaire afin de mener à bien ce travail. Par la présente je témoigner de la confiance et des avis judicieux dont il m'a gratifié et lui suis également reconnaissant pour la richesse de nos discussions et la pertinence de ses remarques.

Ensuite, je dois beaucoup au Docteur Rachid Seqqat pour avoir partagé ses connaissances et pour n'avoir jamais été avare de son temps. Nul doute que son expérience m'a été d'une aide précieuse.

Tous mes remerciements et ma gratitude vont aussi à Martine Albert, Guy Dehousse et Camille Fautré pour avoir mis, avec beaucoup de gentillesse, leur adresse technique à mon service.

Enfin, je remercie Bénédicte André, Virginie Bourguignon, Sophie Dogné, Cécile Onclinx, Stéphanie Meunier et Jenifer Defoux pour le plaisir et le privilège que j'ai eu à travailler en leur compagnie. Vous avez indubitablement contribué à l'avancement et à la réussite de mon travail.

Que soient également remerciés les membres du jury : Madame Sophie Dogné, le professeur Nathalie Caron, le professeur Martine Raes et Monsieur Julien Lemaire.

Je porte une attention particulière à Johanne Dubail, membre du laboratoire de biologie des tissus conjonctifs dirigé par le Docteur Alain Colige (ULg). Merci de m'avoir aidé lors de l'instillation des souris, et ce, dans les meilleures conditions possible.

Sur un plan plus personnel, j'exprime une éternelle gratitude à ceux qui ont toujours été à mes côtés, à savoir mes amis, ma famille, et plus particulièrement mes parents. Je tiens aussi à me remercier de m'être engagé vers le chemin de la réussite alors que je n'y étais pas destiné.

En dernier lieu, je dédicace ce travail à une personne grâce à laquelle j'ai trouvé ma voie, le Docteur Biondina Mantini.

À tous,

Ma reconnaissance est grande

Et comment pourrait-il en être autrement ?

Riche, je le suis d'avoir bénéficié de votre soutien, de votre aide et de votre connaissance

Ce que vous avez fait pour moi est cher à mes yeux

Infiniment redevable, je vous en remercie.

Veltri Anthony

LISTE DES ABRÉVIATIONS

HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Bovine serum albumin
CD44	Cluster of differentiation 44
CS	Chondroïtine sulfate
CTL	Contrôle
DNase	Désoxyribonucléase
DS	Dermatan sulfate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factors
FP	Fibrose pulmonaire
GAG	Glycosaminoglycan
GalNac	Acide N-acétyl-glucosamine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
HA	Hyaluronan ou Acide Hyaluronique
HABP	Hyaluronan-Binding Protein (protéine de liaison de l'hyaluronan)
HARE	Hyaluronan receptor for endocytosis
HAS	Hyaluronan synthase
HES	Hematoxylin-Erythrosin-Safran
HS	Heparan sulfate
HYAL	Hyaluronidase
Hyal2	Hyaluronidase-2
HZ	Hétérozygote
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
kDa	KiloDaltons
KO	Knockout
KS	Keratan sulfate
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial-1 (récepteur de l'HA)
MAF	Macrophage activating factor
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MEC	Matrix extracellulaire
MIF	Migration inhibitory factor
MMP	Matrix metalloproteinase
MPO	Myéloperoxydase
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger-1
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Proteoglycan
PGE-2	Prostaglandin E2
PI	Pneumocytes I
PII	Pneumocytes II
PM	Poids moléculaire
PMN	Polymorphonucléaires
RF	Rnase Free
RHAMM	Receptor for hyaluronan-mediated motility
rpm	Rotations par minute
TLR	Toll-like receptor

TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
CD44	Cluster of differentiation
FP	Fibrose pulmonaire

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	2
REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
TABLE DES MATIÈRES	7
INTRODUCTION	10
1. La fibrose pulmonaire	10
1.1. Contexte clinique.....	10
1.2. Pathogénie.....	11
1.2.1. Agression tissulaire.....	12
1.2.2. Réponse inflammatoire	13
1.2.3. Réparation tissulaire aboutissant à la fibrose	16
1.2.4. Conséquences physiopathologiques	17
2. Les macrophages alvéolaires, régulateurs majeurs de l'inflammation et de la fibrose.....	18
2.1. Polarisation des macrophages alvéolaires	19
2.2. Macrophages alvéolaires et inflammasome	20
3. L'HA, un GAG particulier.....	21
3.1. Structure	21
3.2. Localisation	22
3.3. Biosynthèse	22
3.3.1. Les HA synthèses mammaliennes	22
3.3.2. Exportation de l'HA	23
3.4. Catabolisme.....	24
3.4.1. Les hyaluronidases mammaliennes (dégradation enzymatique).....	24
3.4.2. Modèle de dégradation somatique de l' HA	25
3.4.3. La dégradation non enzymatique de l'HA	26
3.5. Hyaladhérines ou Hyaluronic acid binding proteins (HABP)	26
3.5.1. Protéoglycans de type lectican.....	27
3.5.2. CD44	27
3.5.3. RHAMM	28
3.5.4. Les TLR	28
3.6. Taux de renouvellement.....	28
3.7. Fonctions physiologiques	29
3.8. Fonctions physiopathologiques.....	30

3.8.1.	Association entre l'HA et l'immunité	30
3.8.2.	Association entre l'HA et l'inflammation	31
4.	Modèle murin de fibrose pulmonaire post-bléomycine	31
4.1.	L'HA dans le modèle	34
OBJECTIFS DU MÉMOIRE.....		35
MATÉRIEL ET MÉTHODES		37
1.	Animaux expérimentaux	37
2.	Administration de la bléomycine et anesthésie	37
3.	Isolement des macrophages péritonéaux	37
4.	Isolement des macrophages alvéolaires	37
5.	Isolement du tissu pulmonaire	37
6.	Études histomorphologique et immunohistochimique du poumon.....	38
6.1.	Coloration à l'hémalun érythrosine safran (HES)	38
6.2.	Coloration au picosirius rouge	38
6.3.	Immunohistochimie.....	38
7.	Dosage de l'IL1- β dans le tissu pulmonaire et le lavage bronchoalvéolaire	39
8.	Dosage de l'HA dans le tissu pulmonaire et le lavage bronchoalvéolaire.....	39
9.	PCR quantitative en temps réel.....	40
10.	Détection de l'activité hyaluronidasique pulmonaire par zymographie	41
11.	Localisation des antigènes (CD44, RHAMM) par immunofluorescence et microscopie confocale	42
12.	Détection des antigènes cellulaires de surface (CD44, F4/80) par cytométrie en flux	43
13.	Endocytose de l'HRP (peroxydase du raifort) et sa quantification	43
14.	Analyses statistiques	44
RÉSULTATS.....		45
1.	Introduction et observations générales	45
2.	Analyse du tissu pulmonaire	45
2.1.	Histologie du poumon murin au cours de la genèse d'une fibrose induite par bléomycine	45
2.2.	Quantification du processus fibrotique pulmonaire	49
2.3.	Localisation de l'HA dans le poumon	51
2.4.	Quantité d'HA dans le tissu pulmonaire.....	52
2.5.	Expression des HAS et de HYAL1 et HYAL2 dans le poumon.....	53
2.6.	Estimation de l'activité hyaluronidasique pulmonaire.....	54
3.	Analyse des lavages bronchoalvéolaires et péritonéaux	55

3.1.	Numération des cellules du fluide du lavage bronchoalvéolaire	55
3.2.	Analyse morphologique des cellules du fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris traitées à la bléomycine	56
3.3.	Taux d'IL1 β (cytokine pro-inflammatoire) dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire..	57
3.4.	Taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire	58
3.5.	Correlation entre le taux d'HA et le taux d'IL1- β dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire.....	59
3.6.	Numération des cellules du fluide du lavage péritonéal.....	60
3.7.	Analyse morphologique des cellules du lavage péritonéal de souris traitées à la bléomycine	61
3.8.	Taux d'HA dans le fluide du lavage péritonéal	62
3.9.	Corrélation entre le taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire et le taux d'HA dans le tissu pulmonaire.....	63
3.10.	Corrélation entre le taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire et le taux d'HA dans le fluide du lavage péritonéal.....	64
3.11.	Localisation des récepteurs de l'HA (CD44 et RHAMM) sur les macrophages péritonéaux	65
3.12.	Quantification du CD44 présent à la surface des macrophages alvéolaires	67
3.13.	Quantification du CD44 présent à la surface des macrophages péritonéaux.....	67
3.14.	Endocytose en phase fluide des macrophages péritonéaux.....	69
	DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	70
1.	Modèle animal de fibrose pulmonaire induite par bléomycine.....	70
2.	Les macrophages alvéolaires, un facteur technique limitant de l'étude	71
3.	Discussion des résultats	72
4.	Modèle hypothétique.....	79
5.	Conclusion	81
	RÉFÉRENCES	83

INTRODUCTION

1. *La fibrose pulmonaire*

Le poumon, organe thoracique de la respiration, a pour fonction première de permettre les échanges gazeux. Ces échanges s'effectuent au sein de l'**alvéole respiratoire**, unité fonctionnelle de base du système respiratoire. Le maintien de l'intégrité alvéolaire est indispensable à la survie. Il nécessite à la fois de multiples systèmes de protection et de réparation, impliquant le déroulement d'évènements complexes et finement régulés. Ces mécanismes de protection et de réparation peuvent être mis en échec dans des conditions pathologiques sans que les causes en soient parfaitement comprises. Il en est ainsi de la fibrose pulmonaire (FP) (Ober et al. 2007).

1.1. Contexte clinique

La FP est une **maladie chronique progressive** qui fait suite à une inflammation. Elle est le résultat de mois, sinon d'années de mauvais remaniement de la matrice extracellulaire (MEC). Elle représente souvent la phase avancée d'un groupe de maladies pulmonaires qu'on groupe sous le terme de « pathologies interstitielles » car elles semblent naître dans l'interstitium pulmonaire et non pas, par exemple, dans les voies aériennes. La pneumopathie interstitielle fibrosante connaît des formes bénignes et d'autres plus invalidantes ayant une issue fatale, telle que la FP idiopathique (Razzaque and Taguchi 2003).

L'**incidence** de la FP s'élève à approximativement 5 millions de personnes de par le monde (Razzaque and Taguchi 2003). Selon les diversités sémiologiques, il est possible de déterminer l'**étiologie** de la maladie. Cette dernière peut être due à : l'inhalation de particules (silice, amiante, particules organiques, l'exposition à des agents physiques (radiations ionisantes), des agents infectieux, une toxicité médicamenteuse (bléomycine), une maladie auto-immunitaire (connectivite) ou une granulomatose (ATS 2000). Toutefois, tous les individus exposés à ces agents ou à ces réactions immunitaires ne développent pas nécessairement une fibrose, ce qui suggère une prédisposition génétique ou des mécanismes complexes (Lympny and du Bois 1997). Malgré une telle variété étiologique, la FP présente une histologie similaire, ce qui lui permet de conserver sa dénomination générale.

L'**histologie** de cette pneumopathie est caractérisée par des lésions de l'épithélium alvéolaire, des zones hyperplasiques de pneumocytes de type II, une accumulation de cellules inflammatoires, une hyperplasie fibroblastique, une déposition protéique au niveau matriciel et la formation de cicatrices fibreuses (Moore and Hogaboam 2008). Les **conséquences physiopathologiques** principales en sont une perte progressive d'élasticité du poumon, une perte de la surface alvéolaire et un épaississement de l'espace alvéolocapillaire, l'ensemble conduisant à une déficience des échanges gazeux et de la fonction pulmonaire (Moore and Hogaboam 2008).

Les options de **traitement** pour la FP sont limitées. Bien que la maladie soit souvent considérée comme la conséquence d'une inflammation, les thérapies anti-inflammatoires, jusqu'à présent, n'ont pas modifié fondamentalement le devenir clinique de la pathologie (Cook et al. 2002). C'est pourquoi, actuellement, l'approche clinique se focalise sur le traitement des complications comme l'insuffisance cardiaque droite et les infections, tout en envisageant en dernier recours la transplantation pulmonaire (Kim et al. 2006; Moeller et al. 2008). Les corticoïdes et les immunosuppresseurs restent utilisés lorsque l'étiologie implique,

ou semble impliquer, une réaction immunitaire excessive.

1.2. Pathogénie

La pathogénie de la FP est résumée dans la **Figure 1**.

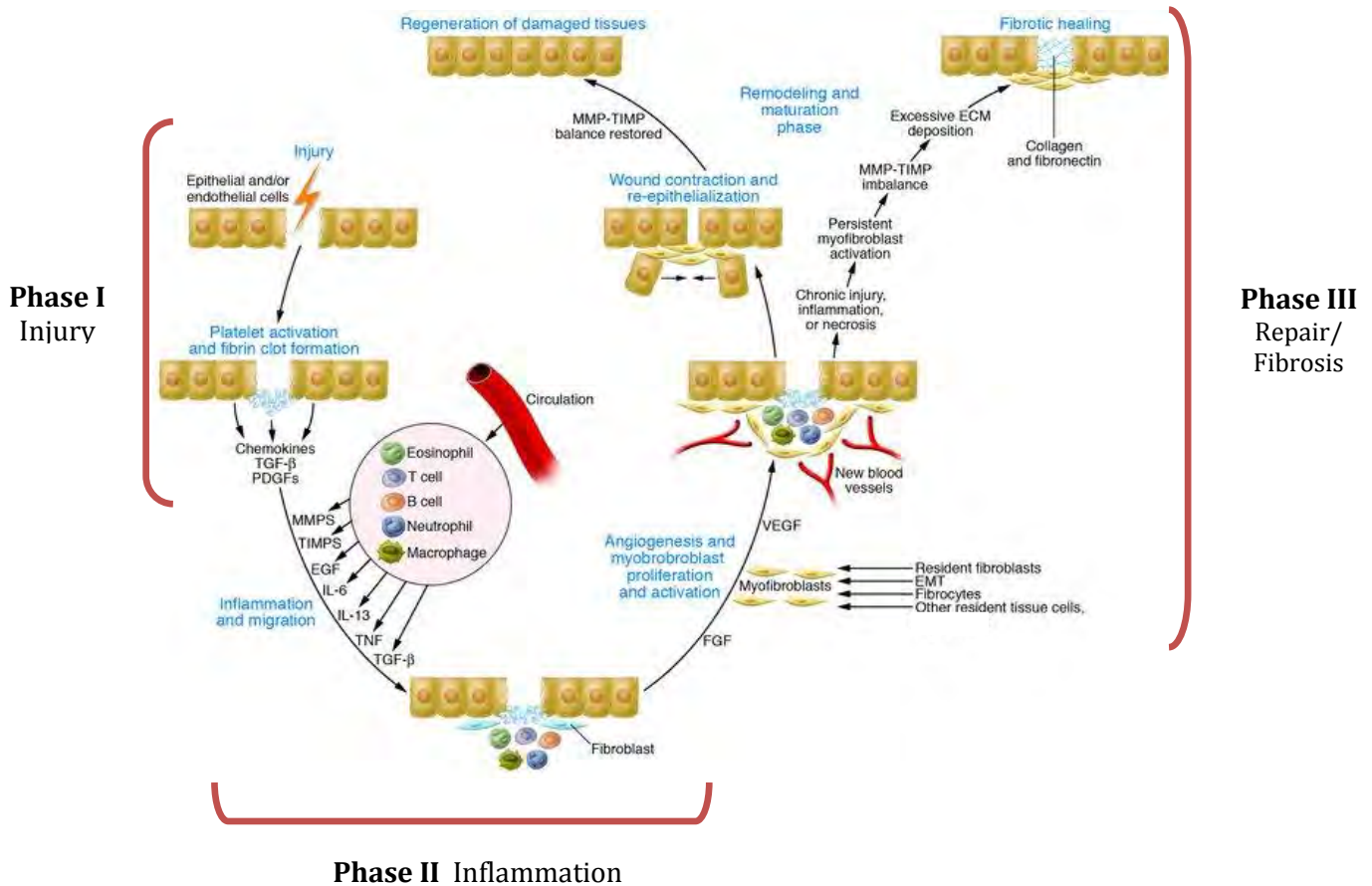


Figure 1. Représentation schématique des trois phases de la réponse physiologique et pathologique à l'agression pulmonaire (Wynn 2007). Phase I : l'agression tissulaire. Beaucoup d'agents peuvent causer une blessure pulmonaire, y compris des particules aériennes, des allergènes, des agents infectieux, la chimiothérapie anticancéreuse et les radiations. La perturbation des cellules épithéliales et endothéliales libère des médiateurs inflammatoires qui amorcent une cascade de coagulation antifibrinolytique, déclenchant l'activation des plaquettes et la formation de caillot sanguin. Phase II : la réponse inflammatoire. Les cellules inflammatoires circulantes et les fibroblastes sont recrutés au site d'agression par un gradient chimiotactique. Des protéases, facteurs de croissance, cytokines pro-inflammatoires et agents pro-fibrotiques sont alors sécrétés. Phase III : la réparation tissulaire ou fibrose. Les fibroblastes se différencient en myofibroblastes qui, une fois activés, peuvent promouvoir la cicatrisation, conduisant à la contraction des plaies et à la restauration de la vascularisation sanguine. Les cellules inflammatoires subissent l'apoptose alors que les cellules épithéliales et endothéliales sont renouvelées et l'architecture tissulaire est restaurée. Cependant, lorsque l'agression est chronique ou que l'un des stades de la réparation tissulaire est dérégulé, il en résulte une inflammation persistante qui conduira à une activation persistante des myofibroblastes et une accumulation excessive des composants de la MEC, le tout aboutissant à la formation de fibrose.

1.2.1. Agression tissulaire

La FP résulte de processus superposés de détérioration tissulaire, inflammation et réparation (Vaillant and Martinet 1991). L'agression tissulaire initiale et la réaction inflammatoire qu'elle engendre sont responsables de lésions de l'endothélium capillaire, de l'épithélium et de l'interstitium.

1.2.1.1. Lésions de l'endothélium

Les cellules endothéliales sont, avec les pneumocytes de type I (PI), les cellules les plus sensibles aux stimuli lésionnels (Adolff et al. 1990). La lésion des cellules endothéliales entraîne la libération de molécules du système du complément et du système de la coagulation, de prostaglandines, de leucotriènes et d'autres médiateurs comme $\text{TNF-}\alpha$, PAF, PDGF et IL-1 (Wilson and Wynn 2009). Ces substances contribuent à **l'aggravation des lésions initiales** par oedème, thrombose, augmentation de la perméabilité capillaire, et recrutement et activation des polymorphonucéaires (PMN) sanguins. Ces derniers participeront également au recrutement de nouvelles cellules effectrices par sécrétion de cytokines et autres médiateurs (Hoquet-Bresciani 2000; Strieter and Mehrad 2009; Wilson and Wynn 2009).

L'endothélium lésé induit aussi une **fibrogénèse** de façon plus directe en sécrétant des promoteurs de la prolifération fibroblastique (IL1, PDGF) et en surexprimant un facteur de croissance des cellules mésenchymateuses ($\text{TGF-}\alpha$) responsable majeur de la FP (Baughman et al. 1999; Hoquet-Bresciani 2000; Razzaque and Taguchi 2003).

1.2.1.2. Lésions de l'épithélium alvéolaire

1.2.1.2.1. Les cellules épithéliales

Les PI, responsables des échanges gazeux et régulateurs de la pression alvéolaire, sont les cellules majoritaires (95 %) de l'épithélium alvéolaire (Williams 2003). Le reste de l'épithélium est constitué de pneumocytes II (PII) producteurs de surfactant et permettant, avec les PI, le maintien de la barrière alvéolocapillaire (Ober et al. 2007).

Lors d'une agression alvéolaire, les lésions des PI prédominent sur celles des PII en raison de leur plus grande susceptibilité. Lors de mort cellulaire, les PII adjacents prolifèrent afin de recouvrir les régions dénudées et prennent secondairement l'apparence de PI aplatis. Si l'agression est chronique, un **changement métaplasique et hypertrophique des PII** peut s'observer avec anomalies de production du surfactant. La bordure normale de PI plats est finalement remplacée par des cellules cuboïdes ciliées ressemblant aux cellules bronchiolaires, d'où le terme de « **bronchiolisation** » (Adamson and Bowden 1974; Evans et al. 1975; Hoquet-Bresciani 2000).

1.2.1.2.2. La lame basale

Les lésions épithéliales ont pour conséquence la formation d'une **brèche** dans la membrane basale. Si le dommage est minime, une réparation normale avec réépithélialisation par prolifération de PII est possible. Cependant, si la destruction de la lame basale est trop importante, la probabilité d'une réparation normale diminuera, car l'échafaudage guide de la régénération aura disparu (Strieter and Mehrad 2009). Ces brèches de la lame basale permettent le passage de fibroblastes et de protéines sériques dans les espaces alvéolaires, ce qui participe à la formation de l'exsudat inflammatoire et au processus fibrotique intra-alvéolaire (Strieter and Mehrad 2009).

1.2.1.3. Lésions de l'interstitium

L'altération de la perméabilité des épithéliums, des lames basales alvéolaires et des capillaires conduit à une **infiltration inflammatoire interstitielle**. Les cellules de l'infiltrat, surtout les PMN avec leur contenu enzymatique, détruisent le collagène et l'élastine, perturbant l'architecture de l'interstitium (Chua and Laurent 2006; Manoury et al. 2007).

1.2.2. Réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est la réponse à l'agression d'origine exogène encourue par les cellules. Elle a pour conséquence de contribuer aux modifications histopathologiques de la FP, d'une part en aggravant les lésions initiales et d'autre part en modulant les phénomènes de réparation tissulaire. Différentes cellules sont recrutées successivement : les PMN neutrophiles, les PMN éosinophiles, les macrophages, les lymphocytes et les plaquettes (**Figure 2**) (Ross and Odland 1968).

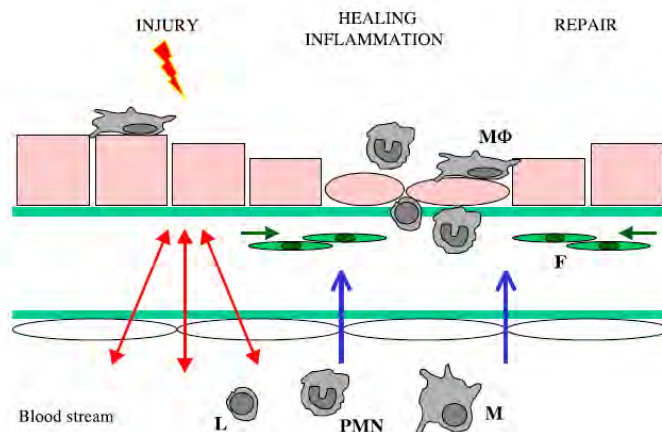


Figure 2. Schématisation du processus séquentiel de recrutement de cellules inflammatoires faisant suite à une agression tissulaire. Après blessure du tissu, des cytokines et chimiokines sont libérées du sang, des tissus lésés ou des cellules du parenchyme (flèches rouges). Cette production stimule rapidement l'extravasation de leucocytes (lymphocytes [L], PMN et monocytes [M]) et leur émigration vers le tissu (flèches bleues). Les PMN sont les premières cellules arrivant au site d'agression, suivies des monocytes (M) qui se différencient en macrophages (MΦ). Finalement, la réponse immune est complète avec la transmigration des lymphocytes (L). La production d'une pléthore de cytokines et de facteurs de croissance déclenche aussi la migration de cellules résidentes et de fibroblastes (F) (flèches vertes) ayant pour fonction la restauration de l'intégrité tissulaire. Les plaquettes, quant à elles (non indiquées sur le schéma), participeront surtout à la restauration de l'endothélium (Chanson et al. 2005).

1.2.2.1. Les polymorphonucléaires neutrophiles

Le **recrutement** des PMN neutrophiles est fonction de facteurs libérés lors de l'agression interstitielle (collagène, fibrinogène) et de l'endothélium vasculaire (prostaglandines, leucotriène B₄, C_{5a}), ainsi que de la libération d'une chimiokine, IL-8 (Leavell et al. 1996; Downey et al. 1999; Hoquet-Bresciani 2000; Reichel et al. 2008). L'**activation** des PMN est induite par l'IL-8 libérée par les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales alvéolaires. Les conséquences de cette activation sont : 1) la formation de lésions tissulaires par libération d'enzymes et de radicaux libres; 2) la synthèse de leucotriène B₄

(activateur de la prolifération fibroblastique) et de la prostaglandine E2 (inhibiteur de la prolifération fibroblastique); 3) la synthèse de protéases permettant une augmentation de la prolifération fibroblastique en détruisant des protéines de surface de contre-régulation; 4) le relargage d'une cytokine, GM-CSF, qui participe à la fibrose en induisant l'expression de TGF- β (Andreutti et al. 1998; Hoquet-Bresciani 2000; Cottin 2002; Wright et al. 2010).

1.2.2.2. Les polymorphonucléaires éosinophiles

Les facteurs intervenant dans le **recrutement** et l'**activation** des PMN éosinophiles dans le processus pathogénétique de la FP sont, à ce jour, inconnus. Ce type de PMN y est souvent abondant et contribue à l'agression tissulaire en libérant, par dégranulation, des **substances cytotoxiques** : oxydants, protéines cationiques éosinophiliques et protéines basiques majeures. Ils libèrent aussi de l'histamine et des leucotriènes qui augmentent la perméabilité vasculaire et, de ce fait, favorisent le recrutement de médiateurs de la fibrogénèse (Hoquet-Bresciani 2000; Suzuki et al. 2008).

1.2.2.3. Les macrophages

Les macrophages proviennent de monocytes, eux-mêmes issus d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Lors d'une agression, les monocytes sanguins migrent dans le tissu conjonctif environnant le site d'agression. Ce **recrutement** est déclenché par la présence, à l'intérieur du vaisseau sanguin, de substances chimiques chimiotactiques (collagène, fibronectine) issues de la lésion tissulaire, de l'activation plaquettaire et de l'activation du complément (Hoquet-Bresciani 2000; Burke and Lewis 2002). Une fois arrivées dans le tissu cible, les cellules myéloïdes se différencient en macrophages sous l'action du GM-CSF produit par les lymphocytes T, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Goldstein and Fine 1995; Hoquet-Bresciani 2000).

L'**activation** des macrophages est induite par les complexes immuns, les stimuli phagocytiques et les leucotriènes (Crystal et al. 1981; Hunninghake et al. 1981; Burke and Lewis 2002). Cette activation aura pour conséquence une intervention macrophagique dans le processus d'agression tissulaire, le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires, la réparation tissulaire et la fibrogénèse.

D'une part, les macrophages activés participent à l'agression tissulaire par la libération de médiateurs repris en **Tableau 1**. D'autre part, les macrophages contribuent au recrutement et à l'activation des cellules inflammatoires par la libération de médiateurs (**Tableau 1**) ou des stimuli phagocytiques qui activent les PMN (Suzuki et al. 2008). Enfin, les macrophages favorisent la réparation tissulaire et la fibrogénèse par la synthèse de molécules spécifiques (**Tableau 1**).

Dans les poumons, on peut distinguer 3 **types** de macrophages : alvéolaires, interstitiels et intravasculaires. La réaction inflammatoire, présente lors de la phase précoce de développement de la FP, est en partie sous le contrôle cellulaire des macrophages alvéolaires. C'est pourquoi, lors de cette phase, une accumulation de macrophages alvéolaires activés est observée (Taylor et al. 2000).

Tableau 1. Médiateurs libérés par les macrophages et favorisant l'agression tissulaire, le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires, et enfin, la réparation tissulaire et la fibrogenèse.

Médiateurs de l'agression tissulaire		
Médiateurs	Fonction(s)	Référence(s)
Radicaux libres	- peroxydation des lipides membranaires	(Suzuki et al. 2008)
TNF- α	- augmentation de la perméabilité vasculaire	(Hunt et al. 1984)
Enzymes protéolytiques (MMP-9, etc.)	- dégradation et remodelage de la MEC	(Hunt et al. 1984)
Médiateurs du recrutement et de l'activation des cellules inflammatoires		
Médiateurs	Fonction(s)	Référence(s)
TNF- α	- facilite l'adhésion des cellules sanguines sur les cellules endothéliales	(Suzuki et al. 2008)
IL-1	- augmente l'expression de GM-CSF	(Fahey et al. 1990)
	- chimiotactique pour les monocytes/ neutrophiles	
	- stimule la prolifération de lymphocytes T	
GM-CSF	- induit la production du GM-CSF	(Andreutti et al. 1998)
	- induit la synthèse de TGF- β par les macrophages alvéolaires	
MCP-1	- chimiotactique pour les monocytes	(Smith et al. 1994)
Médiateurs de la réparation tissulaire et de la fibrogenèse		
Médiateurs	Fonction(s)	Référence(s)
TNF- α	- stimule la prolifération fibroblastique	(Suzuki et al. 2008)
IL-1	- induit la synthèse de collagène	(Fahey et al. 1990)
TNF- β	- recrutement et stimulation fibroblastique	(Kovacs and DiPietro 1994)
IGF-1	- stimule la prolifération fibroblastique	(Uh et al. 1998)
	- stimule la synthèse de collagène	
Fibronectine	- facteur chimiotactique et de croissance pour les fibroblastes	(Rennard et al. 1981)
PDGF	- facteur de croissance pour les fibroblastes	(Cordier et al. 1983)

1.2.2.4. Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules immunitaires réparties en deux lignées : les lymphocytes B et les lymphocytes T, tous deux impliqués dans le processus inflammatoire de la FP. Les **lymphocytes B** sont recrutés puis induits par des facteurs chimiotactiques. Cette **activation** joue un rôle dans la FP au vu de la présence de complexes immuns et d'immunoglobuline G dans l'interstitium (Dreisin et al. 1978; Lawrence et al. 1980; Crystal et al. 1981; Gelb et al. 1983). Les complexes immuns activent le complément et les cellules phagocytaires, ce qui aura pour **conséquence** d'amplifier la réaction inflammatoire.

Le **recrutement des lymphocytes T** est induit par des facteurs chimiotactiques dérivés des macrophages. S'ensuit une **activation** de lymphocytes par la reconnaissance d'antigènes en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages). Une fois activés, les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur à l'IL-2 et secrètent de l'IL-2 : on observe

donc une autostimulation et une stimulation des lymphocytes T adjacents. L'IL-2 sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires provoque l'expansion clonale des précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques et leur maturation en cellules cytotoxiques effectrices. Ces lymphocytes T cytotoxiques participent au processus lésionnel du parenchyme pulmonaire en libérant des enzymes et des perforines qui transpercent la membrane des cellules cibles et entraînent la mort cellulaire (Hoquet-Bresciani 2000).

Les lymphocytes T activés sécrètent les molécules reprises dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Médiateurs libérés par les lymphocytes T activés lors d'une inflammation.

Médiateurs	Fonction(s)	Référence(s)
Lymphokines	- stimulent la production de macrophage-derived growth factor (MDGF) par les macrophages alvéolaires	(Hoquet-Bresciani 2000)
Facteurs chimiotactiques	- attirent les phagocytes vers les sites d'activation des lymphocytes T	(Hoquet-Bresciani 2000)
MIF (facteur d'inhibition de la migration)	- retient les macrophages sur les sites en question	(Hoquet-Bresciani 2000)
MAF (facteur d'activation de la migration)	- active l'arsenal enzymatique des macrophages	(Deng and Standiford 2010)
INF- γ	- activateur des macrophages qui stimulent ou inhibent les fibroblastes en fonction de leur état de prolifération	(Wynn 2011)
TGF- β	- stimule la synthèse de collagène et de la fibronectine par les fibroblastes - inhibe la prolifération de lymphocytes T	(Cherniack et al. 1991)

1.2.2.5. Les plaquettes

La lésion endothéliale provoque une hémorragie microscopique à l'origine d'une agrégation et d'une activation plaquettaire (Joris and Braunstein 1982). Cette **activation** mène à la libération de médiateurs inflammatoires et fibrogéniques : 1) le PDGF, chimiotactique pour les cellules musculaires lisses et les monocytes, et facteur de croissance pour les fibroblastes ; 2) le TGF- β qui stimule la synthèse du collagène par les fibroblastes ; 3) le 12-HETE, chimiotactique pour les fibroblastes (Hoquet-Bresciani 2000).

1.2.3. Réparation tissulaire aboutissant à la fibrose

La FP résulte de l'accumulation de cellules mésenchymateuses et de la MEC qu'elles produisent, et ce, par exagération des mécanismes physiologiques de réparation tissulaire.

1.2.3.1. Les fibroblastes

Le **recrutement** des fibroblastes au niveau du site d'inflammation est induit par le PDGF, le TGF- β et la fibronectine (Hoquet-Bresciani 2000). Une fois recrutées, ces cellules présentent une capacité de différenciation présente notamment dans certaines conditions pathologiques. Dans la FP, les fibroblastes modifient leur phénotype afin d'acquérir un cytosquelette contractile (Cordier and Loire 1991) leur permettant ainsi de devenir des myofibroblastes, cellules intermédiaires entre le fibroblaste et la cellule musculaire lisse. Les **myofibroblastes** contribuent à l'aggravation du collapsus alvéolaire et à la rétraction pulmonaire (Cordier et al. 1983) via l'augmentation de la MEC et plus précisément de certains de ses constituants comme le collagène et les glycosaminoglycans (GAG).

1.2.3.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire se compose d'un ensemble de macromolécules extracellulaires produites par les cellules et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Parmi elles, le collagène et les GAG jouent un rôle majeur dans la genèse de la FP.

1.2.3.2.1. Le collagène

La quantité de collagène présente dans le poumon résulte d'une **régulation** fine entre synthèse et catabolisme. Le renouvellement du collagène est contrôlé par les MMP et les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteases), produits par les granulocytes, les macrophages et les myofibroblastes (Wynn 2007). Dans la FP, on observe une augmentation de la synthèse de collagène (types I, III, VI) et une diminution de l'activité collagénolytique aboutissant à un dépôt excessif du substrat dans l'interstitium (Razzaque and Taguchi 2003). Au stade précoce de la pathologie, la MEC est lâche et riche en collagène III, susceptible de remodelage. Au stade tardif, la MEC est dense avec une prédominance du collagène I (Cordier et al. 1983). Les fibres de type I étant plus rigides que celles de type III, elles contribueraient à la diminution de compliance du poumon fibrotique (Crystal et al. 1976).

Parmi toutes les molécules capables de réguler la déposition matricielle, le **TGF- β 1** est probablement le plus étudié. Ce facteur de croissance fibrogénique est augmenté dans le parenchyme pulmonaire de patients atteints de FP ; à son tour, il stimule la production de collagène et régule l'expression de divers gènes associés à la dégradation et la protéolyse de la MEC (Cook et al. 2002).

1.2.3.2.2. Les glycosaminoglycans

Les GAG sont des polysaccharides complexes synthétisés par les cellules interstitielles, endothéliales et épithéliales. Ils comprennent d'une part l'HA, dépourvu de liaisons covalentes, et d'autre part la chondroïtine, la chondroïtine sulfate, l'héparine, l'héparan sulfate, le dermatan sulfate et le kératan sulfate, qui sont liés à des protéines pour former des protéoglycans. Les GAG prédominent dans les tissus conjonctifs, les MEC, à la surface cellulaire, et dans les granules de sécrétion (Jadin 2008).

Dans la FP, on note une **augmentation** des GAG qui serait due à une augmentation de leur synthèse par les fibroblastes. Les conséquences majeures de cette augmentation de GAG sont l'épaississement de la paroi alvéolaire et le changement de composition de la barrière alvéolaire (dermatan sulfate au lieu d'héparan sulfate) qui entraîne une augmentation de la perméabilité permettant aux médiateurs fibrogéniques intraalvéolaires d'entrer dans l'interstitium et de stimuler la prolifération fibroblastique et la synthèse de collagène (Hoquet-Bresciani 2000).

1.2.4. Conséquences physiopathologiques

De par ses caractéristiques histologiques, la FP induit trois modifications physiologiques majeures conduisant in fine à des altérations des propriétés fonctionnelles pulmonaires. Ces modifications physiologiques sont : l'augmentation de la perméabilité des capillaires alvéolaires, la diminution de la diffusion en O₂ et la diminution de la capacité pulmonaire totale (= volume d'inflation maximum).

- **L'augmentation de la perméabilité des capillaires alvéolaires** est causée par les lésions cellulaires encourues lors de la phase d'agression de la FP. Elle aura pour conséquence la formation d'œdème interstitiel et le passage de protéines sériques dans les espaces alvéolaires, ce qui participe à la fibrogénèse (Hoquet-Bresciani 2000; King 2009).

- La **diminution de la diffusion en oxygène** est principalement due à l'épaississement de la barrière alvéolocapillaire induite par l'augmentation de la synthèse du collagène lors de la fibrose (Hoquet-Bresciani 2000; Razzaque and Taguchi 2003).
- La **diminution de la capacité pulmonaire totale** a deux origines : la première est l'accumulation de collagène de type I, la seconde est l'accumulation d'élastine et de GAG dans l'interstitium. Ces modifications auront pour conséquence directe une diminution de la compliance pulmonaire, dont du volume d'inflation maximum (Hoquet-Bresciani 2000; King 2009).

Ces modifications de paramètres fonctionnels pulmonaires pourraient engendrer diverses **modifications mécaniques** du poumon telles que des efforts respiratoires augmentés (menant à la dyspnée et à la tachypnée), une hypocapnie (conséquence de la tachypnée) et une hypoxémie (conséquence essentiellement de l'altération de la diffusion de l'oxygène (Hoquet-Bresciani 2000).

2. *Les macrophages alvéolaires, régulateurs majeurs de l'inflammation et de la fibrose*

Dans le poumon, les macrophages alvéolaires ont une **origine** double : soit ils proviennent de la migration dans le tissu de monocytes sanguins périphériques (Thomas et al. 1976), soit ils résultent de la répllication de phagocytes mononucléaires locaux (Chen et al. 1988). Ils jouent un **rôle pivot dans la genèse de la fibrose** (Figure 3) grâce à leur capacité de polarisation et l'action d'un complexe moléculaire qu'ils possèdent, appelé inflammasome.

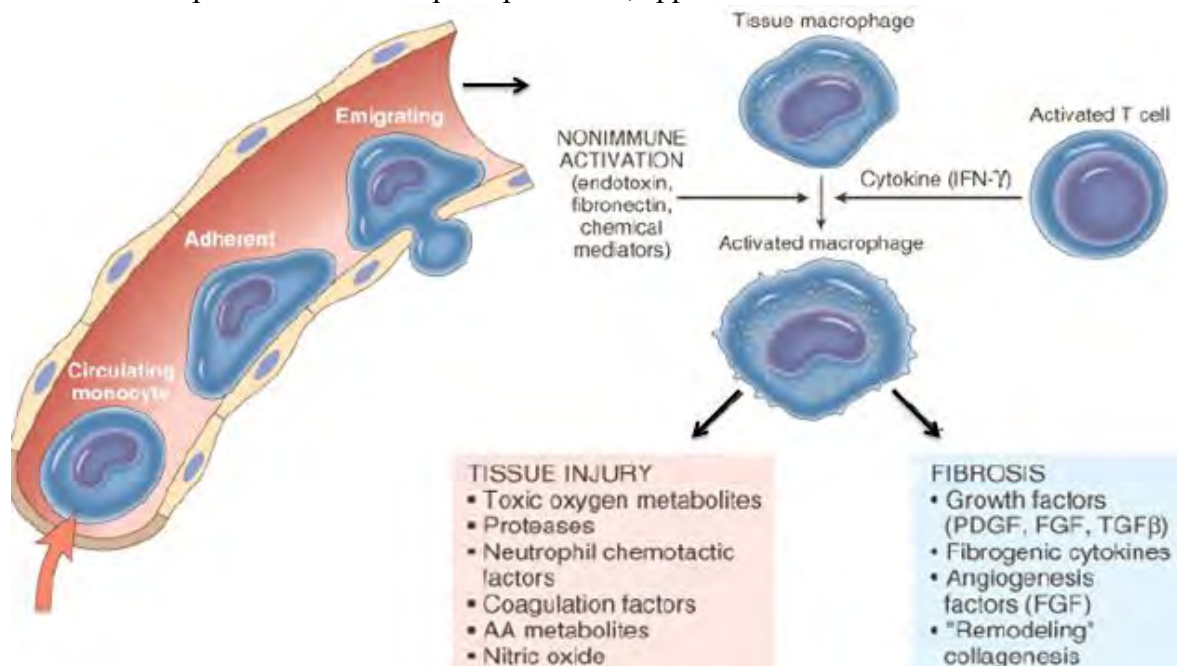


Figure 3. Rôle des macrophages activés dans la phase inflammatoire et la phase fibrotique de la FP. Après leur migration dans le tissu, les macrophages sont activés par des stimuli immunogéniques ou non immunogéniques. Leur activation conduit à la production de molécules responsables de lésions tissulaires et fibrotiques (Kumar et al. 2005).

2.1. Polarisation des macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont capables de changer leur phénotype et leurs propriétés fonctionnelles selon des stimuli exogènes ou des processus pathologiques (Taylor et al. 2000). Deux sous populations ont été caractérisées : les macrophages activés M1 classiques et les macrophages activés M2 alternatifs (**Figure 4**).

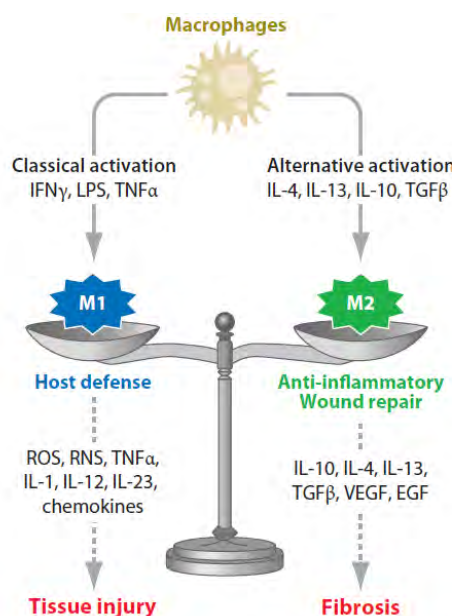


Figure 4. Modèle décrivant le rôle des macrophages actifs classiques et alternatifs dans le processus d'agression et de réparation pulmonaires (Laskin et al. 2011).

Les **macrophages activés M1 classiques** ont été activés par des cytokines de type I (IFN- γ , TNF- α) ou après reconnaissance de structures conservées des pathogènes (PAMP ; pathogen-associated molecular patterns) et de signaux de dangers endogènes. Ces cellules peuvent induire de fortes réponses immunitaires proinflammatoires de type Th1. Elles peuvent aussi exercer des activités antiprolifératives et cytotoxiques qui résultent de la libération de ROS et de cytokines proinflammatoires (IL-1, TNF - α , etc.).

Les **macrophages activés M2 alternatifs** contrebalancent l'action des macrophages M1. Ils sont principalement impliqués dans la régulation négative de l'inflammation et l'initiation de la cicatrisation par la libération des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13). Les macrophages M2 contribuent aussi à la résolution de l'inflammation en phagocytant des neutrophiles et en synthétisant des médiateurs importants dans le remodelage tissulaire et l'angiogenèse (TGF- β , VEGF, EGF). Les macrophages M2 soutiennent les fonctions effectrices associées aux Th2 et jouent un rôle clé dans la régulation fonctionnelle des lymphocytes T. Une telle diversité de fonction est expliquée par le fait que les macrophages M2 sont subdivisés en trois souspopulations : M2a (activés par IL-4 et IL-13), M2b (activés par les complexes immuns combinés à l'IL-1 β ou les LPS), et M2c (activés par IL-10, TGF- β , ou les glucocorticoïdes).

En accord avec ce **modèle (Figure 4)**, les macrophages répondant à l'agression tissulaire sont activés par des signaux inflammatoires issus de leur microenvironnement. Ils se différencient en macrophages M1, qui synthétisent des médiateurs immuns cruciaux, ou en macrophages M2 qui génèrent des produits anti-inflammatoires et initient la cicatrisation. Un déséquilibre de l'activité de ces deux populations macrophagiques, pouvant se produire durant une exposition à un toxique (bléomycine, etc.), conduit à la formation de lésions tissulaires. Ces lésions sont soit accompagnées d'une production excessive de médiateurs proinflammatoires si l'activation des M1 est exacerbée, soit accompagnées d'une fibrose dans le cas où l'activation des M2 est excessive (**Tableau 3**).

Tableau 3. Médiateurs libérés par les macrophages actifs classiques (M1) et alternatifs (M2) lors de lésions pulmonaires à la bléomycine et impliqués dans l'agression et la réparation pulmonaires (Laskin et al. 2011).

Médiateurs M1	
Espèces réactives de l'oxygène	(Inghilleri et al. 2006)
Espèces réactives de l'azote	(Genovese et al. 2005; Inghilleri et al. 2006; Becher et al. 2007)
Protéases	(Okuma et al. 2004)
Médiateurs M2	
TGF- β	(Pulichino et al. 2008)

2.2. Macrophages alvéolaires et inflammasome

De nombreuses cellules immunitaires, telles que les macrophages alvéolaires, contiennent des **complexes moléculaires cytoplasmiques** appelés inflammasomes. Bien que la diversité des inflammasomes soit encore mal connue, on en distingue 3 prototypes : le NALP1, le NALP3 et l'IPAF (Davis et al. 2011). Ces plateformes centrales de l'immunité innée sont composées de protéines échafauds et de senseurs de la famille des NLR (NOD-like receptors). L'**activation** de l'inflammasome est induite par des fractions de polymères associés au danger, au dommage et à la mort cellulaire. Ainsi, l'inflammasome NALP3 est sensible à la mauvaise localisation de molécules endogènes telles que l'ATP, l'acide urique et même l'HA (Yamasaki et al. 2009; Davis et al. 2011). Par exemple, l'ATP extracellulaire, libéré en conséquence des dommages cellulaires ou du stress cellulaire, joue le rôle de signal de danger activant ainsi l'inflammasome NALP3 et permettant la maturation et l'activation de l'IL-1 β par la caspase-1 (**Figure 5**). De plus l'activation de l'IL-1 β conduit à l'initiation de la voie de signalisation dépendante de MyD88, très similaire à celle des TLR. Il en est de même pour l'acide urique, les ROS et l'HA qui sont notamment induits dans un modèle de FP induite par la bléomycine (Davis et al. 2011).

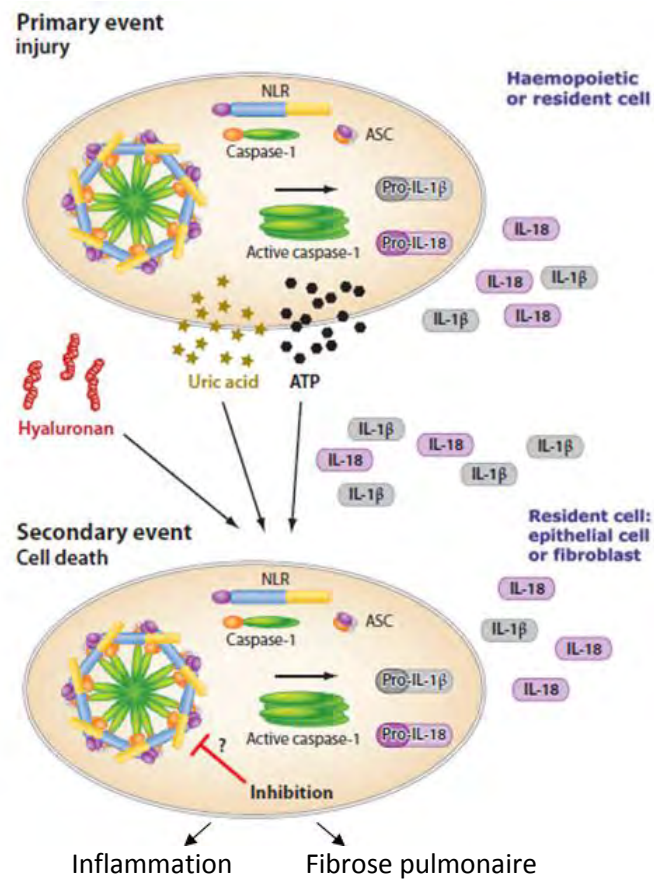


Figure 5. Schématisation de la cascade d'activation de l'inflammasome au cours d'une inflammation pulmonaire non infectieuse. L'événement initial conduit à l'activation de la caspase-1, la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18, et la mort cellulaire. Celle-ci peut libérer une seconde série d'activateurs de l'inflammasome de manière à générer une sécrétion paracrine par feedback positif. La cascade d'activation mène à l'inflammation et à sa résolution, ou bien à la fibrose pulmonaire dans le cas d'une activation exacerbée. (Gasse et al. 2009; Davis et al. 2011).

3. L'HA, un GAG particulier

3.1. Structure

L'HA est un GAG, constituant majoritaire de la MEC. Il est composé de plusieurs centaines d'**unités dissacharidiques** N-acétylglucosamine/ acide glucuronique liés par des liaisons glycosidiques alternées β (1-4) et β (1-3). L'HA n'est ni sulfaté, ni épimérisé (**Figure 6**) (Jiang et al. 2011).

Le PM de l'HA varie entre 10^5 et 10^7 Da (Dalton) en fonction des tissus. Dans le poumon sain, par exemple, l'HA n'aurait qu'une « taille » moyenne de 220 kDa (Nettelbladt et al. 1989).

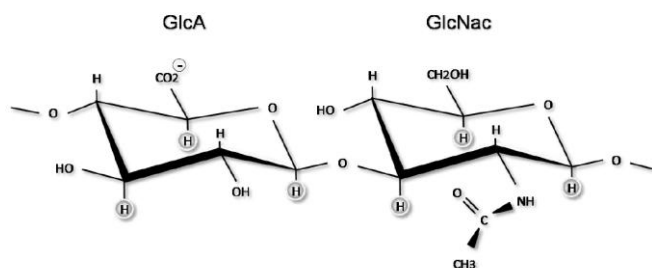


Figure 6. Structure de l'HA composée d'unités disaccaridiques constituées d'acide glucuronique (GlcA) et de N-acetylglucosamine (GlcNAc) en conformation β , liés ensemble par des liaisons glycosidiques alternées $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ (Jiang et al. 2011).

3.2. Localisation

Chez les vertébrés, la localisation de l'HA est **ubiquitaire**. Sa **répartition** est à la fois intra- et extra- cellulaire. Dans l'espace extracellulaire, il forme des agrégats avec des protéoglycans (Heinegard and Hascall 1974), alors qu'en intracellulaire, il se localise soit de manière diffuse, soit concentré dans les cavéoles, les endosomes et le noyau (Eggli and Graber 1995; Evanko et al. 1999; Evanko and Wight 1999; Tammi et al. 2001).

Dans le poumon, l'HA représente près de 10 % de l'ensemble des protéoglycans (Laurent and Fraser 1992).

3.3. Biosynthèse

L'HA est synthétisé par des enzymes nommées **HA synthases** (HAS) subdivisées en deux classes. Les HAS de Classe I regroupent les enzymes présentes chez certains microorganismes (streptocoques), les amphibiens, les oiseaux et les mammifères. Les HAS de Classe II sont, quant à elles, exclusivement présentes chez le bacille *Pasteurella multocida* (pmHAS) (DeAngelis 1999). Seules les synthases de la famille de Classe I seront abordées puisqu'elles sont en lien direct avec notre sujet d'étude.

3.3.1. Les HA synthases mammaliennes

Les enzymes capables de synthétiser l'HA à la surface interne de la membrane plasmique sont l'**HAS1**, **2**, et **3** (Jiang et al. 2011). Ces dernières sont le produit respectif de la transcription des gènes Has 1, 2, et 3.

Le **mécanisme d'action** des HAS consiste à catalyser l'addition d'un UDP(uridine diphosphate)-N-acetylglucosamine et d'un acide UDP-glucuronique à l'extrémité réduite de la chaîne d'HA pendant que l'extrémité non réduite grandit dans l'espace péricellulaire. L'UDP du sucre nouvellement attaché reste lié de manière covalente à la molécule de l'HA qui sert de donneur à la réaction de transfert suivante (Prehm 1989). Ainsi, contrairement aux autres composants du tissu conjonctif, l'HA ne doit pas traverser les différents compartiments de la voie de sécrétion liée au Golgi.

L'**activation** de la synthèse de l'HA est induite par de multiples stimuli, incluant des facteurs de croissance (EGF, PDGF, TGF- β , FGF-2) et des cytokines (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) (Laurent et al. 1986; Heldin et al. 1989; Lim et al. 2008). Le processus de synthèse est ensuite **régulé** via des événements post-transcriptionnels tels que la phosphorylation et l'ubiquitination

des HAS (Tammi et al. 2011). La **variabilité synthétique** de l'HA est aussi fonction des caractéristiques de l'enzyme qui la synthétise. En effet, les HAS1, 2 et 3 se caractérisent par une variabilité d'expression, d'activation et de polymérisation (**Figure 7**) (Tien and Spicer 2005). Les HAS1, 2 et 3 ont un ordre respectif d'activité croissante. De plus, les deux premières synthétisent de l'HA de haut PM (jusqu'à 2 mégadaltons) alors que la dernière produit des HA d'un PM allant de 100 à 1.000 kDa (Spicer and McDonald, 1998). Or, les **propriétés biologiques de l'HA** sont dépendantes de sa taille, ce qui impliquerait que l'expression des isoformes spécifiques des HAS soit impliquée dans la régulation de ces propriétés. Toutefois, on pense que la régulation de la taille de l'HA survient principalement lors de sa phase catabolique plutôt que durant sa phase anabolique.

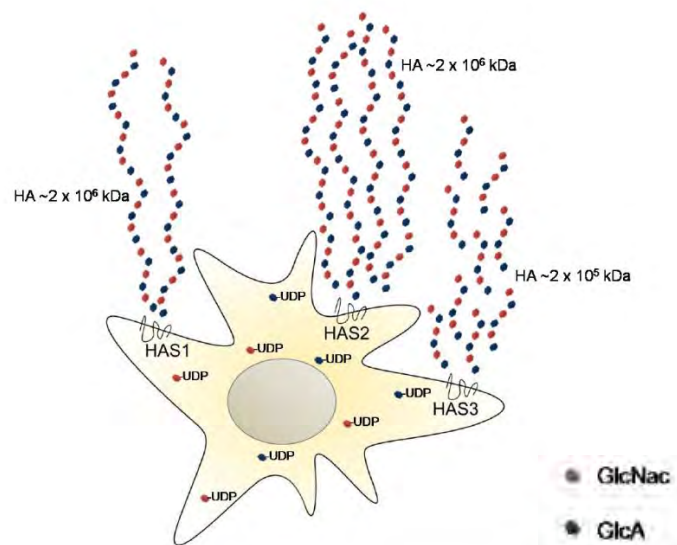


Figure 7. Trois synthases mammaliennes polymérisent l'HA en différentes longueurs et en différentes quantités (Spicer and McDonald 1998; Jadin 2008).

3.3.2. Exportation de l'HA

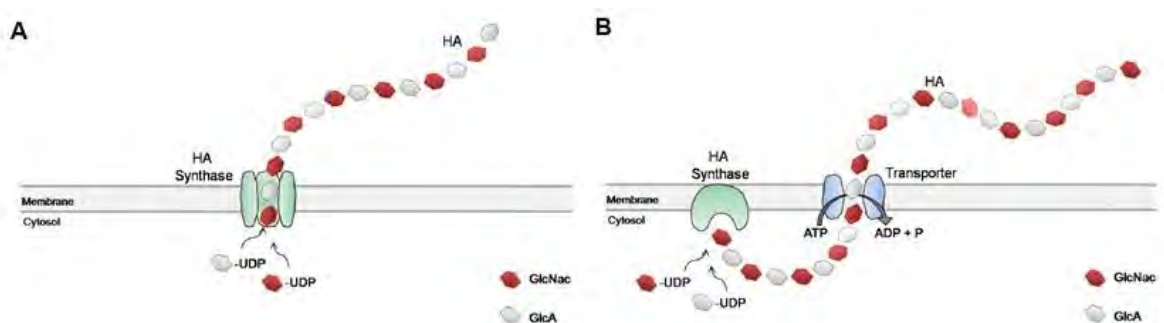


Figure 8. Deux modèles de synthèse et d'exportation de l'HA. **A.** Synthèse et exportation de l'HA dans l'espace extracellulaire par une HAS. **B.** Synthèse de l'HA par une HAS à la membrane plasmique suivie de son exportation via un transporteur ABC (Weigel 2004; Jadin 2008).

Au cours de la synthèse de l'HA, les polymères d'HA sont extrudés par un **mécanisme inconnu** à travers la membrane plasmique dans le glycocalyx ou dans la MEC (Stern 2004). Le processus d'extrusion permettrait la croissance libre du polymère jusqu'à des tailles allant de 1.000 à 10.000 kDa. Deux **modèles hypothétiques** de synthèse et d'exportation de l'HA ont

été établis. Le premier s'appuie sur un mécanisme de transport de l'HA à travers un pore formé par les HAS (Tlapak-Simmons et al. 1998; Weigel 1998; Weigel 2004) (**Figure 8-A**). Le second préconise un mécanisme d'exportation dépendant de l'action d'un transporteur ABC (ATP-binding cassette) (**Figure 8-B**) (Ouskova et al. 2004).

La synthèse de l'HA peut aussi être facilitée par la formation de **protrusions** induites par la surexpression des synthases. Les protrusions augmentent la surface de la membrane plasmique et fournissent l'énergie nécessaire à la synthèse de l'HA. Les protrusions sont probablement les sites préférés de nombreux facteurs de croissance (TGF- β , etc.) qui voient ainsi leur signalisation accentuée. De tels mécanismes peuvent délivrer l'HA dans la matrice, loin du corps cellulaire principal et ainsi fournir un environnement adéquat pour la migration cellulaire (Rilla et al. 2008).

Une fois **hors de la cellule**, l'HA peut diffuser dans la MEC ou rester attachée à la surface cellulaire par le biais de récepteurs. Toutefois, une autre possibilité est que l'HA réside **dans la cellule**, par le biais de récepteurs ou d'une endocytose en phase fluide, ce qui se produit lors de processus inflammatoires (Hascall et al. 2004).

3.4. Catabolisme

3.4.1. Les hyaluronidases mammaliennes (dégradation enzymatique)

Les enzymes capables de cliver et dégrader de manière spécifique l'HA sont nommées **hyaluronidases** et sont classées en trois groupes : les hyaluronidases de bactéries, celles des sangsues, crustacés et autres parasites, et enfin les hyaluronidases de mammifères (Stern and Csoka 2000). Seules ces dernières entrent dans le cadre de notre étude et seront donc abordées dans ce chapitre, avec une attention particulière pour Hyal2.

Chez les mammifères, les **gènes** codant pour des hyaluronidases sont au nombre de six: Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, Ph-20 (Spam1) et Hyalp1 (Csoka et al. 2001). Ces gènes sont regroupés sur deux chromosomes différents, et leur arrangement génomique est conservé à travers les espèces. Chez la souris, on trouve un septième gène codant pour une hyaluronidase appelé Hyal5 et absent chez l'humain (Kim et al. 2005).

Les hyaluronidases de mammifère sont des endo- β -N-acetylhexosaminidases ayant pour **mécanisme d'action** des activités hydrolytiques et trnglycosidases. Ces enzymes sont capables de dégrader l'HA en tétrasacharides et en hexasaccharides mais elles ne sont pas spécifiques de l'HA. En effet, les hyaluronidases peuvent dégrader, dans une faible mesure, la chondroïtine sulfate et le dermatan sulfate (Stern and Csoka 2000). Seules Hyal1 et Hyal2 sont exprimées à un niveau significatif dans les tissus somatiques et seront détaillées ci-dessous.

Hyal1 est une enzyme ubiquitaire mais semble absente dans le cerveau. Sa concentration est plus élevée dans les organes parenchymateux tels que le foie, les reins, la rate et le cœur (Csoka et al. 2001). Elle a un pH d'activité optimal de 3,8 et est considérée comme une enzyme lysosomale clivant l'HA, aux liaisons β (1-4), en tétrasaccharides et en hexasaccharides (Harada and Takahashi 2007). Hyal1 peut à la fois cliver l'HA de haut PM et de bas PM. Récemment, une équipe de l'URPhyM a montré qu'Hyal1 est endocytée du plasma dans les hépatocytes où elle pourrait exercer son activité dans des lysosomes précoces (Gasingirwa et al. 2010). Dans le poumon, c'est dans les macrophages alvéolaires que

l'HYAL1 semble la plus présente (Goggins et al. 1968).

Hyal2 est une protéine présente dans de nombreux tissus. La traduction du gène codant pour la protéine est plus élevée dans certains organes comme la rate fœtale et adulte, le foie, le cœur et les poumons (Patel et al. 2002). Dans les tissus, Hyal2 se situe principalement ou exclusivement à la membrane plasmique cellulaire (Rai et al. 2001; Harada and Takahashi 2007; Andre et al. 2011), bien qu'elle ait été décrite parfois dans les endosomes ou lysosomes (Bourguignon et al. 2004; Chow et al. 2006; Monzon et al. 2008).

L'**activité** hyaluronidasique d'Hyal2 est difficile à mesurer pour plusieurs raisons : elle est faible, partielle, requiert des partenaires cellulaires, ou encore parce que les systèmes in vitro utilisés lors d'études ne miment pas les conditions in vivo (Lepperdinger et al. 1998; Bourguignon et al. 2004; Vigdorovich et al. 2005; Harada and Takahashi 2007; Vigdorovich et al. 2007). Vu son pH d'activité optimale acide (pH 3.8) (Harada and Takahashi 2007; Vigdorovich et al. 2007), il a été proposé que l'acidification par l'échangeur Na^+/H^+ NHE1 soit requise pour qu'Hyal2 puisse dégrader l'HA (Bourguignon et al. 2004) à la surface cellulaire ou dans des endosomes.

Hyal2 participe à la **dégradation partielle** de l'HA et génère des fragments ≤ 20 kDa (Lepperdinger et al. 1998; Jiang et al. 2011). Ce seuil de taille serait dû au fait qu'au dessus de 20 kDa, l'HA adopte une structure tertiaire qui est absente dans les fragments plus courts.

3.4.2. Modèle de dégradation somatique de l' HA

Dans le **modèle** de dégradation de l'HA le plus connu, Hyal1 et Hyal2 représentent les hyaluronidases principales des tissus somatiques mammaliens et agissent de concert avec les exoglycosidases lysosomales (β -N-acetylhexosaminidase et β -glucuronidase) pour la dégradation enzymatique de l'HA internalisé (**Figure 9**) (Csoka et al. 2001; Stern 2003; Stern 2004).

L'**internalisation cellulaire** de l'HA est réalisée par le biais de son récepteur principal, CD44 (Culty et al. 1992). Hyal2 et CD44 sont abondants dans les radeaux lipidiques, spécialement dans les cavéoles, où ils interagissent avec l'échangeur Na^+/H^+ NHE1. Lorsqu'il est stimulé, par exemple par l'HA pericellulaire, NHE1 crée un microenvironnement acide stimulant l'activité hyaluronidasique d'Hyal2 (Bourguignon et al. 2004).

La **dégradation enzymatique** de l'HA se fait en trois étapes. La première est une réaction endoglucosaminique, c'est-à-dire une attaque des liaisons β (1-4) internes de la molécule, catalysée par Hyal2 (Meyer and Rapport 1952). Cette enzyme, présente à la membrane plasmique, initie le clivage de l'HA en fragments intermédiaires de 20 kDa qui sont endocytés et se déplacent à travers le compartiment endosomal pour atteindre les lysosomes. Dans ces derniers, Hyal1, la β -glucuronidase et la β -N-acetylglucosaminidase dégradent les fragments d'HA en petits monomères et oligosaccharides. Ces deux dernières enzymes sont des exoglycosidases, c'est à dire des enzymes clivant les sucres terminaux de la molécule. De la sorte, les produits finaux du catabolisme de l'HA sont l'acide glucuronique et la glucosamine-6-phosphate, par le biais de la phosphorylation et la déacétylation de la N-acetylglucosamine. À ce jour, on ne sait pas s'il existe des transporteurs spécifiques qui permettraient aux fragments d'HA de quitter les lysosomes.

Stern a envisagé l'existence d'une organelle cellulaire spécifique, l'**hyaluronasome**, ayant un rôle dans le métabolisme de l'HA (Stern 2003; Stern 2004). L'hyaluronasome serait situé sous, et partiellement encastré dans, la membrane plasmique et posséderait des activités synthétiques et dégradatives spécifiques de l'HA (Stern 2003). Néanmoins, aucun résultat récent ne confirme ce modèle hautement hypothétique (**Figure 9**).

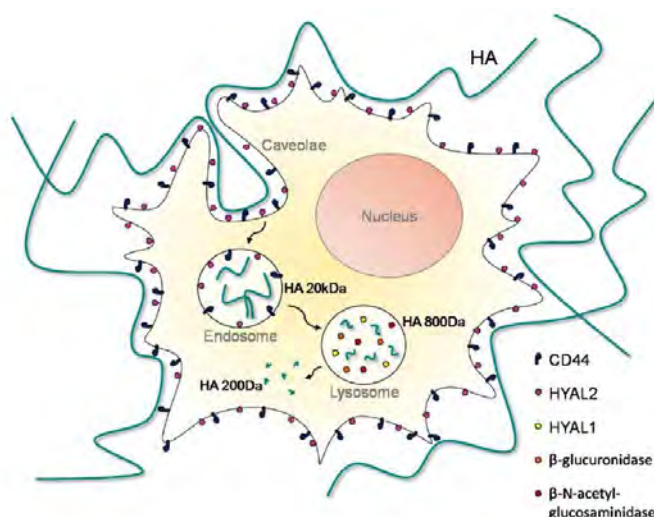


Figure 9. Modèle hypothétique de dégradation de l'HA dans les tissus somatiques. L'internalisation de l'HA est induite par le récepteur CD44. Hyal2 initie la dégradation de l'HA en fragments de 20 kDa qui sont par la suite dégradés dans les lysosomes par Hyal1 et les exoglycosidases β -glucuronidase et β -N-acetylglucosaminidase. (Stern 2004; Jadin 2008).

Dans un tissu pulmonaire sain, l'hyaluronasome serait situé au niveau du macrophage alvéolaire puisqu'il a pour fonction l'internalisation et la dégradation de l'HA (Underhill et al. 1993).

3.4.3. La dégradation non enzymatique de l'HA

L'HA peut être dégradé par un ensemble de **processus physicochimiques expérimentaux**, à savoir : l'hydrolyse alcaline et acide, la dégradation thermique, la photodégradation, la dégradation par ultrason et l'attaque par des ROS (Stern et al. 2007). Nous n'aborderons que le cas des ROS puisqu'ils sont impliqués dans notre modèle d'étude.

Les **ROS** ou radicaux libres sont des sous-produits du métabolisme de l'oxygène. La présence d'électrons non appariés dans leur structure les rendent hautement réactifs et capables d'oxyder d'autres molécules. Ils participent aussi à la dégradation de l'HA (Uchiyama et al. 1990), en particulier dans certains processus physiopathologiques tels que l'inflammation. L'attaque de l'HA par les ROS ne conduit pas à un simple clivage hydrolitique comme celui effectué par les hyaluronidases. En vérité, les macroradicaux intermédiaires formés réagissent avec d'autres molécules, donnant lieu à des fragments modifiés (Soltes et al. 2006). De tels fragments pourraient fonctionner comme des signaux pour l'initialisation d'une réponse lors d'un dommage tissulaire.

3.5. Hyaladhérines ou Hyaluronic acid binding proteins (HABP)

L'HA peut se lier à de nombreuses protéines connues sous le nom d'hyaladhérines ou

HABP. Parmi celles-ci, on trouve:

- Les **récepteurs de l'HA**: CD44, RHAMM (Receptor for Hyaluronan Mediated Motility), LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1), HARE (Hyaluronan Receptor for Endocytosis) et layilin (Lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor);
- Les **protéoglycans de type lectican** : aggrecan, versican, neurocan et brevican;
- D'autres **protéines**: cartilage link protein, TSG-6 (Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6), IαI (Inter- α -trypsin Inhibitor), les TLR, etc.

Ces différentes liaisons récepteur-ligand permettent le maintien de la structure des MEC ainsi que l'activation de diverses voies de signalisation impliquées dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques (Chen et al. 1988).

Ce chapitre se focalisera exclusivement sur une brève description de protéoglycans interagissant avec l'HA ainsi que sur certains récepteurs (CD44, RHAMM, TLR) intervenant dans le processus inflammatoire pulmonaire (**Figure 10**).

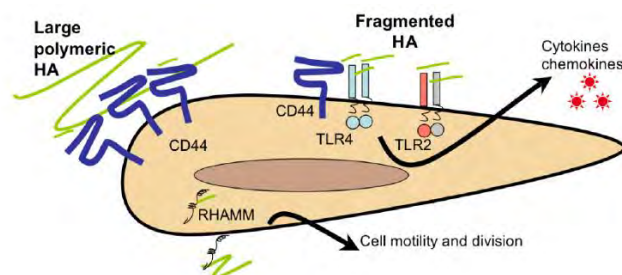


Figure 10. Reconnaissance cellulaire de l'HA durant les processus associés à la cicatrisation et l'inflammation (de la Motte 2011).

3.5.1. Protéoglycans de type lectican

Dans le poumon, l'HA peut exister en tant que polymère soluble et en tant qu'agrégat lors de sa liaison avec des protéoglycans tels que l'aggrecan et le versican. (Garg et al. 2003).

3.5.2. CD44

CD44 est une **glycoprotéine transmembranaire** considérée comme le récepteur principal de l' HA. Il est responsable du renouvellement de l'HA et de sa dégradation intracellulaire. CD44 participe aussi à la phagocytose de l'HA néosynthétisé en réponse à des agents nocifs. Ces fonctions pourraient lui conférer un rôle dans la régulation de l'homéostasie extracellulaire de l'HA (Culty et al. 1992). L'interaction HA-CD44 intervient dans divers processus physiologiques et physiopathologiques tels que l'inflammation (Lesley et al. 1997; Heldin et al. 2008). Lors du processus inflammatoire, on observe simultanément une libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TGF- β , IL-12, MIP-1 α , ect.) et une surexpression du récepteur CD44. Ce dernier permet la liaison de l'HA aux leucocytes et contribue à l'infiltration inflammatoire de ces leucocytes dans le tissu. Ainsi, le macrophage joue un rôle majeur dans le renouvellement de l'HA lors

d'inflammation et dans la phase de résolution inflammatoire (Hascall et al. 2004; de la Motte 2011).

3.5.3. RHAMM

RHAMM (ou CD 168) a été identifié comme une **hyaladhérine** impliquée dans la migration et la prolifération cellulaires (Hardwick et al. 1992). Il peut se rencontrer à la surface de la cellule ou en intracellulaire (Hall et al. 1995; Teder et al. 1995; Crainie et al. 1999). Les interactions RHAMM-HA sont aussi impliquées indirectement dans le processus inflammatoire, via le recrutement de cellules inflammatoires (Zaman et al. 2005).

3.5.4. Les TLR

Les TLR sont des **protéines transmembranaires** induisant une voie signalétique suite à leurs interactions avec les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ils peuvent interagir avec divers ligands endogènes tels que les fragments d'HA (Kopp and Medzhitov 1999). On identifie de plus en plus souvent TLR2 et TLR4 comme récepteurs des fragments d'HA présents dans la MEC, mais pas de l'HA natif (de la Motte 2011).

3.6. Taux de renouvellement

L'HA est une molécule à taux de renouvellement **élevé** : sur les 15 g d'HA que possède un individu de 70 kg, 5 g sont renouvelés quotidiennement (Harada and Takahashi 2007). Le taux de renouvellement de l'hyaluronan **varie** dans chaque tissu, suivant sa structure, son stade de maturité et son état. Cette variation conduit à la régénération, à la remodelisation ou à une augmentation temporaire de la synthèse d'HA dans le tissu (Laurent and Fraser 1992).

Lorsque la synthèse d'HA excède sa dégradation locale, ce polymère rejoint le **système réticuloendothélial**. Dans le tissu pulmonaire, il est raisonnable de supposer qu'une voie d'élimination principale de l'HA est le drainage lymphatique. Au cours de cette voie, le biopolysaccharide de haut PM (>106 Da) complexé aux protéoglycans du tissu est capté et partiellement dégradé dans les ganglions (Laurent and Fraser 1992). Des fragments de bas PM sont relargués par la voie lymphatique efférente vers la circulation sanguine afin d'être dégradés, in fine, par le foie (90 %), et dans une moindre mesure par la rate (1 %) et les reins (9 %) (**Figure 11**) (Jackson 2004). L'HA pulmonaire pourrait s'accumuler lors de certaines lésions tissulaires persistantes, par exemple suite à des régulations d'HAS2 et d'Hyal2 (Li et al. 2000).

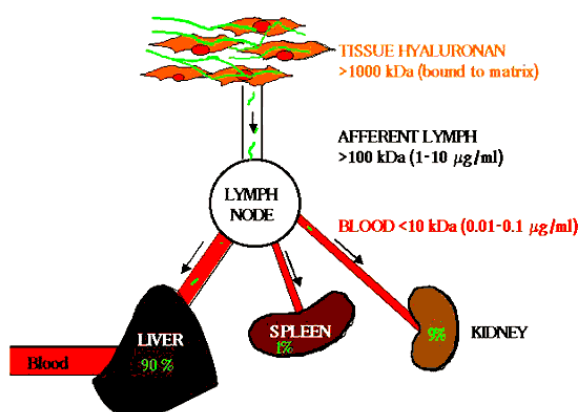


Figure 11. Schématisation de la dégradation de l'HA tissulaire (Jackson 2004).

3.7. Fonctions physiologiques

Les nombreuses fonctions biologiques de l'HA diffèrent selon son PM (**Tableau 4**). Dans les tissus, les structures supramoléculaires d'HA de haut PM s'imbriquent dans le réseau de fibres de collagène. Par leurs propriétés hygroscopiques et rhéologiques, ces structures déterminent la forme et l'organisation architecturale du tissu. Elles confèrent au poumon certaines propriétés mécaniques tout en contribuant au maintien de son intégrité et de son hydratation (Necas et al. 2008). L'HA de haut PM peut ainsi réguler la migration des cellules et la transmission des micronutriments, des hormones et des facteurs de croissance. Il possède également des propriétés de modulation anti-angiogénique, anti-inflammatoire et immunorégulatrice. Certaines de ces propriétés proviennent de son interaction avec des récepteurs, en particulier CD44.

L'HA de faible PM, présent sous forme de courtes chaînes ou d'oligomères, se lie aussi au récepteur CD44 mais induit des réactions différentes, comme l'initiation de programmes d'activation géniques impliqués dans la prolifération, la migration cellulaire et l'inflammation.

Tableau 4. Liste (non exhaustive) des fonctions clés de l'HA selon son PM (Stern et al. 2006).

Size (saccharides)	Function	References
High-molecular-mass HA > 1000–5000	Suppression of angiogenesis	Feinberg and Beebe (1983)
	Immune suppression	McBride and Bard (1979), Delmage et al. (1986)
	Inhibition of phagocytosis	Forrester and Balazs (1980)
	Suppression of HA synthesis	Lueke and Prehm (1999)
HA fragments ~1000	Induction of inflammatory chemokines	Noble et al. (1993)
	Stimulation of PAI-1	Horton et al. (2000)
10–40	Stimulation of urokinase	Horton et al. (2000)
	Induction of CD44 cleavage	Sugahara et al. (2003)
8–32	Promotion of tumor cell migration	Sugahara et al. (2003)
	Stimulation of angiogenesis	West et al. (1985), Sattar et al. (1994), Slevin et al. (1998, 2002)
~15	Stimulation of tumor neovascularization	Rooney et al. (1995)
	Suppression of smooth muscle cell proliferation	Evanko et al. (1999)
12	Endothelial cell differentiation	Takahashi et al. (2005)
	Up-regulation of PTEN in tumor cells	Ghatak et al. (2002)
10	Displacement of matrix HA on oocyte surface	Camaioni et al. (1993)
	Displacement of proteoglycans from cell surface	Solursh et al. (1980)
6	Suppression of HA cable formation	de la Motte et al. (2003)
	Induction of NO and MMPs in chondrocytes	Knudson and Knudson (2004a, b)
4–6	Induction of HAS2 in chondrocytes	Knudson and Knudson (2004a, b)
	Induction of cytokine synthesis in dendritic cells	Termeer et al. (2000, 2002), Taylor et al. (2004)
4	Transcription of MMPs	Fieber et al. (2004)
	Up-regulation of Hsp 72 expression	Xu et al. (2002)
	Suppression of apoptosis	Xu et al. (2002)
	Induction of chemotaxis	R. Savani, personal communication
	Up-regulation of heat shock factor-1	Xu et al. (2002)
	Up-regulation of Fas expression	Fujii et al. (2001)
	Suppression of proteoglycan sulfation	Solursh et al. (1980)

Dans le poumon, l'HA alvéolaire s'agrége pour former des réseaux (**Figure 12**) impliqués dans les propriétés mécaniques du tissu et dans la structure du microenvironnement cellulaire.

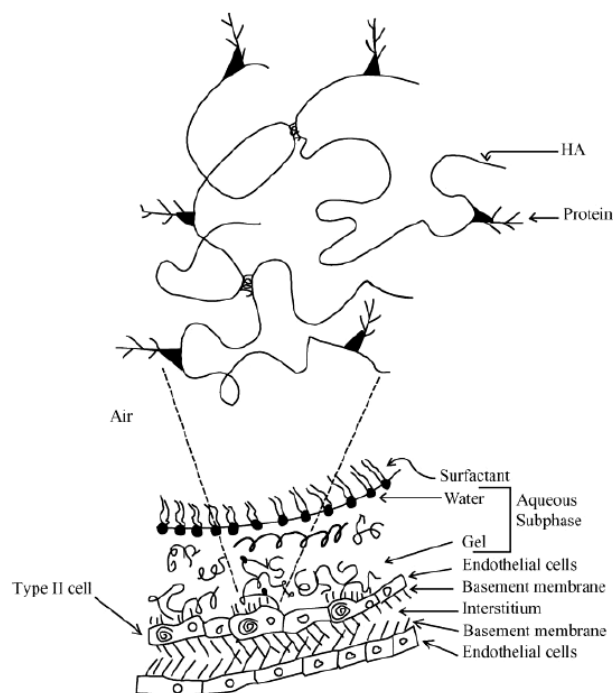


Figure 12. Schéma de la paroi alvéolaire (barrière air-sang). Dans la sous- muqueuse, l'HA alvéolaire, tout en restant attaché aux PII, se lie à des protéines et s'agrège pour former des réseaux concentrés à proximité des cellules. Loin de ces dernières, l'eau prédomine et sépare le réseau d'HA du surfactant (Bray 2001).

3.8. Fonctions physiopathologiques

Les fonctions physiopathologiques de l'HA sont à mettre en **relation avec le PM** de la molécule (**Tableau 4**). En effet, l'HA de haut PM exerce généralement des effets opposés à ceux induits par les fragments d'HA de bas PM. Ainsi, la présence de polymères d'HA est indicative de tissus sains alors que les fragments d'HA sont le reflet de tissus lésés. L'HA serait donc considéré comme un signal de danger endogène (de la Motte 2011).

3.8.1. Association entre l'HA et l'immunité

Le système immunitaire inné, intervenant dans l'initiation des défenses de l'hôte, implique l'action de **TLR** qui sont des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (Kopp and Medzhitov 1999). Les TLR reconnaissent les structures conservées des pathogènes, appelées pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Du fait de sa structure de disaccharide répété, l'HA partage des caractéristiques avec les PAMP ; c'est également un ligand potentiel des TLR (Jiang et al. 2007).

Dans le **modèle de blessure pulmonaire non infectieuse**, l'interaction entre l'HA et les TLR2 et TLR4 peut réguler le processus inflammatoire encouru suite à une agression tissulaire.

Les produits de dégradation solubles de l'HA, générés après l'agression, servent de signal endogène alertant le corps de la localisation de la lésion. L'interaction entre ces fragments et les TLR2 et 4 stimulent la voie signalétique dépendante de MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88). Cette voie implique une activation du NF- κ B (nuclear factor kappa B), qui conduit à la production de médiateurs inflammatoires (IL-1,

TNF- α et IL-12) par les cellules inflammatoires (macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales) et les cellules épithéliales. L'HA natif endogène de haut PM, quant à lui, pourrait assurer l'avenir des cellules épithéliales avec des signaux de protection favorisant la survie et la réparation tissulaire (Jiang et al. 2005) (**Figure 13**). En d'autres termes, l'HA pourrait être considéré comme un signal du système immunitaire indiquant une perturbation de l'intégrité de l'organisme (Termeer et al. 2002).

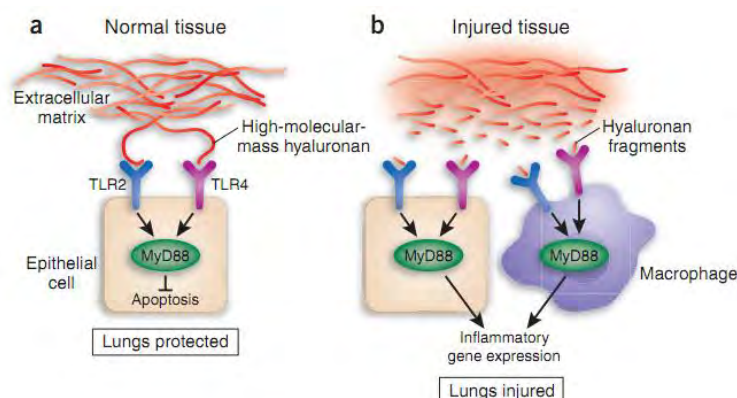


Figure 13. Les récepteurs TLR2 et TLR4 sont des senseurs de l'HA présent dans la MEC du poumon. (a) L'HA de haut PM, présent à l'état basal, lie les TLR2 et TLR4 des cellules épithéliales, maintenant l'intégrité de l'épithélium en prévenant l'apoptose. (b) Après agression, des fragments d'HA de faibles PM sont générés et leurs liaisons aux TLRs de cellules épithéliales et macrophagiques induira une surexpression de gènes de l'inflammation (O'Neill 2005).

3.8.2. Association entre l'HA et l'inflammation

Les **formes d'HA de faible PM** (<500kDa), y compris celles générées par Hyal2, ont été associées à des propriétés pro-inflammatoires, angiogéniques et immunostimulatrices. Hyal2 pourrait donc être un acteur principal de la régulation du processus inflammatoire (Jiang et al. 2007) ; cet élément n'est toutefois pas prouvé. Les fragments intermédiaires d'HA peuvent être dégradés par Hyal1 en des oligosaccharides. Ces derniers stimulent, par exemple, l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaires sur les cellules endothéliales (Taylor et al. 2004) et induisent l'activation des cellules dendritiques par le biais des TLR (Termeer et al. 2002). Aussi, ils permettent le développement de deux caractéristiques de la FP : la prolifération de fibroblastes et la production de collagène (David-Raoudi et al. 2008). Il a été suggéré que les produits de dégradation de l'HA pouvaient également réguler les fonctions macrophagiques durant les réponses inflammatoires et induire, par exemple, la traduction en ARNm, l'expression protéique et l'activité enzymatique de métalloélastases macrophagiques (Horton et al. 1999). Ainsi, Hyal2 pourrait jouer un rôle indirect dans les fonctions macrophagiques. Toutefois, il pourrait aussi jouer un rôle direct étant donné que notre laboratoire a découvert la présence de cette enzyme (ARNm et protéine) dans les macrophages alvéolaires (résultats non publiés).

4. Modèle murin de fibrose pulmonaire post-bléomycine

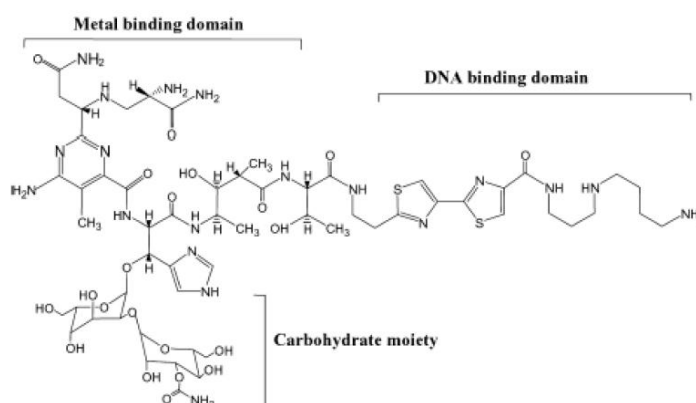
De nombreux modèles animaux ont été établis afin d'examiner la pathobiologie de la FP (**Tableau 5**). Nous avons choisi le modèle de FP induite par la bléomycine et appliqué à la souris, d'une part parce que nous souhaitons étudier des souris KO et d'autre part parce que la FP induite par la bléomycine s'accompagne d'une phase inflammatoire marquée et de dépôts d'HA et qu'elle est dépendante des macrophages.

Tableau 5. Modèles animaux de FP (Chua et al. 2005).

Exogenous Agent/Approach	Nature of Tissue Damage	Animal Species Used
Bleomycin	Oxidant-mediated DNA scission leading to fibrogenic cytokine release	Mice, rats, hamsters, rabbits, dogs, primates, pheasants
Inorganic particles (silica, asbestos)	Type IV hypersensitivity reactions with or without granuloma formation	Mice, rats, hamsters, sheep, rabbits
Irradiation	Free radical-mediated DNA damage	Mice, rats, rabbits, dogs, hamsters, sheep, primates
Gene transfer (TGF- β , IL-1 β , GM-CSF)	Downstream activation of specific cytokine pathway/s	Mice, rats
Fluorescein isothiocyanate	Incompletely understood. Presumed T-cell-independent.	Mice
Vanadium pentoxide	Incompletely understood. An inorganic metal oxide.	Mice, rats
Haptenic antigens (e.g. trinitrobenzene sulphononic acid compounds)	Recall cell-mediated immune response	Mice, hamsters

Le **modèle murin** de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine a été décrit à l'origine par Adamson & Bowden (Adamson and Bowden 1974). L'approche consiste en l'administration d'un médicament, la bléomycine, provoquant une FP dose-dépendante. La **bléomycine** est un antibiotique de type glycopeptide produit par la bactérie *Streptomyces verticillus* et qui s'est avéré posséder des propriétés anticancéreuses (Umezawa et al. 1967; Adamson 1976). Son utilisation dans le modèle est fondée sur le fait que la FP est l'un des effets secondaires majeurs survenant lors de l'administration du médicament dans les thérapies anticancéreuses humaines (Muggia et al. 1983; Moeller et al. 2008). C'est un problème clinique qui limite grandement l'utilisation de ce produit.

Le **mécanisme moléculaire** précis de l'agression pulmonaire post-traitement à la bléomycine n'est pas encore bien connu. On pense que l'administration de ce principe actif conduit à une rupture des brins d'ADN (grâce à son groupement structural de type bithiazole) et à des agressions oxydantes (par ses groupements structuraux pyrimidine et imidazole) (**Figure 14**) (Moeller et al. 2008). Le fait que les poumons soient particulièrement sensibles à la toxicité du principe actif serait le reflet d'une faible teneur en bléomycine hydrolase dans les cellules pavimenteuses, constituant principal du tissu. Une surproduction des dérivés réactifs de l'oxygène, issus des différentes agressions, peut conduire à une réponse inflammatoire à l'origine d'une toxicité pulmonaire, de l'activation de fibroblastes et d'une fibrose (Grande et al. 1998; Moeller et al. 2008).

**Figure 14.** Structure de la bléomycine, composée de trois domaines distincts (Pinart G. 2006).

Les lésions fibrotiques induites par la bléomycine peuvent différer selon **la voie d'administration**: intrapéritonéale, intraveineuse, subcutanée ou intratrachéale. Ceci offre des avantages à l'étude de la pathologie et de son hétérogénéité topographique. L'administration intraveineuse ou intrapéritonéale de la bléomycine induit des lésions subpleurales similaires à ce qui se passe chez l'Homme malade (Chua et al. 2005). Cependant, lors de ce mémoire, nous avons privilégié la voie intratrachéale afin d'obtenir une fibrose accentuée sur les bronches et a fortiori sur les alvéoles. De plus, une seule injection intratrachéale chez les rongeurs produit une blessure pulmonaire résultant en une fibrose, ce qui simplifie le modèle. Quelle que soit la voie d'administration utilisée, le type cellulaire prédominant recruté dans le poumon est le macrophage alvéolaire (Bringardner et al. 2008).

La **réponse fibrotique** encourue dans le modèle murin est dépendante de la souche, de l'âge et du sexe de l'animal. La souche C57Bl/6 est la souche la plus sensible à la fibrose post-bléomycine (Schrier et al. 1983; Harrison and Lazo 1987). La différence intersouche est probablement due à la variation d'expression de cytokines et de protéases/antiprotéases (Moeller et al. 2008). De plus, il semble que les facteurs âge et sexe influencent la sévérité de la pathologie dans ce modèle. En effet, les mâles âgés présentent une inflammation pulmonaire et une fibrose augmentée, indépendamment des autres facteurs. Cela se note par une augmentation de mortalité, de dépôts de collagène et d'alvéolite neutrophilique chez ces souris (Redente et al. 2011). Dans notre étude, nous utiliserons des souris à fond génétique mixte, mâles et femelles, âgées de 11 semaines.

Les **avantages** du modèle murin post-bléomycine sont au nombre de deux. Premièrement, les caractéristiques histologiques humaines majeures de la maladie/toxicité, telles que le bourgeonnement intraalvéolaire, l'incorporation murale de collagène et l'oblitération de l'espace alvéolaire, sont présentes dans le modèle, et ce de manière similaire à celle des patients atteints de FP idiopathique (Adamson and Bowden 1974; Usuki and Fukuda 1995). Deuxièmement, le modèle est facile à mettre en place et reproductible.

Le principal **inconvénient** du modèle est qu'il ne permet pas de saisir la nature progressive et irréversible de la maladie (Chua et al. 2005; Moeller et al. 2008). En effet, il tente de reproduire la séquence des événements menant à la pathologie sur une durée plus courte, habituellement en réponse à une blessure pulmonaire spécifique. Ce modèle se base sur deux hypothèses : la première est que le dommage pulmonaire induit évoluera en une fibrose alvéolaire et interstitielle progressive ; la seconde, que les caractéristiques pathologiques révélées au moment de l'analyse reflètent une phase particulière de la maladie présente chez l'Homme.

L'évolution pathologique induite lors de ce modèle est un **processus multiétapes** (Figure 15). Durant la première semaine, on observe le développement d'une alvéolite neutrophilique et lymphocytaire (Janick-Buckner et al. 1989). Par la suite, les cellules inflammatoires alvéolaires disparaissent, les fibroblastes prolifèrent et la MEC est synthétisée en abondance (Schrier et al. 1983; Moeller et al. 2008). Au jour 9 post-instillation semble se produire la transition entre l'inflammation et la fibrose (Moeller et al. 2008). L'évolution fibrotique peut être observée en biochimie et en histologie dès le 14^{ème} jour avec des réponses maximales généralement aux alentours des jours 21 à 28 (Phan et al. 1983; Schrier et al. 1983; Janick-Buckner et al. 1989; Izicki et al. 2002). Au-delà du 28^{ème} jour, la réponse à la bléomycine est plus variable. Les comptes-rendus suggèrent que le médicament délivré par voie intratrachéale peut induire une fibrose qui progresse ou persiste entre 60 et 90 jours (Starcher et al. 1978; Goldstein et al. 1979; Thrall et al. 1979), bien que d'autres rapports démontrent une réponse

autolimitante avec une résolution spontanée (Moeller et al. 2008).

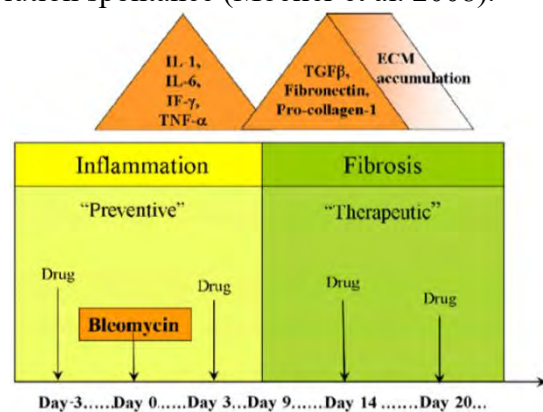


Figure 15. Séquence des événements survenant au cours du modèle murin de FP induite par la bléomycine. Les phases potentielles d'intervention médicamenteuse (préventive ou thérapeutique) sont indiquées respectivement en jaune et en vert (Moeller et al. 2008).

En **résumé**, le modèle animal choisi ne rassemble pas toutes les caractéristiques capitales de la FP humaine ; il se présente seulement comme un instrument de recherche pour la découverte de cellules, médiateurs et voies de signalisation qui peuvent contribuer au développement d'un tissu sain en tissu inflammatoire puis fibrotique. De ce fait, l'approche in vivo semble réductionniste, mais elle reste la seule capable de résumer la complexité génétique et biochimique ainsi que les interactions environnementales qui, combinées, conduisent à la pathologie. En revanche, les systèmes in vitro sont généralement limités à explorer des cellules spécifiques ou des réponses moléculaires isolées.

4.1. L'HA dans le modèle

Après administration de bléomycine par instillation intratrachéale, des formes d'HA de faibles poids moléculaires (<500kDa) sont générées (Jiang et al. 2007). Ces fragments d'HA peuvent être le fruit d'une dégradation enzymatique induite par Hyal2 ou d'une dégradation non enzymatique induite par les ROS (Moeller et al. 2008). Une fois générés, les fragments d'HA peuvent fonctionner tels des signaux de danger endogènes. Ces signaux lient le récepteur de l'internalisation de l'HA, CD44, présent à la surface de certaines cellules telles que les macrophages alvéolaires. L'interaction fragments d'HA-CD44 entraîne une libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1-β, ect.) et une surexpression du récepteur (Yamasaki et al. 2009). Cette surexpression, associée à l'interaction HA-RHAMM, permet un recrutement leucocytaire qui contribue à l'infiltrat inflammatoire tissulaire (Hascall et al. 2004). Parmi, les cellules inflammatoires, les macrophages alvéolaires contribueront à la phase inflammatoire et fibrotique de la FP par la libération de médiateurs (Horton et al. 1999). Ils participeront également au renouvellement de l'HA environnemental au cours de la pathologie. De plus, d'aucun pense que les produits de dégradation de l'HA pourraient aussi réguler les fonctions macrophagiques.

OBJECTIFS DU MÉMOIRE

Ce mémoire est basé sur la disponibilité, au laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, **d'un modèle murin dépourvu de l'expression d'Hyal2** par knockout (KO) du gène codant pour la protéine en question (souris « KO Hyal2 »). Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme de l'HA, un polysaccharide de la matrice extracellulaire.

A ce jour, nous savons que l'HA a une implication dans divers processus physiopathologiques, notamment la réponse inflammatoire et fibrotique induite par une blessure pulmonaire aigüe (Savani et al. 2000). En effet, des concentrations élevées d'HA sont associés à une accumulation de macrophages (notamment grâce à RHAMM) dans le poumon après des lésions (Nettelbladt et al. 1989; Zaman et al. 2005). Les enzymes de synthèse et de dégradation de l'HA semblent être des contributeurs critiques à la réparation et au remodelage tissulaire (Jiang et al. 2007). Parmi ces enzymes, les fonctions d'Hyal2 (dépendantes de CD44) restent, à ce jour, très mal connues (Harada and Takahashi 2007). Nous nous sommes donc chargés d'investiguer la fonction de cette protéine présente dans le tissu pulmonaire et à la surface d'une cellule inflammatoire, le macrophage. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle d'instillation intratrachéale unique de bléomycine qui induit des lésions pulmonaires inflammatoires et fibrosantes fortement dépendantes des macrophages (Moeller et al. 2008), ainsi qu'une accumulation d'HA pulmonaire (Savani et al. 2000). Notre étude comparera la réponse pulmonaire et macrophagique de souris « outbred » (fond génétique mixte) Hyal2^{-/-} et Hyal2^{+/-}.

De manière plus précise, le sujet d'étude de ce mémoire est fondé sur deux objectifs. Le premier, **objectif direct**, est d'étudier les conséquences d'une déficience en Hyal2 dans les macrophages et le poumon lors de lésions inflammatoires et fibrosantes induites par la bléomycine. Le second, **objectif indirect**, est de mieux comprendre le rôle d'Hyal2 dans le métabolisme de l'HA in vivo et dans le processus inflammatoire en général.

Afin de remplir nos deux objectifs, une **procédure opératoire** est mise en place et consiste, à divers moments précis après l'instillation de bléomycine, en l'analyse du tissu pulmonaire (homogénéisé ou découpé en sections) et des cellules macrophagiques (prélevées dans le lavage broncho-alvéolaire et péritonéal). Nous avons choisi essentiellement les jours 7 et 14 post-instillation car ils représentent les moments où le rôle des macrophages est le plus marqué. Le jour 21 sera examiné également, car la fibrose devrait être plus marquée à ce moment-là. Toutefois, le nombre d'animaux disponibles et le temps imparti à ce travail ne permettront pas une analyse aussi exhaustive au jour 21 qu'aux moments précédents. Enfin, dans certaines expériences, les macrophages péritonéaux seront utilisés afin de pallier le faible rendement de la récolte des macrophages alvéolaires, facteur limitant pour divers types d'études.

L'analyse tissulaire consiste en l'observation de la phase inflammatoire puis fibrotique de la FP. La phase inflammatoire est visualisée grâce à une coloration HES du tissu. La phase fibrotique est évaluée et quantifiée par la coloration au rouge de picrosirius des collagènes I/III. L'analyse histomorphologique est poursuivie par la localisation de l'HA grâce à un marquage pseudo-immunohistochimique. Ensuite, l'HA est dosé et ses synthèses (HAS1, 2, 3) et hyaluronidases (HYAL1, 2), quantifiées par PCR quantitative. Enfin, l'activité hyaluronidasique d'Hyal1 est détectée dans le tissu à l'aide d'une zymographie.

L'analyse des cellules macrophagiques consiste en leur numération et une observation morphologique par coloration au Diff-Quick™. Ensuite, l'IL-1 β et l'HA sont dosés dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire ; l'HA est aussi dosé dans le fluide du lavage péritonéal. Sur les macrophages alvéolaires et péritonéaux, les récepteurs membranaires d'HA (CD44 et RHAMM) sont localisés et CD44 est quantifié soit par FACS soit par imagerie. Enfin, afin de mesurer la capacité d'endocytose en phase fluide des macrophages (processus dépendant vraisemblablement d'Hyal2), l'endocytose de l'HRP est quantifiée.

Précisons, pour terminer, que le nombre d'animaux et d'expériences utilisés ne permet pas à ce travail d'être exhaustif mais bien d'identifier les pistes de recherches ultérieures les plus prometteuses.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux expérimentaux

L'élevage et l'expérimentation animale ont été réalisés en accord avec les standards des comités d'éthique nationaux et locaux. Lors de cette étude, des souris non consanguines de 11 semaines ont été réparties dans deux groupes expérimentaux : les souris HZ (Hyal2^(+/-)) et KO (Hyal2^(-/-)) pour le gène Hyal2.

2. Administration de la bléomycine et anesthésie

Les groupes d'animaux traités sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (IsoFlo, Abbott Labs, Illinois) et subissent une instillation intratracheale unique de sulfate de bléomycine (Sanofi-Aventis, France) dissoute dans 0.9 % de sérum physiologique et administrée à raison de 1.00 ou 1.75 mg/kg (Di Paola et al. 2011). Au vu de l'équivalence de tous les résultats obtenus avec les deux doses, ces résultats seront analysés en commun. Au 7^e jour (phase inflammatoire) et au 14^e jour post-traitement [temps d'évaluation optimal de la fibrose pulmonaire (Izbicki et al. 2002)], les animaux sont euthanasiés par inhalation d'isoflurane et dislocation cervicale. Un petit groupe de souris sera aussi examiné au 21^e jour post-traitement.

Le groupe d'animaux contrôles est constitué de souris ayant subi une instillation de 0.9 % de solution physiologique. La double euthanasie de ces souris contrôles est réalisée au 14^e jour post-instillation.

3. Isolement des macrophages péritonéaux

Selon la méthode décrite par Zhang et coll. (Zhang et al. 2008), les cellules sont récoltées par injection intrapéritonéale de 10 mL de milieu de « Roswell Park Memorial Institute 1640 » (RPMI ; Lonza, Belgium). Le fluide récupéré à l'aide d'une seringue est centrifugé (260 g pendant 8 min à 4 °C). Après resuspension du culot cellulaire dans du RPMI contenant 10 % de sérum foetal bovin (FBS ; Lonza, Belgium) inactivé par la chaleur, un comptage cellulaire est réalisé. Ensuite, les cellules sont examinées immédiatement ou mises en culture afin de purifier les macrophages. Le surnageant est récupéré et congelé à -80 °C en prévision d'un dosage ultérieur d'HA.

4. Isolement des macrophages alvéolaires

Chez l'animal sain au repos, les macrophages alvéolaires représentent plus de 90 % des cellules présentes dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire (Reynolds 1987). Afin d'isoler ces macrophages, les poumons sont lavés avec du tampon phosphate salin stérile (PBS ; 3x1 mL). Le fluide du lavage bronchoalvéolaire obtenu est traité exactement comme celui du lavage péritonéal. De plus, un frottis cellulaire est réalisé à l'aide d'un Cytospin (Shandon, Runcor, Royaume-Uni) et coloré au Diff-Quick (Medion Diagnostics GmbH, Düringen, Switzerland) en vue d'une analyse morphologique. Le surnageant est récupéré et congelé à -80 °C pour de futures analyses d'HA et d'IL1-β.

5. Isolement du tissu pulmonaire

Les poumons sont enlevés, pesés et coupés. Un morceau est fixé par immersion dans une solution tampon phosphate contenant du formaldéhyde 10 %, en prévision

d'analyses histopathologiques ultérieures. D'autres fragments sont congelés rapidement dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C dans le but d'une conservation préanalytique.

6. Études histomorphologique et immunohistochimie du poumon

Les échantillons de tissu pulmonaire sont disséqués, fixés pendant 24 h dans du paraformaldéhyde 10 %, et enrobés de paraffine. Ensuite, ils sont coupés en sections de 6 µm et déposés sur lames.

6.1. Coloration à l'hémalum érythrosine safran (HES)

Après déparaffinage et blanchiment, les coupes sont colorées à l'hémalum pendant 7 min, rincées à l'eau courante, plongées dans l'éthanol-HCl durant 1 min, colorées à l'érythrosine pendant 6 min, lavées à l'eau de ville, déshydratées à l'éthanol 70 % puis à l'isopropanol absolu. Enfin, les coupes sont colorées au safran durant 8 min puis plongées dans l'isopropanol absolu et le toluène avant montage sur lame. Les lamelles couvre-objet sont fixées à l'aide d'une solution de phtalate de dibutyle dans du xylène (DPX), et les échantillons sont observés sous un microscope optique.

6.2. Coloration au picrosirius rouge

L'accumulation de différents types de collagènes, tels que le type I, III et VI, a été décrite dans les lésions fibrotiques pulmonaires (Razzaque and Taguchi 2003). Nous avons donc procédé à la coloration des deux premiers collagènes précités grâce à l'adaptation d'une méthode décrite dans la littérature (Junqueira, Bignolas et al. 1979).

Les coupes sont hydratées par passage à travers des séries de bains d'éthanol à concentration décroissante pour terminer dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite lavées dans de l'eau courante, rincées à l'eau distillée, immergées à température ambiante dans 0,2 % d'acide phosphomolybdique en solution aqueuse pendant 2 min, rincées à l'eau distillée, colorées durant 90 min dans une solution saturée d'acide picrique (0,1 % de Rouge Sirius F3BA [Pfaltz and Bauer, Stamford, CT] dans de l'acide picrique aqueux saturé, pH 2), lavées pendant 2 min dans 0.01 N d'acide hydrochlorique, rincées pendant 45 sec dans 70 % d'éthanol, déshydratées, nettoyées et enfin montées sur lame. Les lamelles couvre-objet sont fixées à l'aide d'une solution de phtalate de dibutyle dans du xylène (DPX) et les échantillons sont observés sous un microscope optique.

Afin de quantifier les réseaux de collagènes dans le parenchyme pulmonaire, le niveau de coloration au rouge de picrosirius a été évalué avec le logiciel libre ImageJ sur les images enregistrées et exprimées en tant que pourcentage de l'aire totale des images analysées.

6.3. Immunohistochimie

Après déparaffinage et blanchiment, les sections du poumon sont traitées durant 15 min à l'H₂O₂ 3 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) qui masquera toute activité peroxydasique endogène. Après rinçage à l'eau distillée et au PBS (0.008 M Na₂HPO₄, 0.0015 M KH₂PO₄, 0.136 M NaCl, 0.00265 M KCl), les échantillons sont bloqués et perméabilisés durant 2 min avec du Triton X-100 0.05 % (Merk, Allemagne) dilué dans du PBS/BSA 1 % (PAA Laboratories). Les coupes sont ensuite incubées durant une nuit avec une protéine biotinylée liant l'HA (1:50 ; HABP ; gracieusement donnée par le Professeur M. Tammi, Université de Kuopio, Finlande). Après rinçages au PBS, les coupes sont exposées durant 30 min à un complexe avidine-biotine (1:100 ; ABC ; Vector Laboratories, Burlingame, USA) qui lie la biotine de l'HABP. Après lavages, les coupes sont exposées à des molécules de tyramine biotinylées (1:50 ; TSA, Perkin Elmer, Boston, USA). Après rinçage, les coupes sont exposées durant 30 min au complexe ABC (1:100). L'activité peroxydasique est détectée par la

précipitation du composé 3,3'-diaminobenzidine (DAB-0.02% ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dilué dans du PBS contenant 0.02 % d' H_2O_2 (**Figure 16**). Finalement, la réaction est arrêtée par rinçages à l'eau de ville et les sections sont contrecolorées à l'hémalum afin de permettre l'identification des structures histologiques. Les lamelles couvre-objet sont fixées à l'aide d'une solution de phtalate de dibutyle dans du xylène (DPX) et les lames sont observées sous un microscope optique.

Les coupes contrôles (les « négatifs ») sont réalisées de la même manière à l'exclusion de la phase d'incubation au HABP.

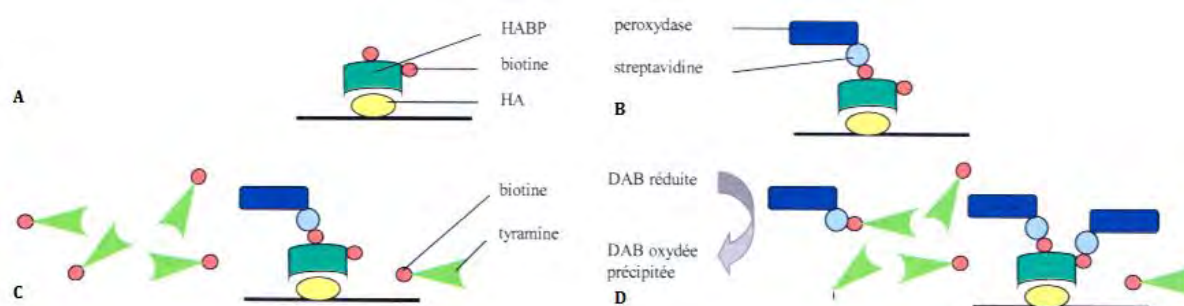


Figure 16. Schématisation de l'amplification du signal par la méthode TSA (Colombo 2010). (A) L'HABP biotinylée lie l'HA présent dans l'échantillon. (B) Le complexe streptavidine-peroxydase se fixe sur la biotine de l'HABP. (C) La streptavidine-peroxydase catalyse le dépôt des molécules de tyramine biotinylées à proximité de l'HA. (D) Le complexe streptavidine-peroxydase ajouté en dernier lieu lie les molécules de biotine libres et catalyse l'oxydation du colorant, ce qui conduit à la formation d'un précipité.

7. Dosage de l'IL1- β dans le tissu pulmonaire et le lavage bronchoalvéolaire

Les concentrations d'IL-1 β sont dosées dans le poumon et dans le surnageant du fluide du lavage bronchoalvéolaire grâce au kit Ready-Set-Go (eBioscience, San Diego, CA) qui utilise la technique immunoenzymatique ELISA. Brièvement, des plaques 96 puits sont revêtues d'un anticorps de capture liant fortement l'IL-1 β . Ensuite, la solution est déposée et un anticorps de détection marqué à la biotine est utilisé afin de lier à son tour l'IL1- β ; le nombre de complexes de détection anticorps-IL1 β est mesuré grâce à la liaison du complexe streptavidine-HRP à l'anticorps de détection. La réaction chimiluminescente induite par la TMB (tétraméthylbenzidine) est proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. La réaction est stoppée par l' H_2SO_4 2N et l'absorbance est lue à 450 nm (**Figure 17**). Le contenu de l'échantillon en IL1- β est calculé à l'aide d'une analyse par régression linéaire de la courbe standard.

La concentration protéique est déterminée à l'aide de la méthode de Bradford (Biorad, Hercules, CA) utilisant du BSA comme standard (Bradford 1976; Kruger 1994).

8. Dosage de l'HA dans le tissu pulmonaire et le lavage bronchoalvéolaire

L'HA est extrait des poumons comme décrit précédemment (Nettelbladt et al. 1989). Brièvement, les poumons murins perfusés sont coupés en morceaux et l'un d'entre eux est digéré par 5 U de pronase E (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dans 100 mM d'acide formique, tampon à pH 7-8, durant la nuit à 55 °C. Cette digestion enzymatique libère l'HA de ses

multiples liaisons protéiques. Ensuite, la protéase est inactivée en ébouillantant l'échantillon durant 15 min. Les échantillons subissent alors une lyophilisation et sont gardés à -20°C avant le dosage de l'HA. Le niveau d'HA est aussi dosé dans le surnageant du fluide du lavage bronchoalvéolaire sans aucun prétraitement.

Les concentrations d'HA sont dosées par la technique immunoenzymatique de type pseudo-ELISA en utilisant le kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, USA). Brièvement, des plaques 96 puits sont revêtus d'aggrecan (protéine HABP de capture) liant fortement l'HA. Ensuite, un aggrecan biotinylé (HABP de détection) est utilisé afin de lier à son tour l'HA ; le nombre de complexes aggrecan-HA est mesuré grâce à la liaison du complexe streptavidine-HRP à l'aggrecan biotinylé. Cent μL de TMB sont alors ajoutés et une incubation est réalisée jusqu'au développement d'une couleur bleue brillante. La réaction chimiluminescente induite par la TMB est proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. La réaction est stoppée par l' H_2SO_4 2N et l'absorbance est lue à 450 nm (**Figure 17**). Les résultats sont comparés à une courbe standard de concentration connue d'HA. Le contenu de l'échantillon en HA est calculé à l'aide d'une analyse par régression linéaire de la courbe standard.

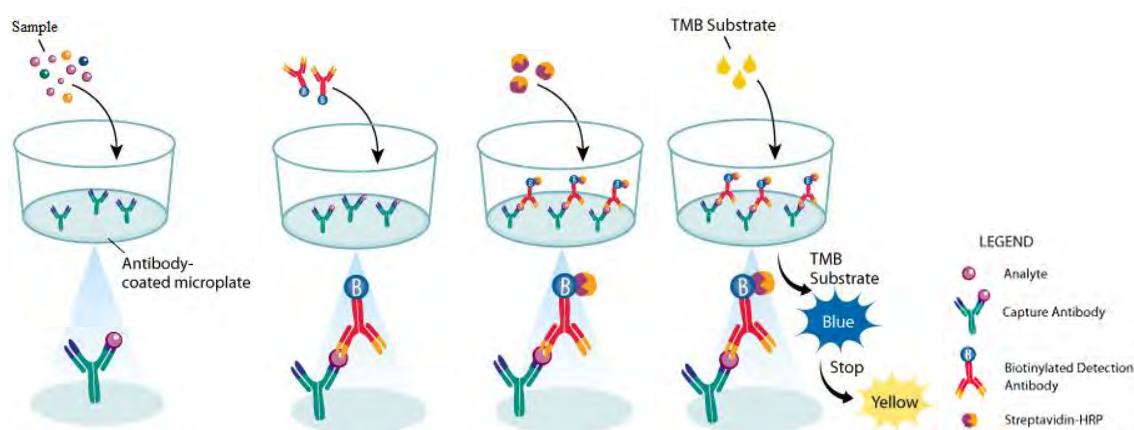


Figure 17. Schématisation de la technique pseudo-immunoenzymatique permettant le dosage de l'HA. (A) Liaison de l'échantillon à un HABP de capture (l'aggrecan) recouvrant la plaque. (B) Liaison d'un HABP biotinylé (HABP de détection) au complexe ainsi formé. (C) Le complexe streptavidine-HRP lie l'HABP de détection. (D) La TMB induit une réaction chimiluminescente proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon (Systems 2011).

9. PCR quantitative en temps réel

Cette technique consiste à suivre en temps réel l'amplification d'une séquence d'ADN. À chaque cycle d'amplification, la quantité d'amplicon est mesurée grâce à l'ajout d'un agent intercalant qui vient s'insérer entre les brins d'ADN et émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN présent dans l'échantillon (**Figure 18**).

Extraction de l'ARN total

Moins de 30 mg de tissu pulmonaire est homogénéisé dans un appareil de type rotor/stator. L'ARN total est extrait du tissu suivant le protocole du miniKit RNeasy (Qiagen, Stanford, CA, USA). La concentration de l'échantillon en ARN total est déterminée par mesure de sa densité optique au spectrophotomètre à 260 nm, sachant qu'à cette longueur d'onde, une unité de densité optique correspond à 40 μg d'ARN/ml.

Transcription inverse (RT)

La synthèse de l'ADN complémentaire à partir des ARN monocaténares est réalisée par transcription inverse utilisant des amorces nucléotidiques (hexamères aléatoires) et une transcriptase inverse MMLV (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase ; Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Pour chaque échantillon, un test sansrétrotranscriptase est réalisé comme contrôle négatif afin de vérifier l'éventuelle contamination par l'ADN génomique.

Amplification par PCR

Afin de quantifier les HAS et les HYAL, une PCR est réalisée dans un volume de 20 µl contenant 50 ng d'ARN rétrotranscrit dans 15 µl de solution Master mix Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) avec les primers spécifiques de l'HAS1 (5'-GCCCTCCTCCTTCTTTCGT-3'), HAS2 (5'-CATGGGTAACCAATGCAGTTTT-3'), HAS3(5'-CTATGAATCAGTGGTCACAGGTTT-3'), Hyal1(5'-CAGCATGCTCAGAAAGTTTGG-3'), Hyal2(5'-CGAGGACTCACGGGACTGA-3') et p26 (5'-GGTGTGGAGAGCACTATGGT-3'). L'ARN est amplifié par le dispositif Applied Biosystems 7300. Les profils d'amplification sont obtenus après incubation de l'échantillon durant 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C, 40 cycles de 15 sec à 95 °C (dénaturation) et 1 min à 60 °C (hybridation/extension). La quantification relative de l'expression génique des HA synthases et hyaluronidases est réalisée à l'aide d'une méthode comparative des Ct¹ (Livak and Schmittgen 2001).

La méthode comparative des Ct consiste à comparer les valeurs de Ct de chaque échantillon cible avec un calibrateur, correspondant à un échantillon de tissu considéré comme référence. Les valeurs de Ct sont normalisées sur base des données obtenues pour le contrôle endogène (« housekeeping gene », ici p26). La valeur de ΔCt de chaque échantillon est ensuite normalisée en soustrayant celle de la référence (calibrateur), obtenant ainsi une valeur $\Delta\Delta Ct$. Cette dernière sera transformée en valeur absolue grâce au calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

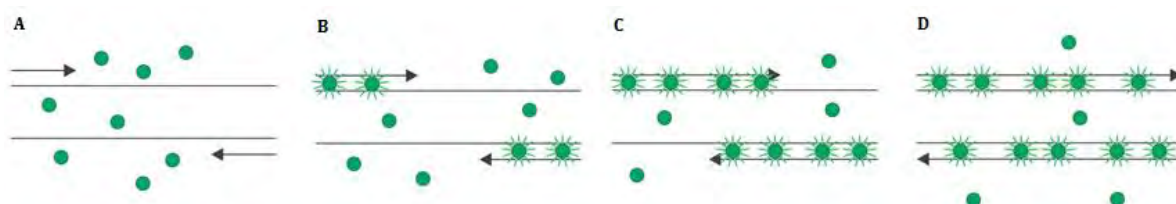


Figure 18. Schématisation de la méthode de marquage du produit de RT-PCR par Sybr Green. (A) Hybridation de la sonde à l'ADNc. (B) Insertion du marqueur fluorescent entre la sonde et l'ADNc ou l'amplicon. (C) Augmentation proportionnelle de la fluorescence en fonction de l'amplification de l'ADNc. (D) Fin du cycle PCR (van der Velden et al. 2003).

10. Détection de l'activité hyaluronidasique pulmonaire par zymographie

La zymographie permet de détecter une activité enzymatique au sein d'un gel d'électrophorèse de polyacrylamide (SDS-PAGE) imprégné en HA, après séparation des protéines sur ce gel en fonction de leur PM. Des échantillons tissulaires sont homogénéisés dans du sucrose (0.25 mM) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche). Pour chacun, la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford 1976) au

¹ Seuil à partir duquel l'amplification du signal fluorescent émis est considérée comme statistiquement significatif.

moyen d'un kit BIO-RAD (Biorad protein assay ; Biorad, Hercules, CA). Ce kit permet de doser, par colorimétrie à 595 nm, les protéines d'extraits tissulaires.

Séparation des protéines par SDS-PAGE

Le principe de cette méthode est la migration de cellules sur un gel de 10 % SDS-PAGE contenant du HA. La migration se fait en deux temps : sur un gel de séparation et sur un gel d'empilement. Le gel de séparation [acrylamide-bisacrylamide 10% (Biorad)] contient de l'HA de la crête de coq (Sigma, St Louis, MO, USA) à raison de 1.7 mg/mL ainsi que Tris-HCl 250 mM, pH 8.8, SDS 0.1 %, persulfate d'ammonium (APS) à 0.1 %, et Temed 0.001 %. Il est coulé dans un appareil Mini-Protean vertical (Biorad). Le gel d'empilement (acrylamide-bisacrylamide 4 %, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 0.1 %, APS 0.1 %, et Temed 0.001 %) est préparé et coulé par-dessus le gel de séparation. Après polymérisation, 75 µg de l'homogénat tissulaire associé à un tampon de chargement (TDC) (= SDS 8 %, Tris-HCl 500 mM pH 6.8, glycérol 40 %, bleu de bromophénol 0.02 %) est déposé sur gel. Le gel est aussi chargé de 10 µl d'un marqueur de poids moléculaire « Prosieve » (Prosieve Color Protein Marker ; Lonza). La migration des échantillons s'opère en présence d'un tampon (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1 %) dans une enceinte refroidie par de la glace durant deux heures à voltage constant (80V).

Révélation de l'activité hyaluronidasique

Les gels sont incubés pendant 2 h dans 3 % de Triton-X100 afin d'éliminer le SDS résiduel. Ils sont lavés durant une nuit à 39 °C dans 0.1 M de formate 0.1 M, pH 3.7, contenant 0.1 M de NaCl. Les gels sont ensuite rincés abondamment à l'eau désionisée jusqu'à obtention d'un pH approchant la neutralité, puis traités pendant 2 h à 39 °C avec 0.1 mg/ml de Pronase dans 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0, et colorés pendant au moins 24 h avec 0.015 % de Stains-All (3,3'-diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiocarbocyanine ; Sigma) dans 50 % de formamide. Le Stains-All est un colorant photosensible liant l'HA en développant une coloration bleue. Après décoloration à l'eau, la capture d'images est réalisée à l'aide d'un appareil digital sur un transilluminateur.

11. Localisation des antigènes (CD44, RHAMM) par immunofluorescence et microscopie confocale

Les macrophages péritonéaux et alvéolaires sont purifiés par adhérence sur des lamelles couvre-objets (1×10^5 cellules/condition) et ce, dans chaque puits d'une boîte de culture à 6 puits (Greiner, France). Les cultures sont incubées pendant 2 h à 37 °C dans une chambre humide contenant 5 % de CO₂. Les cellules non adhérentes sont extraites par aspiration du surnageant et par lavage des monocouches avec du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de FBS inactivé par la chaleur. Les cellules restantes sont mises en culture avec du RPMI 1640 contenant de la streptomycine (100 mg/mL) et de la pénicilline (100 U/mL) (Gibco BRL #15070-22). Après 48 h, les cellules sont rincées au PBS et fixées avec 4 % de paraformaldéhyde (Merk, Allemagne) pendant 10 min. Après rinçages, la perméabilisation cellulaire est réalisée par la mise en présence de 0.5 % de Triton X-100 durant 5 min (Merk, Allemagne). Après lavages, les sites de liaisons nonspécifique sont bloqués par incubation des cellules pendant 30 min dans du PBS contenant 3 % d'albumine de BSA. Par la suite, les cellules sont incubées durant une nuit dans une chambre humide à 4 °C avec des anticorps primaires: Ac polyclonal de rat anti-CD44 (1:300 ; Pharmingen) ou Ac de chèvre anti-RHAMM (1:100 ; SantaCruz) dans du PBS/1% BSA. Après lavages, les cellules sont incubées pendant 45 min dans l'obscurité avec des Ac secondaires (Ig G de lapin anti-rat couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 [1:2000 ; Invitrogen] ou IgG de singe anti-chèvre couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 [1:1000 ; Invitrogen]) dans du PBS/1% BSA. Les

cellules sont lavées à nouveau dans du PBS et incubées avec du TOPRO-3 (1:80 ; Molecular Probes) dilué dans du PBS/RNase à 2 mg/mL. Enfin, les cellules sont montées sur une lame porte-objet (Superfrost, Vel, Allemagne) grâce au Mowiol (Sigma Aldrich, Angleterre).

Les expériences contrôles sont réalisées de la même manière excepté le fait que les Ac primaires sont exclus. L'observation des cellules par microscopie confocale est réalisée en utilisant un microscope de marque Leica.

12. Détection des antigènes cellulaires de surface (CD44, F4/80) par cytométrie en flux

La cytométrie en flux (ou FACS, fluorescent activated cell sorting) est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules (cellules, ect.) en suspension dans un liquide. Chaque particule, après marquage spécifique avec un fluorochrome, est entraînée dans un flux laminaire vers un détecteur optique. Les propriétés optiques obtenus permettent de trier des populations hétérogène de cellules selon leur taille, leur granulométrie et l'émission de fluorescence.

Les macrophages péritonéaux (2×10^5 cellules/condition) sont centrifugés (143 g, 5 min, température ambiante). Le culot cellulaire est incubé pendant 30 min dans du PBS* (= 5 mL de PBS 1 % contenant du FBS inactivé par la chaleur et 0,1 % de NaN_3) dans 1 % de BSA et centrifugé. Le surnageant est écarté et le marquage est réalisé sur le culot cellulaire en utilisant des Ac primaires dirigés contre CD44 (1:200 ; Pharmingen) ou F4/80 (1:100 ; Serotec), tout deux dilués dans du PBS*/1% BSA. Après incubation pendant 1 h à 4 °C, les cellules sont centrifugées (dans les mêmes conditions). Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est lavé avant d'être incubé pendant 1h dans l'obscurité avec un Ac secondaire [IgG de lapin anti-rat couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (1:1000 ; Invitrogen) dans du PBS*/1 % BSA. Les cellules sont centrifugées et le surnageant est enlevé par aspiration. Après lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS*/1% BSA et analysées.

La quantification de CD44 et F4/80 présent sur les macrophages péritonéaux est réalisée à l'aide de la cytométrie en flux (FACS ; Calibur [Becton Dickinson, Heidelberg, Germany]). L'acquisition et l'analyse des données sont obtenues à l'aide du programme CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

13. Endocytose de l'HRP (peroxydase du raifort) et sa quantification

Afin d'évaluer les effets de la bléomycine sur la fonction endocytique des macrophages, les macrophages péritonéaux sont purifiés par adhérence au plastique d'une boîte de culture et incubés 2 h à 37 °C dans une chambre humide contenant 5 % CO_2 . Les cellules non adhérentes sont enlevées par aspiration du surnageant et par lavage des monocouches avec du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de FBS inactivé par la chaleur. La capacité des macrophages péritonéaux à internaliser l'HRP est déterminée par leur incubation à 37 °C pendant 2 h avec de l'HRP (1 mg/ml) dissous dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco contenant 10 % de BSA et ce, en accord avec la méthode de Noble et coll. (Noble et al. 1994). L'internalisation est stoppée en transférant les cellules à 4 °C et en les rinçant immédiatement avec du DMEM frais contenant 0.5 % de BSA. Après des lavages permettant de minimiser la liaison non cellulaire de l'HRP, les cellules sont lysées dans du tampon (50 mM de Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA, 1 % de Triton X-100, 0.1 % de deoxycholate de sodium et 1 mM de fluorure phénylméthylsulphonyle [PMSF]).

L'endocytose de l'HRP est évaluée par une méthode utilisant la TMB. Une courbe standard est préparée dans une gamme de concentration de 0-0.5 ng/mL d'HRP dissous dans 0.05 % de Triton X-100. Brièvement, 10 μ L de chaque concentration standard d'HRP ou d'un même volume d'échantillon dilué sont déposés sur chaque puits d'une plaque 96 puits. Cent μ L de TMB sont alors ajoutés et une incubation est réalisée jusqu'au développement d'une couleur bleue brillante. La réaction est arrêtée avec 100 μ L d'acide sulfurique 2 N et l'absorbance est lue à 450 nm. Le contenu de l'échantillon en HRP est calculé à l'aide d'une analyse par régression linéaire de la courbe standard et exprimé en μ g de peroxydase/mg de protéines.

La concentration protéique est déterminée à l'aide de la méthode de Bradford (Biorad, Hercules, CA) utilisant du BSA comme standard (Bradford 1976; Kruger 1994).

14. Analyses statistiques

Les comparaisons statistiques entre les différents groupes d'études ont été réalisées à l'aide de tests de variance. Les facteurs de classifications « temps » et « génotype » ont été analysés par l'ANOVA 2. Dans le cas d'une non-interaction entre ces facteurs, l'ANOVA 1 fut employée, suivi d'un test de Dunnett afin d'identifier les différences significatives par comparaison aux valeurs contrôles. Un test t sera aussi réalisé afin de compléter les résultats. $P < 0.05$ est considéré comme significatif. Les comparaisons statistiques et les représentations graphiques sont réalisées à l'aide du programme informatique GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RÉSULTATS

1. Introduction et observations générales

Afin d'étudier les implications potentielles d'Hyal2 dans la genèse d'une FP, nous avons réalisé une étude de suivi de 60 souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) réparties aléatoirement en groupe contrôle (CTL) et groupe traité. Les individus CTL ont subi une instillation intratrachéale de liquide physiologique alors que les individus traités se sont vus attribuer de la bléomycine, inducteur de FP. Le groupe CTL a été euthanasié au 14^e jour post-instillation alors que les groupes traités ont fait l'objet de l'étude au 7^e, 14^e et, pour quelques-uns seulement, au 21^e jour post-administration. Les résultats présentés résultent de 3 séries d'instillation d'une vingtaine de souris chaque fois, à des moments différents de l'année.

Les différents groupes d'étude sont composés d'un nombre variable d'animaux (mâles/femelles). Leurs poids corporel et pulmonaire sont indiqués dans le **Tableau 6**. Entre la phase d'instillation et la phase d'euthanasie, les souris ont montré une prise de poids constante (données non montrées) et n'ont présenté aucune preuve significative de stress telle qu'un toilettage excessif ou de la stéréotypie. Aucune n'est décédée en cours d'étude.

Après **analyses statistiques**, nous remarquons que le poids du poumon humide des individus traités à la bléomycine est plus élevé ($p < 0.01$) au 7^e jour (0.42 g, aussi bien pour les HZ que KO) qu'au poids des animaux CTL (0.32 et 0.37 g, respectivement). Le poids du poumon semble diminuer de nouveau au J14 chez les souris HZ mais pas les KO. Nous en concluons que la phase inflammatoire (cf. plus loin), après une semaine, s'accompagne d'un œdème du tissu pulmonaire, qui pourrait régresser plus vite chez les individus HZ que chez les KO.

Tableau 6. Sexe, poids corporel et poids du poumon humide des animaux Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) contrôles ou traités (7^e, 14^e et 21^e jour post-bléomycine). Signification statistique: $p < 0.01$ pour le facteur temps entre groupe CTL et groupe J7 (ANOVA2).

	Groupe CTL		Groupes traités					
			Jour 7		Jour 14		Jour 21	
	Hyal2 (+/-)	Hyal2 (-/-)	Hyal2 (+/-)	Hyal2 (-/-)	Hyal2 (+/-)	Hyal2 (-/-)	Hyal2 (+/-)	Hyal2 (-/-)
Sexe (M/F)	4/5	4/3	6/4	5/4	6/4	5/4	1/2	2/1
Poids corporel (g)	27,22 ± 1,460	26,14 ± 0,8571	28,23 ± 1,592	25,40 ± 1,365	27,11 ± 0,6817	25,70 ± 0,9387	27,00 ± 5,508	28,67 ± 3,844
Poids du poumon humide (g)	0,3244 ± 0,01463	0,3664 ± 0,03193	0,4245 ± 0,02642	0,4193 ± 0,02939	0,3684 ± 0,01733	0,4201 ± 0,02772	/	/

2. Analyse du tissu pulmonaire

2.1. Histologie du poumon murin au cours de la genèse d'une fibrose induite par bléomycine

Les phases inflammatoire et fibrotique, survenant lors de la **genèse de la fibrose pulmonaire**, ont été examinées par histologie chez des souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) CTL et traitées à la bléomycine au 7^e, 14^e (**Figure 19**) et 21^e jour (**Figure 20**) post-instillation. Des sections du poumon périphérique (zone anatomique au confluent des zones de conductions d'air et d'échanges gazeux) ont été enrobées de paraffine et colorées à l'hémalun-érythrosine-safran.

Les **groupes CTL** présentent une histologie pulmonaire classique, se caractérisant par des murs alvéolaires (interstitium) peu épais, et qui semble similaire chez l'animal Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-). Les **groupes euthanasiés au 7^e jour post-traitement** présentent une distribution bronchiolocentrique et angiocentrique (dans le septa interlobulaire et au niveau de la plèvre) d'infiltrats inflammatoires. Avec la technique utilisée, les cellules inflammatoires ne peuvent pas toutes être repérées avec précision ; selon la littérature il s'agit principalement de macrophages alvéolaires, fibroblastes et lymphocytes. Ils sont également localisés, dans une plus faible mesure, autour des sacs alvéolaires et au niveau subpleural. Cette distribution implique une atteinte préférentielle des voies respiratoires incluant les bronches, les bronchioles et les acini pulmonaires. On peut aussi observer un épaissement général de l'interstitium dans certaines zones du parenchyme pulmonaire.

Les **groupes euthanasiés au 14^e jour post-traitement** présentent une distribution inflammatoire identique au groupe précédent. Aussi, d'après les critères de Hübner et ses collaborateurs, la fibrose observée est de grade 3 (Hubner et al. 2008). Elle se caractérise par des interstitium contigus fibrotiques ($>3 \times$ l'épaisseur d'un interstitium normal), des alvéoles raréfiées mais aucune masse fibrotique distincte (**Figure 19**). Avec cette fibrose, il semble y avoir des dépôts croissants de collagène dans les septums interalvéolaires.

Les **groupes euthanasiés au 21^e jour post-traitement** présentent, d'après les critères de Hübner et ses collaborateurs, une fibrose de grade 5 caractérisée par des masses fibrotiques ($>10\%$ et $<50\%$ du champ d'analyse) et une structure pulmonaire sévèrement endommagée mais toujours préservée. Les septums interalvéolaires incluent des zones de fibrose et de lésions cicatricielles (abondance de safran). Une atteinte pleurale est observable et est associée à une hyperplasie mésothéliale et à la présence de mastocytes. Ceci est conforme aux résultats de Tominori (Tomimori et al. 2003). L'infiltrat inflammatoire semble atténué par rapport au J7.

Une **comparaison entre les groupes Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) traités** est difficile à réaliser au vu de la variabilité inter-individuelle et de l'hétérogénéité de l'atteinte tissulaire. Cette hétérogénéité est visible sur une coupe histologique d'un poumon d'individu traité. Elle révèle, à fort grossissement, une transition entre une fibrose grossière et un poumon normal (**Figure 21**). Il est à noter que ce type d'histologie hétérogène est présent lors d'une pneumonie interstitielle (King 2009). Toutefois, ce facteur pris en compte, il semble n'y avoir aucune différence histologique significative entre les pourmons des individus ^(+/-) et ^(-/-) traités, quel que soit le moment où ils sont observés (J7, J14 ou J21). Enfin, il est à noter que toutes les sections analysées présentent des zones de destruction de cloisons interalvéolaires artéfactuelles, qui ne s'accompagnent pas de cicatrice fibreuse.

Dans l'étape suivante, nous avons décidé de quantifier la fibrose.

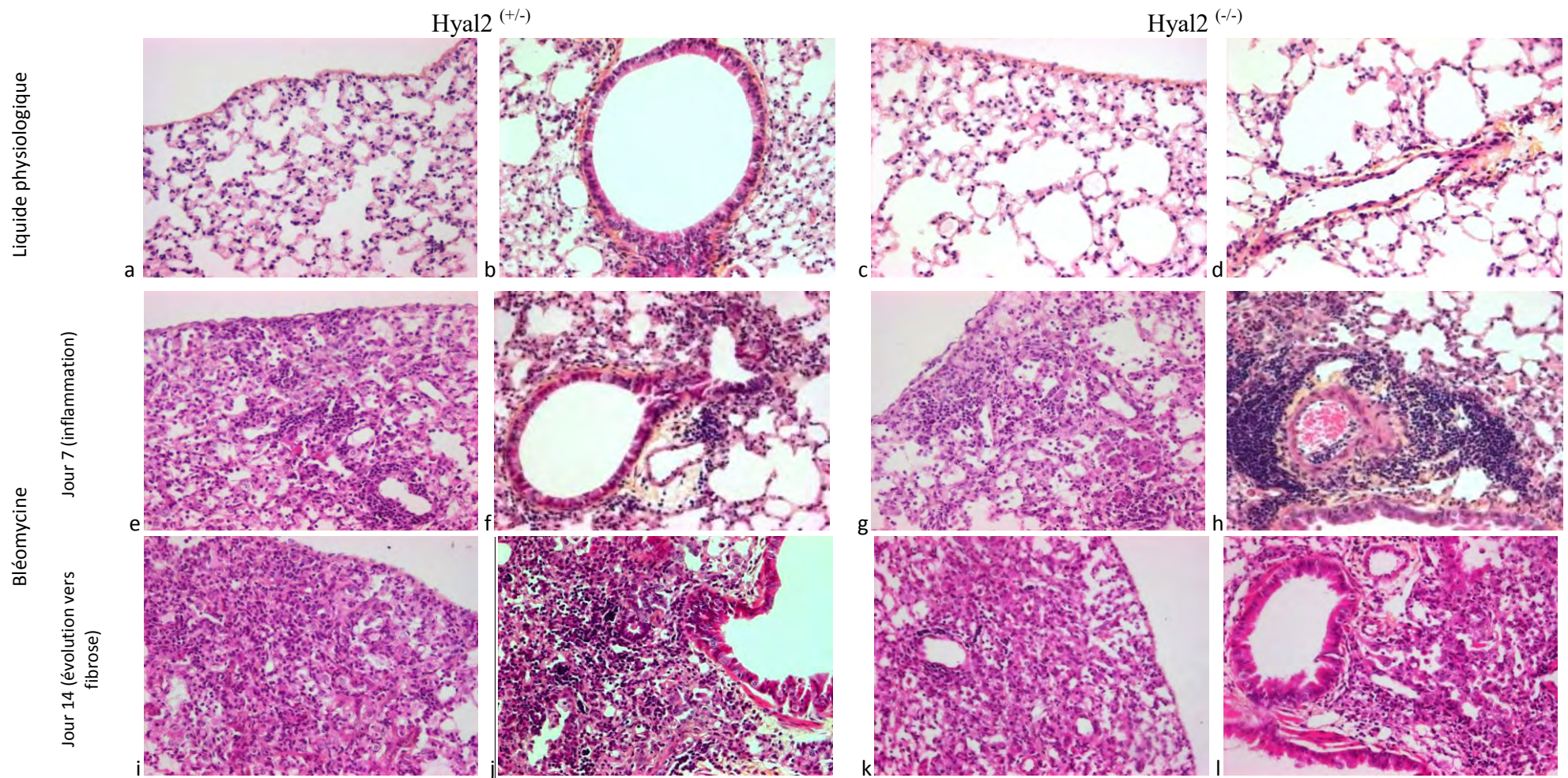


Figure 19. Histologie pulmonaire au cours de la genèse de la fibrose chez des souris *Hyal2*^(+/-) et *Hyal2*^(-/-) contrôles et traitées à la bléomycine. Le parenchyme alvéolaire des groupes contrôles [*Hyal2*^(+/-) (a,b) et *Hyal2*^(-/-) (c,d)] présente une architecture non pathologique. Au 7^e jour post-bléomycine, les souris *Hyal2*^(+/-) (e,f) et *Hyal2*^(-/-) (g,h) présentent des dépôts de collagène et un interstitium épaissi, accompagnés d'infiltrats inflammatoires localisés majoritairement autour des bronchioles et des vaisseaux. Au 14^e jour post-traitement, on observe, chez les souris *Hyal2*^(+/-) (i,j) et *Hyal2*^(-/-) (k,l), des infiltrats inflammatoires. Coupes en paraffines colorées à l'hémalun-erythrosine-safran (HES). Agrandissement 200x.

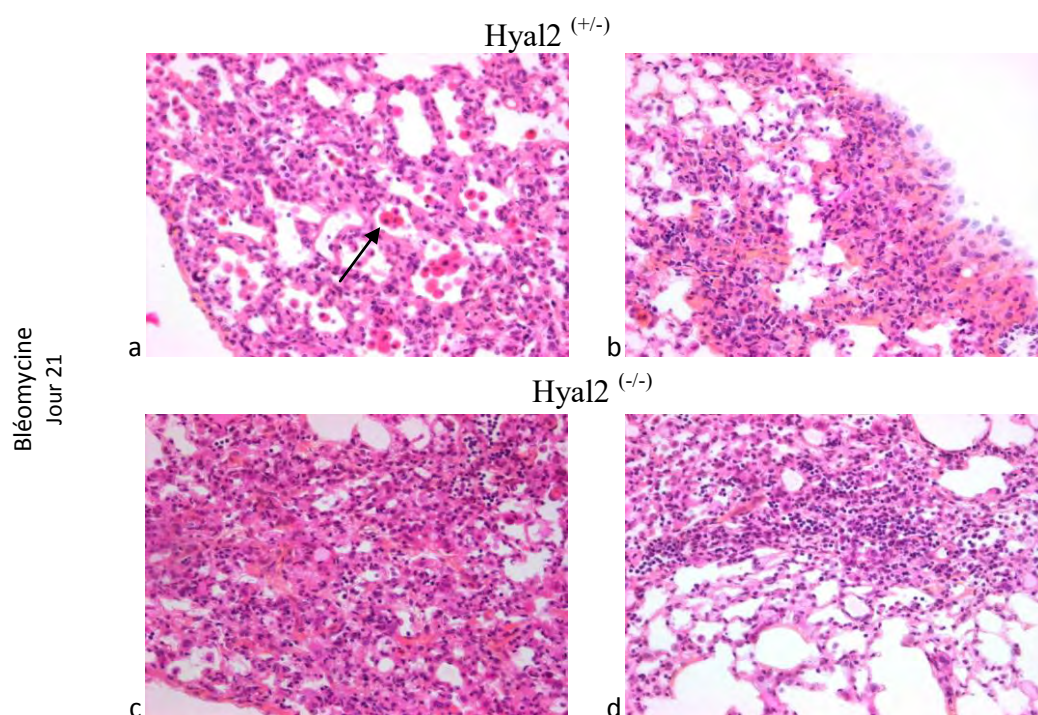


Figure 20. Histologie pulmonaire au jour 21 post-bléomycine chez des souris $Hyal2^{+/-}$ et $Hyal2^{-/-}$. Le parenchyme alvéolaire [$Hyal2^{+/-}$ (a,b) et $Hyal2^{-/-}$ (c,d)] présente une architecture pathologique. Les septums interalvéolaires incluent des zones de fibrose et de lésions cicatricielles (abondance de safran). Une atteinte pleurale est observable et est associée à une hyperplasie mésothéliale et à la présence de mastocytes (flèche). L'infiltrat inflammatoire semble atténué par rapport aux stades précédents. Coupes en paraffines colorées à l'hémalun-erythrosine-safran (HES). Agrandissement 200x.

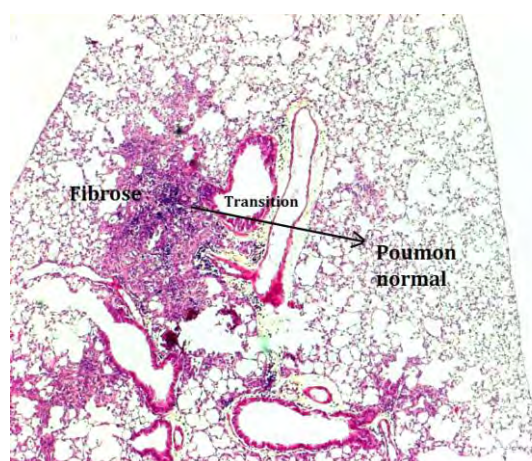


Figure 21. Histologie pulmonaire type d'une souris traitée à la bléomycine. Présence d'une hétérogénéité inflammatoire et lésionnelle ainsi que d'une transition entre la fibrose et le poumon normal. Agrandissement 40x.

2.2. Quantification du processus fibrotique pulmonaire

La **phase fibrotique** de la FP résulte du remplacement des tissus conjonctifs parenchymateux par un conjonctif riche en collagène I et V. La déposition en collagène I a donc été mise en évidence par analyse histologique chez des souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) CTL et traitées à la bléomycine. Des sections du poumon périphérique ont été enrobées de paraffine et colorées au rouge de picrosirius, permettant ainsi la localisation du collagène I et III.

Tous les groupes présentent des dépôts de collagène I/III autour des bronchioles et des vaisseaux sanguins et lymphatiques, aux abords des sacs alvéolaires (en quantité plus faible) et, enfin, au niveau du conjonctif sous-mésothélial. Ces dépôts sont plus importants dans l'histologie pulmonaire des groupes traités. Cependant, des lésions fibrotiques en foyer (caractéristique principale de la FP) ne sont pas visibles au 14^e jour post-traitement, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre. Ces lésions devraient être caractérisées par la formation de nodules de collagène dus à l'invasion de fibrine intraalvéolaire générée par les fibroblastes (Adamson and Bowden 1974).

La proportion de collagène I/III a été estimée par histométrie (**Figure 22**) à l'aide du programme ImageJ. Tout d'abord, les souris KO non traitées ont montré plus de collagène que les souris HZ non traitées ($p < 0.03$). Ensuite, le test de variance ANOVA2 impliquant trois facteurs (temps, génotype, et interaction entre les deux) a montré que l'accumulation de collagène dans le tissu est significative chez les souris HZ, entre CTL et J7 ($p < 0.05$) ainsi que CTL et J14 ($p < 0.001$). Donc, les quantités de collagène observées après traitement ne diffèrent pas entre les génotypes mais l'animal KO semble « partir » d'une quantité de collagène plus importante que l'animal HZ. Au cours du temps (CTL → J7 → J14), le collagène s'accumule manifestement dans les poumons des souris HZ ($p = 0.057$) alors que cette tendance n'est pas visible chez les souris KO. Il est cependant difficile d'affirmer, sur base de ces observations, que la souris KO serait protégée contre le développement de la fibrose. Malheureusement, les coupes obtenues au J21 chez quelques animaux seulement ne sont pas analysables pour le collagène pour des raisons techniques.

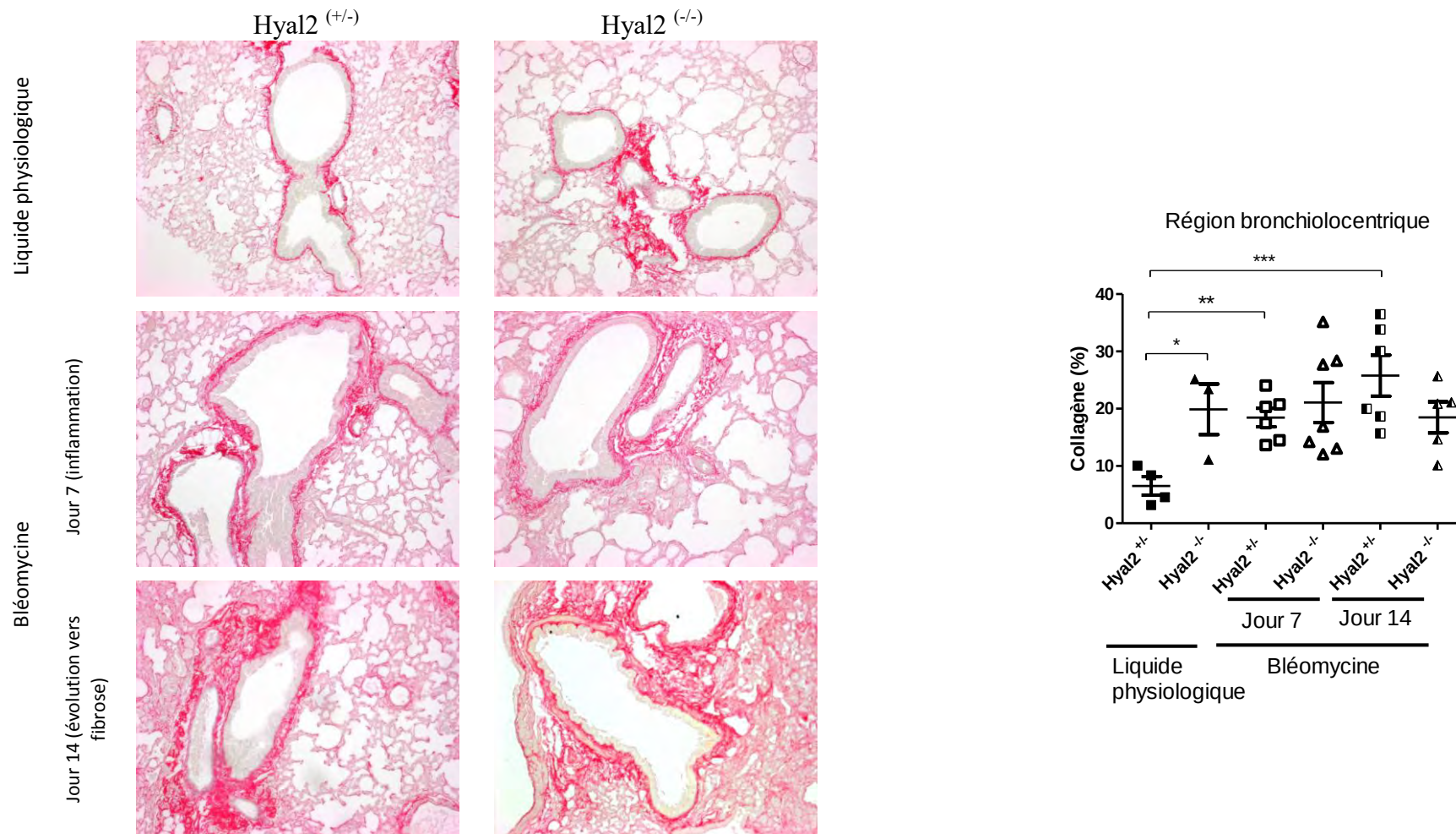


Figure 22. Mise en évidence du collagène I/III (coupes en paraffine colorées au rouge de picrosirius) au cours de la genèse de la fibrose pulmonaire chez des souris *Hyal2* (+/-) et *Hyal2* (-/-) contrôles et traitées à la bléomycine. (A) Histopathologie représentative du collagène I/III pulmonaire de souris *Hyal2* (+/-) et *Hyal2* (-/-) contrôles ou traitées (au 7^e et 14^e jour post-bléomycine). Une destruction de l'architecture alvéolaire normale et une déposition étendue de collagène (I et III) peuvent être observées dans tous les groupes. Agrandissement 100x. (B) Quantification du collagène I/III dans la région bronchiolocentrique à l'aide du logiciel ImageJ. Les valeurs individuelles représentent le pourcentage de collagène moyen des images analysées pour chaque animal (n=20 images en moyenne par animal). Les résultats présentés sont les moyennes ± SEM. Signification statistique : *p<0.03 pour la comparaison basale entre les génotypes (t-test) ; **p<0.05 pour la comparaison entre CTL et J7, et ***p<0.001 pour la comparaison entre CTL et J14, chaque fois chez les souris HZ (ANOVA2) (***p<0.001, *p<0.05).

2.3. Localisation de l'HA dans le poumon

Des sections du poumon périphérique (zone anatomique au confluent des zones de conductions d'air et d'échanges gazeux) ont été enrobées de paraffine et l'HA a été mis en évidence par immunohistochimie à l'aide d'une protéine liant HA. Le contrôle négatif, n'ayant pas été mis en présence de cette HABP, ne présente aucun marquage.

Les **groupes CTL** présentent un HA disséminé de manière bronchiolocentrique, angiocentrique, dans le conjonctif sous-mésothélial et au niveau des macrophages alvéolaires. Il n'y a pas de différence observable entre les souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) pour ce paramètre.

Les **groupes euthanasiés au 7^e et 14^e jour post-traitement** présentent une distribution omniprésente de l'HA. Celui-ci est en particulier associé à la périphérie des macrophages mais pas nécessairement autour des autres cellules de l'infiltrat inflammatoire (**Figure 23**).

Une comparaison entre les groupes Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) traités est difficile à réaliser au vu de la variabilité inter-individuelle et de l'hétérogénéité de la localisation de l'HA selon les zones tissulaires analysées. Cette hétérogénéité est observable sur une coupe histologique d'un poumon d'individu traité qui révèle, à fort grossissement, une hétérogénéité de localisation de l'HA selon la zone pulmonaire analysée (donnée non montrée). Toutefois, ce facteur pris en compte, il semble n'y avoir aucune différence histologique visible entre les poumons d'individus HZ et KO traités.

L'étape suivante consiste à quantifier l'HA pulmonaire.

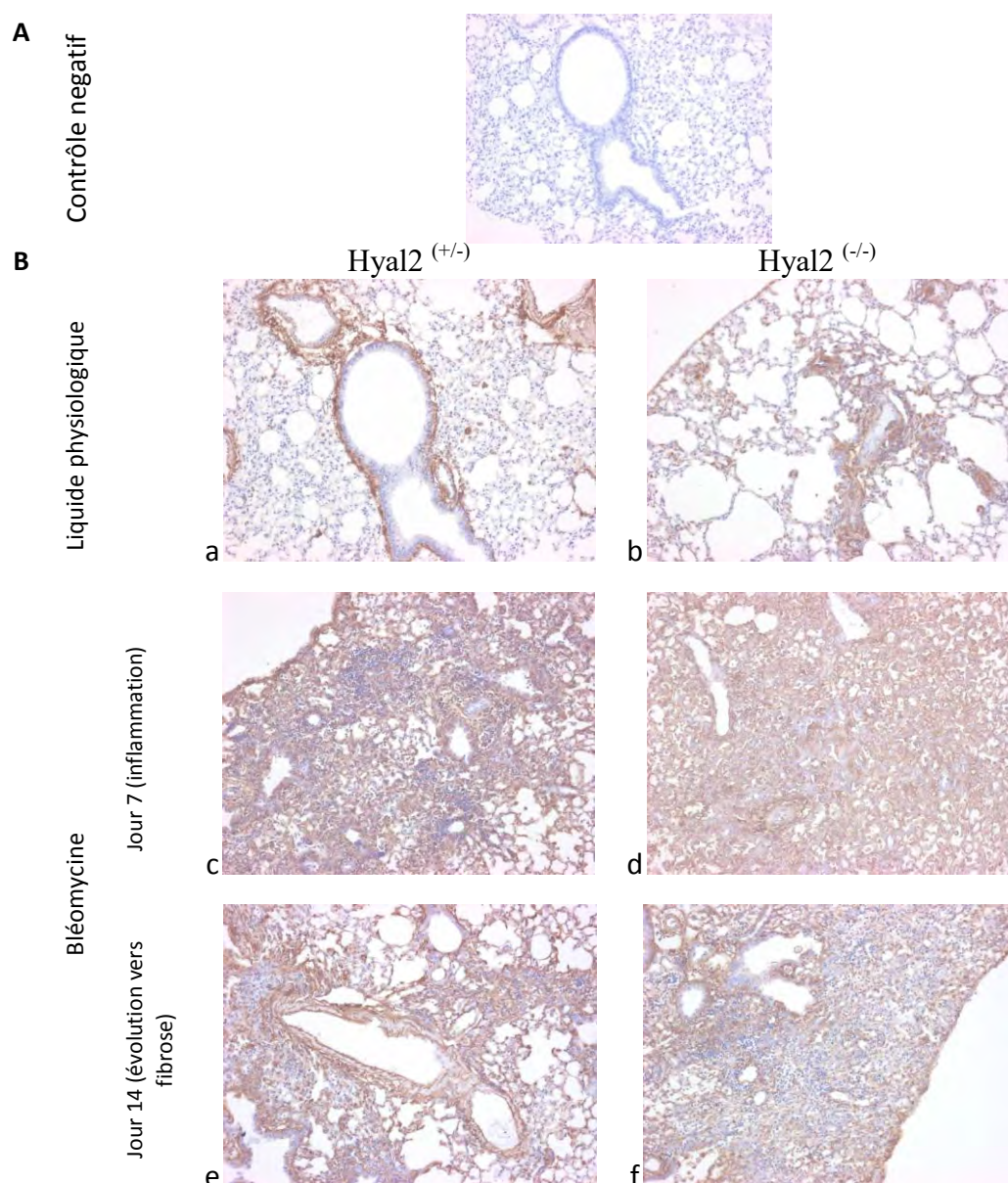


Figure 23. Mise en évidence de l'HA au cours de la genèse de la fibrose pulmonaire chez des souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles et traitées à la bléomycine. (A) Contrôle négatif non traité avec l'HABP. (B) Les groupes contrôles [Hyal2 (+/-) (a) et Hyal2 (-/-) (b)] présentent un HA localisé principalement autour des bronchioles, des vaisseaux, au niveau du conjonctif sous-mésothélial et au niveau des macrophages alvéolaires. Au 7^e et 14^e jour post-bléomycine, les souris Hyal2 (+/-) (c,e) et Hyal2 (-/-) (d,f) ont un HA omniprésent dans le tissu à l'exception des cellules inflammatoires (autres que les macrophages). Immunohistochimie sur coupes en paraffine. Agrandissement 100x.

2.4. Quantité d'HA dans le tissu pulmonaire

Après avoir localisé l'HA, celui-ci est quantifié à l'aide d'un test ELISA sur un homogénat de tissu pulmonaire (**Figure 24**). L'analyse statistique utilisant un test de variance ANOVA 2 impliquant trois facteurs (temps, génotype, et interaction entre les deux) montre que seul le facteur temps influence significativement l'accumulation d'HA ($p < 0.02$) ; autrement dit, il n'y pas de différence entre les génotypes. Les taux d'HA augmentent significativement durant la première semaine suivant l'instillation à la bléomycine. L'impression d'une valeur d'HA plus élevée chez les souris KO par rapport aux souris HZ,

en conditions CTL et J7 (mais pas J14) n'est pas confirmée statistiquement. La variabilité est, à nouveau, élevée.

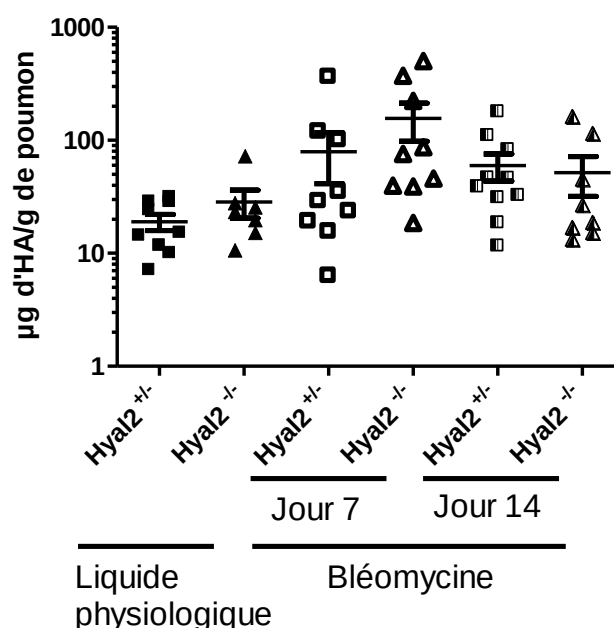


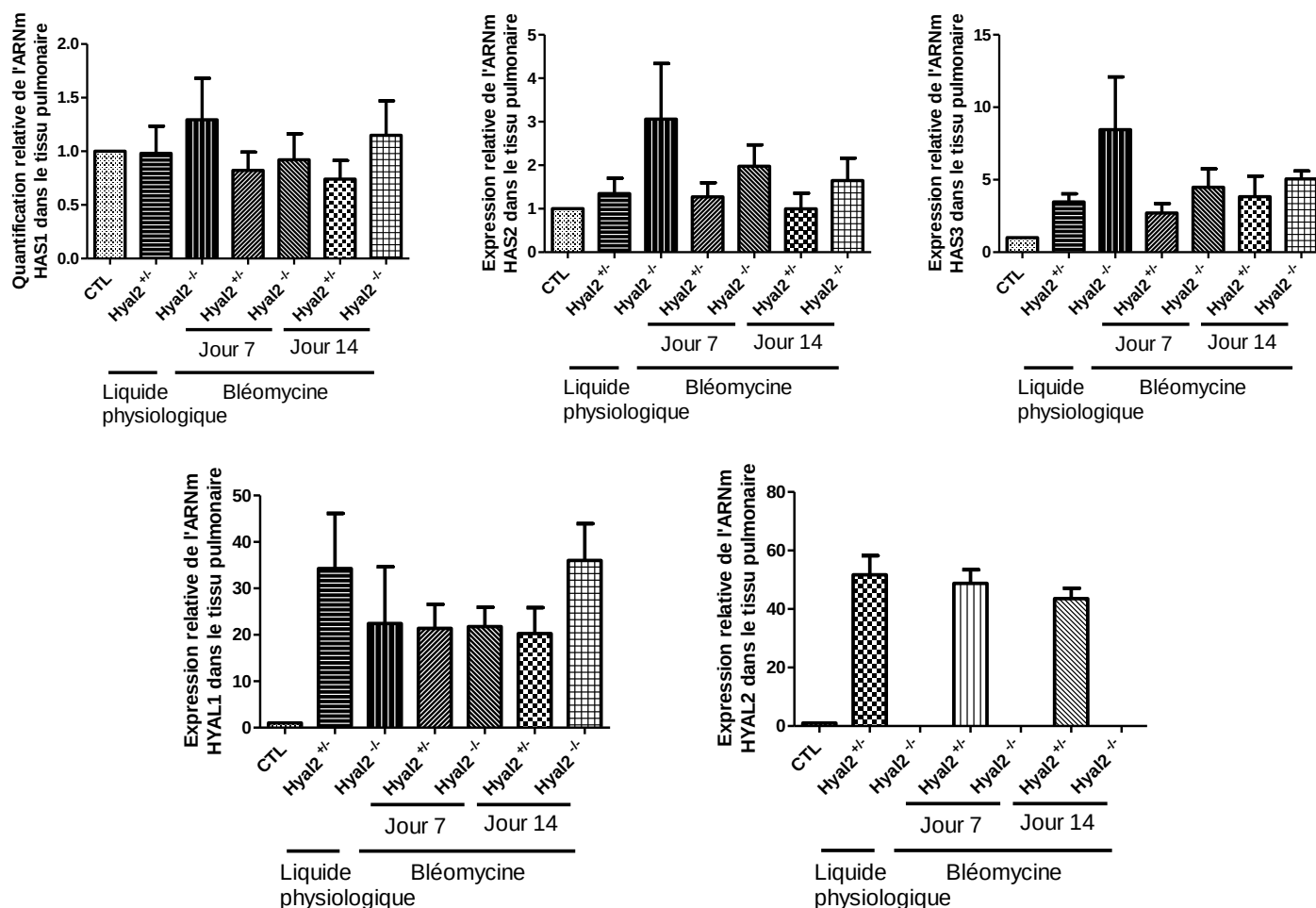
Figure 24. Quantification de l'HA pulmonaire chez des souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles et traitées à la bléomycine. L'HA dans les échantillons de poumon est mesuré à l'aide d'un test ELISA. Les résultats présentés (sur une ordonnée logarithmique) sont les moyennes $\pm$ SEM. Signification statistique : * $p < 0.05$ pour le temps (ANOVA2).

2.5. Expression des HAS et de HYAL1 et HYAL2 dans le poumon

L'expression de l'ARNm des HAS et de HYAL-1 et -2 dans le poumon a été quantifiée par RT-PCR quantitative. Le fait de rapporter l'expression des HAS et HYAL à un contrôle commun (HAS1) permet de comparer l'expression de ces gènes entre eux. On observe ainsi, globalement, la hiérarchie d'expression suivante : HAS1 < HAS2 < HAS3 < HYAL1 < HYAL2 pour un individu Hyal2 (+/-). Notons que l'expression d'HYAL3 n'a pas été investiguée en raison de la date d'échéance du travail et des résultats présentés par Atami et collègues (Atmuri et al. 2008). Selon ces derniers, les seules différences présentes chez la souris Hyal3 (-/-) sont un léger changement de la structure alvéolaire et un épaississement de la matrice extracellulaire chez les souris de 12-14 mois.

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative concernant l'expression des HAS et de HYAL1 au cours du temps ou entre les génotypes (Figure 25-A). On peut simplement observer des tendances similaires au niveau des profils d'expression des synthases. Quelle que soit la condition étudiée (liquide physiologique, 7^e et 14^e jour post-bléomycine), les synthases semblent avoir une expression légèrement plus forte chez les KO que chez les HZ. Des variations (non significatives) de l'expression relative des gènes d'intérêts sont résumées dans la Figure 25-B. Elles doivent être interprétées avec précaution.

A



B

	Jour 7		Jour 14	
	<i>Hyal2</i> ^(+/-)	<i>Hyal2</i> ^(-/-)	<i>Hyal2</i> ^(+/-)	<i>Hyal2</i> ^(-/-)
HAS1	↓	↓	↓	↑
HAS2	↓	↓	↓	↓
HAS3	↓	↓	↑	↑
HYAL1	↓	↓	↓	↑
HYAL2	↓	/	↓	/

Figure 25. Etude de l'expression relative de l'ARNm des HAS et d'HYAL1, 2 dans le tissu pulmonaire de souris *Hyal2*^(+/-) et *Hyal2*^(-/-) contrôles et traitées (au 7^e et 14^e jour post-bléomycine). (A) Le taux d'ARNm de HAS1, dans un extrait de poumon de souris *Hyal2*^(+/-) instillé au liquide physiologique, a été reporté à 1. Il est considéré comme référence (CTL) pour la quantification de l'expression des autres gènes. Les résultats, obtenus par RT-PCRq, présentent l'expression relative par rapport au CTL et exprime une moyenne de triplicats ± SEM. HAS1, n=9 ; HAS2, n=6 ; HAS3, n=4 ; HYAL1, n=6 ; HYAL2, n=6. (B) Tableau récapitulatif des tendances d'expression relative des gènes codant pour les HAS et HYAL1,2.

2.6. Estimation de l'activité hyaluronidasique pulmonaire

L'estimation de l'activité hyaluronidasique pulmonaire est basée sur la technique semi-quantitative de zymographie sur des homogénats tissulaires (Paech et al. 1993). La détection de l'activité hyaluronidasique sur gel est possible grâce à l'utilisation d'un colorant spécifique de l'HA, le Stains All, qui marque l'HA présent dans le gel. Dès lors, sur le gel

original, les plages de dégradation de l'HA montrent une couleur moins intense (ici en noir par modification d'image). D'après Fiszer-Szafarz et ses collaborateurs (Fiszer-Szafarz 1984), le Stains All met en évidence l'HA de taille $<1,5$ kDa, or HYAL2 génère des fragments d'environ 20 kDa. Donc la zymographie ne permet pas de détecter que la dégradation d'HA induite par HYAL1.

Les **résultats** présentés dans la **Figure 26** montrent des activités enzymatiques à 3 PM différents, situés aux alentours de 55, 79 et plus de 121 kDa. Ces activités sont représentées dans tous les groupes étudiés. Elles se présentent sous forme de bandes distinctes mais d'intensité différentes selon le groupe. Bien que la technique soit semi-quantitative, il est difficile de comparer l'intensité des bandes vu la qualité assez médiocre du premier gel. La zymographie ne semble pas contredire les résultats de la RT-PCRq.

Notons que le **contrôle positif** est du sérum murin. Dans celui-ci, HYAL1 est considérée comme la seule source d'activité hyaluronidasique du plasma. Ce sérum présente 3 bandes de tailles similaires à celles retrouvées chez les souris contrôles et traitées.

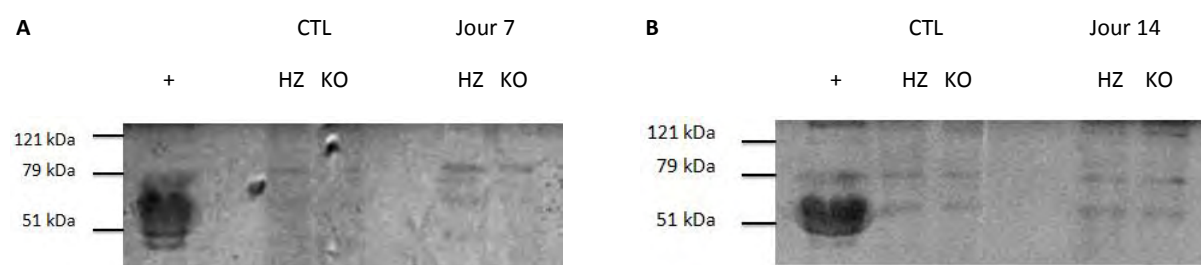


Figure 26. Zymographie d'homogénats de poumons de souris Hyal2 $(+/-)$ et Hyal2 $(-/-)$ contrôles et traitées (au 7^e et 14^e jour post-traitement). La piste du contrôle positif (+) contient 1 μ l de sérum murin (82 μ g de protéines). Les résultats montrent l'activité HYAL1 d'un homogénat de poumon (75 μ g), de souris Hyal2 $(+/-)$ ou Hyal2 $(-/-)$ représentatif du groupe contrôle (CTL), du groupe 7 jour post-bléomycine (A) ou du groupe 14 jour post-bléomycine (B).

3. Analyse des lavages bronchoalvéolaires et péritonéaux

3.1. Numération des cellules du fluide du lavage bronchoalvéolaire

Une **numération cellulaire non différentielle** a été réalisée sur le fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris Hyal2 $(+/-)$ et Hyal2 $(-/-)$ contrôles et traitées à la bléomycine (au 7^e, 14^e et 21^e jour post-traitement) (**Figure 27**).

Les **analyses statistiques** ont révélé une augmentation très significative du nombre de cellules, dans les deux génotypes, entre la condition CTL et la condition J7 ou J14. L'analyse statistique n'a pas pu être étendue à la condition J21 vu le faible nombre de données obtenues à ce moment-là. On perçoit cependant une tendance à la diminution au J21, comparé à J7 et J14. Enfin, élément important, aucune différence n'est observable entre les 2 génotypes, à aucun moment (même si, à J21, les quelques animaux HZ observés semblent avoir tous retrouvé un nombre de cellules équivalent à l'état basal, ce qui ne serait pas le cas chez les souris KO).

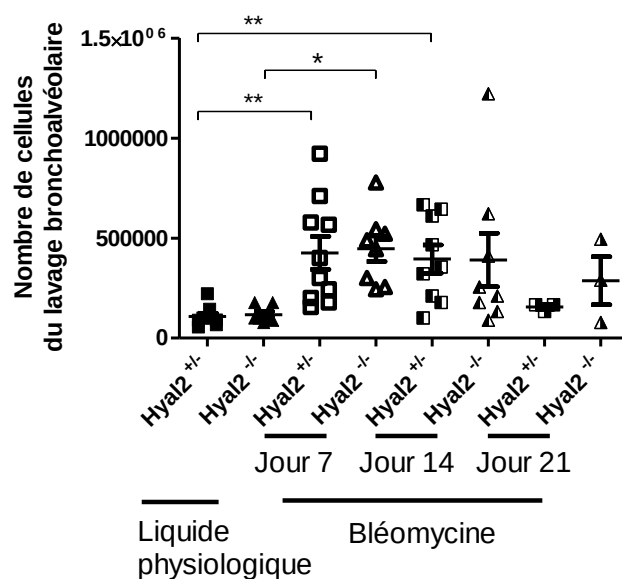


Figure 27. Nombre de cellules du fluide du lavage bronchoalvéolaire chez des souris Hyal2^(+/+) et Hyal2^(-/-) contrôles et traitées (au 7^e, 14^e et 21^e jour post-traitement). Signification statistique : *p<0.05, **p<0.01 (Test de Dunnett).

3.2. Analyse morphologique des cellules du fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris traitées à la bléomycine

Les changements morphologiques des cellules présentes dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire (BALF) ainsi que leur variation en nombre ont été décrits comme des caractéristiques des maladies pulmonaires diffuses. Les résultats du BALF sont parfois tellement spécifiques qu'ils peuvent directement confirmer un diagnostic particulier et remplacer une biopsie pulmonaire (King 2009).

Afin d'analyser les changements morphologiques cellulaires potentiels présents dans notre étude, les cellules du BALF ont été colorées au Diff-Quick et analysées. L'analyse morphologique cellulaire (**Figure 28**) révèle une présence de neutrophiles, macrophages et lymphocytes. Aussi, il semblerait qu'au 7^e jour post-instillation, les macrophages se vacuolisent, prenant ainsi l'aspect de cellules spumeuses. Enfin, aucune différence n'est observable entre les individus de génotype différent.

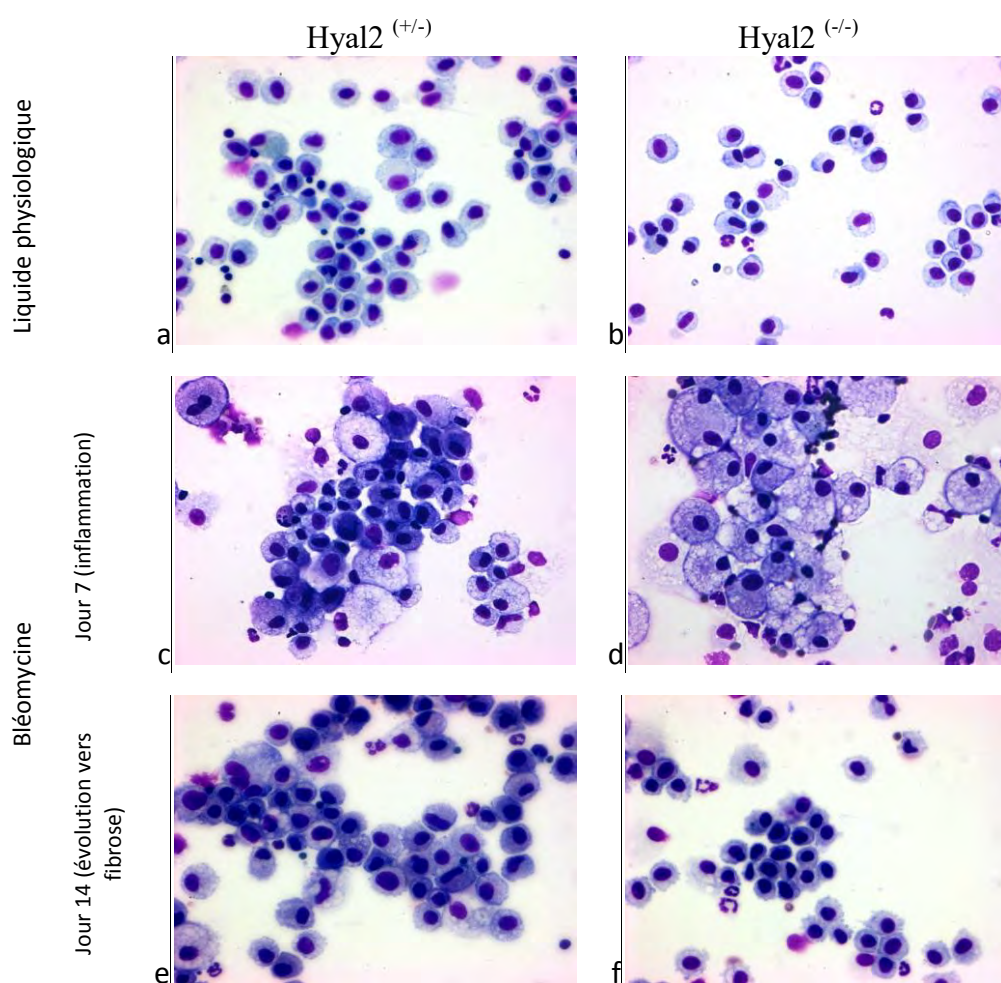


Figure 28. Morphologie des cellules du fluide de lavage bronchoalvéolaire prélevé chez des souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles (a-b), du groupe 7 jours post-bléomycine (c-d) et du groupe 14 jours post-bléomycine (e-f). Diminution des neutrophiles et lymphocytose apparaissant avec le traitement. Présence au 7^e jour de macrophages spumeux et de taille hétérogène. Coloration Diff-Quick. Agrandissement 400x.

3.3. Taux d'IL1 β (cytokine pro-inflammatoire) dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire

Afin de confirmer la présence d'un processus inflammatoire, l'IL1- β est quantifiée à l'aide d'un test ELISA (**Figure 29**).

L'**analyse statistique** utilisant un test de variance ANOVA 2 impliquant trois facteurs (temps, génotype, et interaction entre les deux) a montré que l'IL1- β augmente de manière significative entre la condition CTL et la condition J7 post-bléomycine, mais uniquement chez les souris HZ (en effet, il existe une interaction significative entre le temps et le génotype). Chez les souris HZ, l'IL1- β diminue significativement de J7 à J21 (là aussi il existe une interaction temps/génotype, et cette évolution des souris HZ n'est pas présente chez les souris KO). Un test de variance ANOVA-1 a révélé une variation significative de la quantité d'IL1- β chez les souris Hyal2 (+/-) entre la condition CTL et la condition J7 ; ensuite, les valeurs se normalisent par rapport au CTL. Dans l'ensemble, il est manifeste que les souris Hyal2 (-/-) révèlent moins de signaux inflammatoires, même si cette différence n'est pas confirmée par les analyses histologiques.

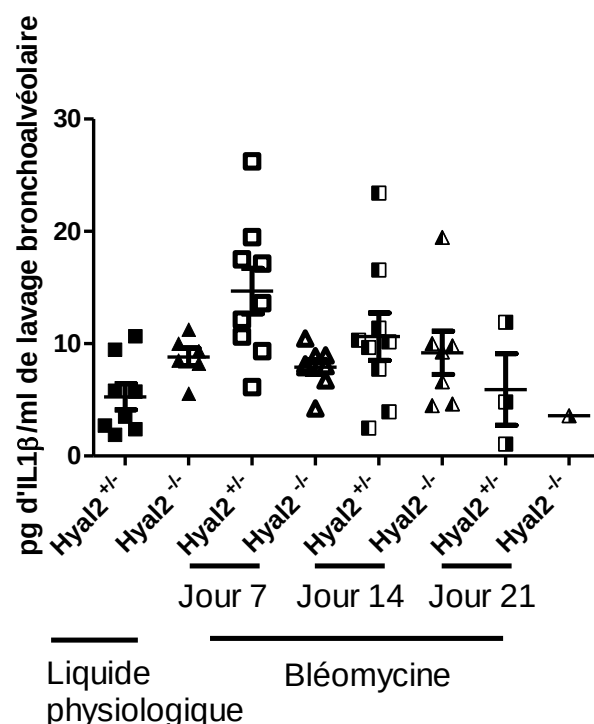


Figure 29. Quantification de l'IL1- β dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles et traitées à la bléomycine (au 7^e, 14^e et 21^e jour post-instillation). L'IL-1 β est mesurée à l'aide d'un test ELISA. Les résultats présentés sont les moyennes $\pm$ SEM. Signification statistique par ANOVA1 et ANOVA2: * $p < 0.05$ pour le génotype (7 jours vs 21 jours); ** $p < 0.01$ pour l'interaction génotype-temps et le facteur temps seul (condition liquide physiologique vs 7 jours); *** $p < 0.01$ pour les Hyal2 (-/-) (condition liquide physiologique vs 7 jours).

3.4. Taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire

L'HA est quantifié dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire à l'aide d'un test ELISA (Figure 30).

L'analyse statistique utilisant un test de variance ANOVA 2 impliquant trois facteurs (temps, génotype, et interaction entre les deux) a montré que l'HA augmente de manière hautement significative en fonction du temps après l'instillation et qu'il existe une interaction entre temps et génotype, de sorte que l'augmentation d'HA au temps J7 est statistiquement plus importante dans les souris KO que HZ. Cette différence est visible aussi au J14, même si l'ANOVA-2 ne la confirme pas. L'analyse statistique n'a pas pu être étendue au temps J21, vu le faible nombre de données obtenues.

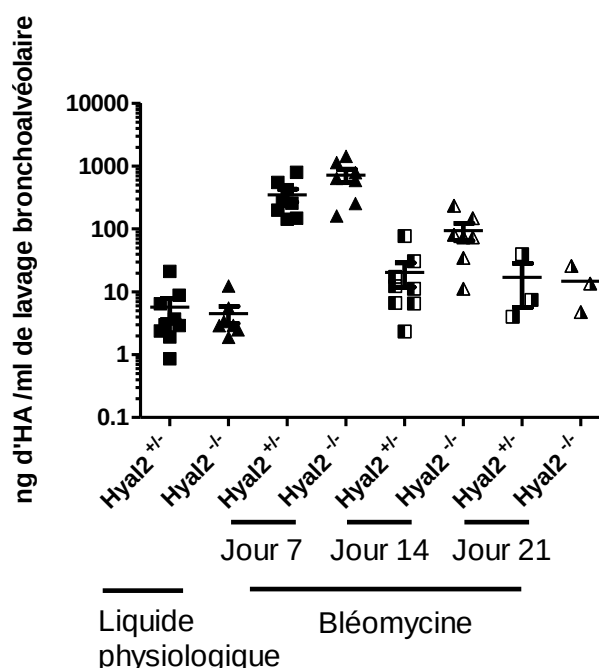


Figure 30. Effet de la bléomycine sur les taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles ou traitées (au 7^e, 14^e et 21^e jour post-bléomycine). Le HA dans les échantillons de fluide est mesuré à l'aide d'un test ELISA. Les résultats présentés sont des moyennes $\pm$ SEM. Signification statistique (ANOVA2): *** $p < 0.001$ pour le facteur temps et * $p < 0.05$ pour le facteur genotype entre le groupe contrôle et le groupe du 7^e jour post-traitement. * $p < 0.05$ pour l'interaction entre ces deux facteurs. *** $p < 0.001$ pour le facteur temps et * $p < 0.05$ pour le facteur genotype entre le groupe du 7^e jour versus groupe du 14^e jour.

3.5. Correlation entre le taux d'HA et le taux d'IL1- β dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire

La corrélation entre l'HA et l'IL1- β dans le lavage bronchoalvéolaire est évaluée par le calcul du coefficient de corrélation linéaire (Figure 31). L'analyse statistique révèle que le coefficient de corrélation, tous groupes confondus, est proche de la significativité (0.053). Il pourrait donc exister une corrélation positive entre l'HA et l'IL1- β du fluide du lavage bronchoalvéolaire, même si le graphique montre que cette corrélation n'est pas spectaculaire. De plus, le coefficient de corrélation a été calculé pour chaque groupe de manière individuelle (Tableau 7). Il ne permet cependant pas de déterminer une relation significative au sein des différents groupes.

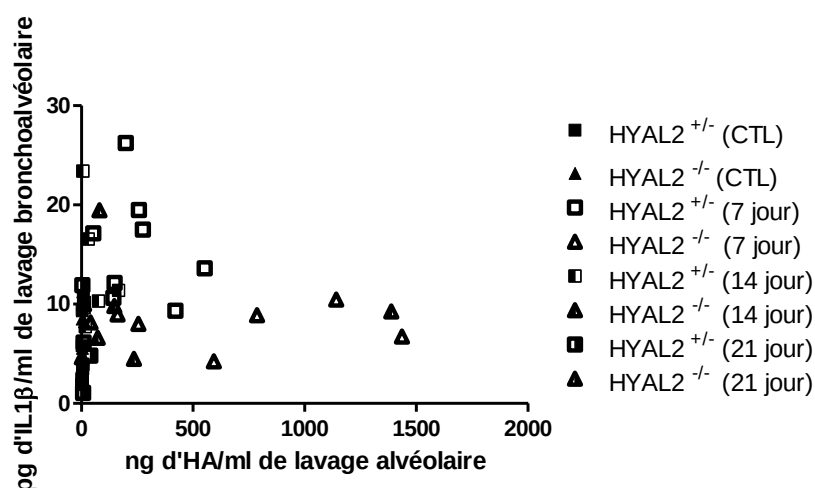


Figure 31. Correlations entre le taux d'HA (axe des X) et le taux d'IL1- β (axe des Y) dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris Hyal2 $^{+/+}$ et Hyal2 $^{-/-}$ contrôles ou traitées (au 7^e, 14^e et 21^e jour post-bléomycine). $r = 0.05333$

Tableau 7. Tableau récapitulatif des paramètres évalués lors de corrélation du taux d'HA et d'IL1- β dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire.

Paramètres	HYAL2 $^{+/+}$ (CTL)	HYAL2 $^{-/-}$ (CTL)	HYAL2 $^{+/+}$ (7 jour)	HYAL2 $^{-/-}$ (7 jour)	HYAL2 $^{+/+}$ (14 jour)	HYAL2 $^{-/-}$ (14 jour)
Nombre de valeurs	7	6	9	7	9	7
r de Pearson	0,5626	-0,02106	0,06417	-0,007672	0,08825	-0,01601
Valeur de P	0,1886	0,9684	0,8697	0,9870	0,8214	0,9728
Significativité	No	No	No	No	No	No
R ²	0,3165	0,0004433	0,004118	5,886e-005	0,007788	0,0002564

3.6. Numération des cellules du fluide du lavage péritonéal

Une **numération cellulaire non différentielle** a été réalisée sur le fluide du lavage péritonéal de souris Hyal2 $^{+/+}$ et Hyal2 $^{-/-}$ contrôles et traitées à la bléomycine (au 7^e et 14^e jour post-traitement) (**Figure 32**).

Les **analyses statistiques** ont révélé une variation hautement significative du nombre de cellules entre la condition « liquide physiologique » et la condition J7 (ANOVA2). De plus, chez les souris Hyal2 $^{+/+}$, l'augmentation cellulaire est significative entre la condition physiologique et la condition J7 ou J14 (Test de Dunnett). Enfin, on ne perçoit pas de différence entre les génotypes.

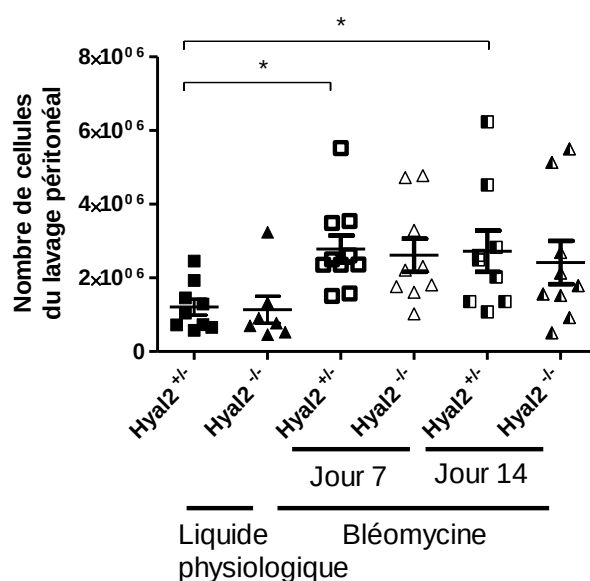


Figure 32. Nombre de cellules du fluide du lavage péritonéal chez des souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles et traitées (7^e et 14^e jour post-traitement). Signification statistique : * $p < 0.05$ (Test de Dunnett) et *** $p < 0.001$ pour le facteur temps entre le groupe contrôle et le groupe du 7^e jour post-traitement (ANOVA2).

3.7. Analyse morphologique des cellules du lavage péritonéal de souris traitées à la bléomycine

Les cellules du fluide du lavage péritonéal ont été colorées au Diff-Quick et analysées. L'analyse morphologique cellulaire (**Figure 33**) révèle, dans l'ensemble des groupes, une variété de cellules inflammatoires avec prédominance de lymphocytes et mastocytes. Tout comme pour le BALF, l'analyse du lavage péritonéal au J7 montre de grandes cellules macrophagiques d'allure spumeuse.

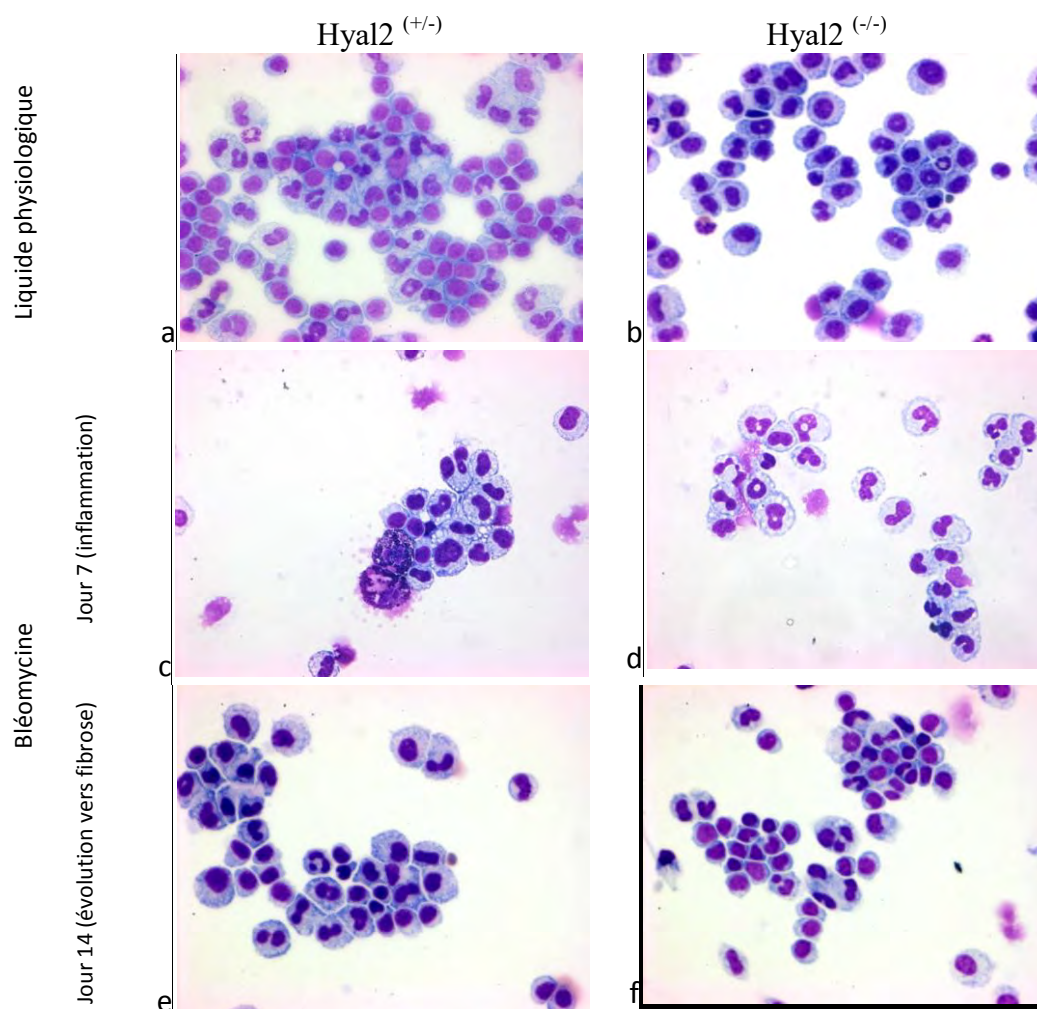


Figure 33. Morphologie des cellules du fluide du lavage péritonéal prélevé chez des souris *Hyal2*^(+/-) ou *Hyal2*^(-/-) contrôles (a-b), du groupe 7 jours post-bléomycine (c-d) et du groupe 14 jours post-bléomycine (e-f). Présence de cellules inflammatoires dont les lymphocytes et mastocytes. Coloration Diff-Quick. Agrandissement 400x.

3.8. Taux d'HA dans le fluide du lavage péritonéal

L'HA est quantifié dans le fluide du lavage péritonéal à l'aide d'un test ELISA (Figure 34).

L'analyse statistique utilisant un test de variance ANOVA 2 impliquant trois facteurs (temps, génotype, et interaction entre les deux) a montré qu'entre la condition « liquide physiologique » et la condition J7, l'HA varie très significativement avec le temps et significativement selon le génotype (élévation plus importante chez les KO). De plus, l'ANOVA-1 a permis de déduire que l'HA des souris *Hyal2*^(+/-) varie de manière hautement significative entre les conditions J7 et J14 (augmentation).

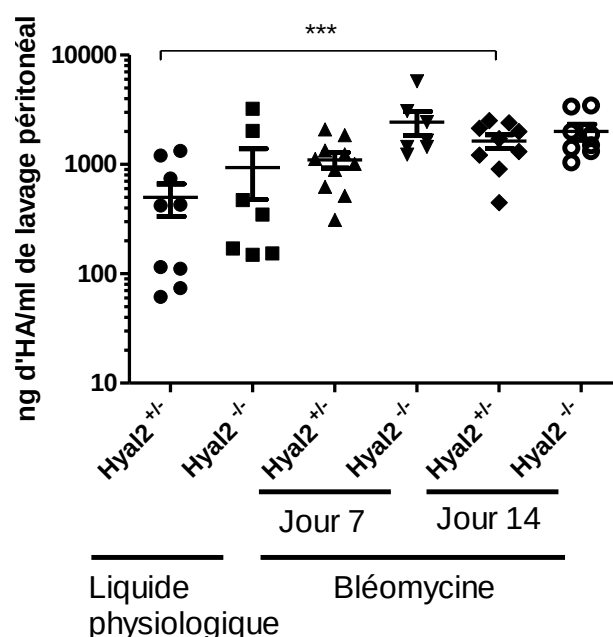


Figure 34. Effet de la bléomycine sur les taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire de souris Hyal2 (+/-) et Hyal2 (-/-) contrôles ou traitées (au 7^e et 14^e jour post-bléomycine). Le HA du fluide est mesuré à l'aide d'un test ELISA. Les résultats présentés sont des moyennes $\pm$ SEM. Significations statistiques: ** $p < 0.01$ pour le facteur temps et * $p < 0.05$ pour le facteur génotype entre la condition physiologique et la condition 7e jour. * $p < 0.05$ pour le facteur génotype entre la condition 7 jours et la condition 14 jours (ANOVA2). *** $p < 0.001$ entre Hyal2 (+/-) du 7^e jour versus Hyal2 (+/-) du 14^e jour (ANOVA1).

3.9. Corrélation entre le taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire et le taux d'HA dans le tissu pulmonaire

La corrélation entre l'HA dans le lavage bronchoalvéolaire et l'HA dans le tissu pulmonaire est mesurée par le calcul du coefficient de corrélation linéaire. Ce coefficient de corrélation reflète la quantité globale de représentation de la liaison entre les variables.

L'analyse statistique révèle que le coefficient de corrélation, tous groupes confondus, est égal à 0.55 (Figure 35). Il existe donc une corrélation positive nette entre l'HA du fluide du lavage bronchoalvéolaire et l'HA du poumon. De plus, le coefficient de corrélation peut avoir été calculé pour chaque groupe de manière individuelle (Tableau 8). Il permet d'identifier la relation entre l'HA du BALF et du tissu comme étant significative pour les Hyal2 (+/-) du groupe CTL et du groupe J7. Aussi, la relation semble être proche de la significativité pour le groupe des Hyal2 (+/-) du 14^e jour ($p = 0.053$).

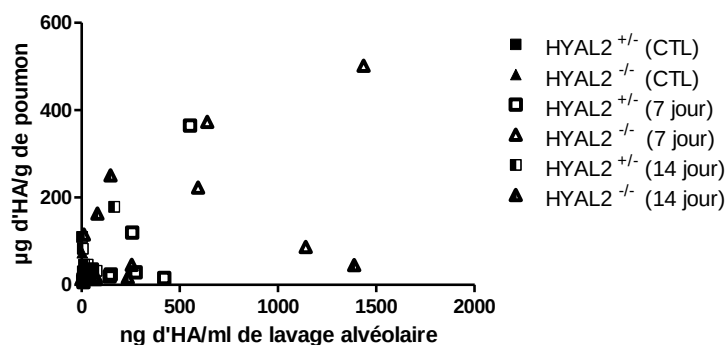


Figure 35. Correlations entre le taux d'HA du fluide du lavage bronchoalvéolaire (axe des X) et le taux d'HA dans le tissu pulmonaire (axe des Y) de souris Hyal2 ^(+/−) et Hyal2 ^(−/−) contrôles ou traitées (7^e et 14^e jour post-bléomycine). Signification statistique : ***p<0.001 (r = 0.5575).

Tableau 8. Tableau récapitulatif des paramètres évalués lors de corrélation du taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire et le tissu pulmonaire. Signification statistique : *p<0.05.

Paramètres	HYAL2 ^(+/−) (CTL)	HYAL2 ^(−/−) (CTL)	HYAL2 ^(+/−) (7 jour)	HYAL2 ^(−/−) (7 jour)	HYAL2 ^(+/−) (14 jour)	HYAL2 ^(−/−) (14 jour)
Nombre de valeurs	8	7	8	5	9	9
r de Pearson	0,8031	-0,2310	0,7163	0,5585	0,6603	-0,09891
Valeur de P	0,0164	0,6182	0,0304	0,3278	0,0529	0,8001
Significativité	*	ns	*	ns	ns	ns
R ²	0,6449	0,05336	0,5130	0,3119	0,4360	0,009783

3.10. Corrélation entre le taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire et le taux d'HA dans le fluide du lavage péritonéal

La corrélation entre l'HA dans le lavage bronchoalvéolaire et l'HA dans le lavage péritonéal est mesurée par le calcul du coefficient de corrélation linéaire. Ce coefficient de corrélation reflète la quantité globale de représentation de la liaison entre les variables.

L'**analyse statistique** révèle que le coefficient de corrélation, tous groupes confondus, est égal à 0.22 (**Figure 36**). Le graphe présente donc une corrélation positive faible entre l'HA du fluide du lavage bronchoalvéolaire et l'HA du fluide du lavage péritonéal. De plus, le coefficient de corrélation a été calculé pour chaque groupe de manière individuelle (**Tableau 9**). Il permet d'identifier une relation très significative entre l'HA du BALF et du fluide du lavage péritonéal des souris Hyal2 ^(+/−) contrôles. Aussi, la relation semble être proche de la significativité pour le groupe des Hyal2 ^(+/−) du 14^e jour (p=0.052).

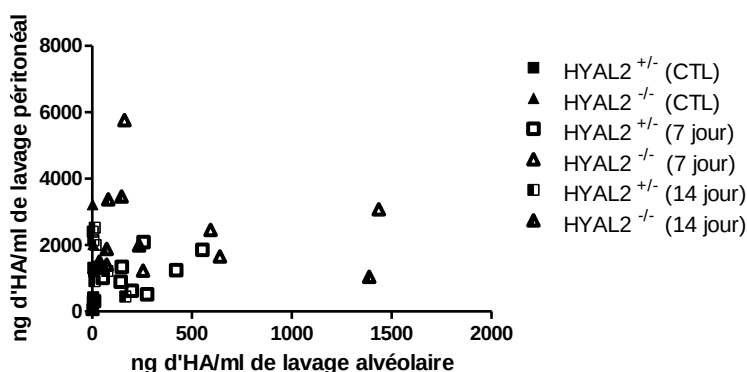


Figure 36. Corrélations entre le taux d'HA du fluide du lavage bronchoalvéolaire (axe des X) et le taux d'HA dans le fluide du lavage péritonéal (axe des Y) de souris Hyal2 ^{+/+} et Hyal2 ^{-/-} contrôles ou traitées (au 7^e et 14^e jour post-bléomycine). $r = 0.2230$.

Tableau 9. Tableau récapitulatif des paramètres évalués lors de corrélation du taux d'HA dans le fluide du lavage bronchoalvéolaire et le fluide du lavage péritonéal. Signification statistique : ** $p < 0.01$.

Paramètres	HYAL2 ^{+/+} (CTL)	HYAL2 ^{-/-} (CTL)	HYAL2 ^{+/+} (7 jour)	HYAL2 ^{-/-} (7 jour)	HYAL2 ^{+/+} (14 jour)	HYAL2 ^{-/-} (14 jour)
Nombre de valeurs	8	7	9	6	8	9
r de Pearson	0,8836	-0,1909	0,5723	0,02228	-0,7030	-0,1686
Valeur de P	0,0036	0,6818	0,1073	0,9666	0,0518	0,6645
Significativité	**	ns	ns	ns	ns	ns
R ²	0,7807	0,03644	0,3275	0,0004966	0,4942	0,02844

3.11. Localisation des récepteurs de l'HA (CD44 et RHAMM) sur les macrophages péritonéaux

Les macrophages possèdent différents récepteurs liant l'HA dont CD44 et RHAMM. Ces derniers traduisent les effets biologiques de l'HA à travers les interactions récepteurs-ligands. Ainsi, CD44 semble essentiel durant la phase de résolution de l'inflammation tissulaire alors que l'interaction RHAMM-HA est importante pour le recrutement de cellules inflammatoires (Zaman et al. 2005; Heldin et al. 2008).

Afin de déterminer la présence de CD44 et RHAMM macrophagiques (alvéolaires et péritonéaux) chez des souris Hyal2 ^{+/+} et Hyal2 ^{-/-} contrôles et traitées à la bléomycine, une analyse par immunofluorescence a été réalisée. Nous observons que CD44 est présent sur la surface des macrophages tandis que RHAMM est présent à la fois en surface et dans le compartiment intracellulaire (**Figure 37**). Le CD44 présent à la surface des macrophages alvéolaires sera quantifié par imagerie alors que le CD44 présent à la surface des macrophages péritonéaux sera quantifié par cytométrie en flux.

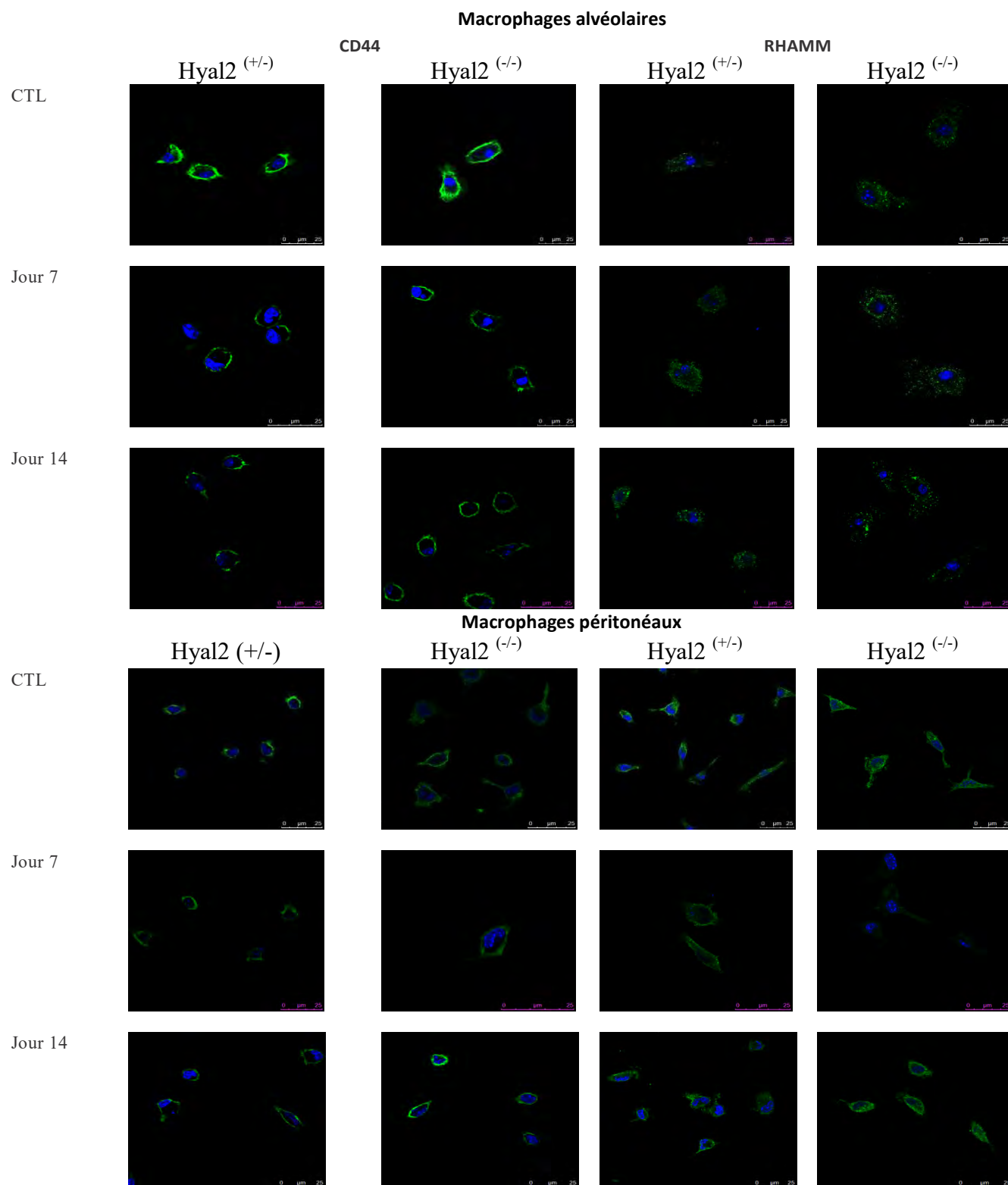


Figure 37. Marquage immunofluorescent et analyse en microscopie confocale de RHAMM et CD44 (tous deux en vert) dans les macrophages alvéolaires et péritonéaux. Les noyaux sont visibles grâce au TOPRO-3 (bleu). Échelle, 25 μ m.

3.12. Quantification du CD44 présent à la surface des macrophages alvéolaires

Le récepteur de l'hyaluronan (CD44) présent sur les macrophages alvéolaires de souris contrôles (instillation de liquide physiologique) et traitées (instillation de bléomycine) a été quantifié à l'aide du programme ImageJ (**Figure 38**).

L'**analyse statistique** révèle que la présence de CD44 en surface ne semble pas varier entre les souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-), que ce soit en condition « liquide physiologique » ou dans la condition J7. Toutefois, la présence de CD44 varie de manière très significative avec le temps entre la condition J7 et J14 (ANOVA2).

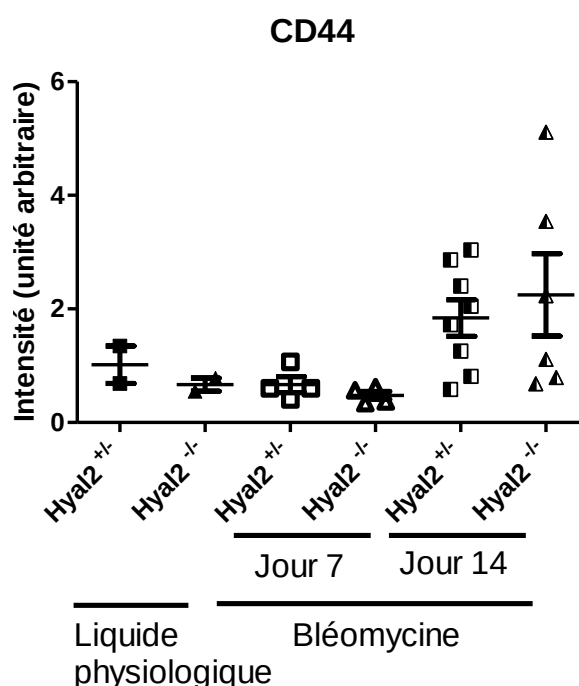


Figure 38. Quantification de CD44, à la surface des macrophages alvéolaires, à l'aide du logiciel ImageJ. Les valeurs individuelles représentent l'intensité moyenne des images analysées pour chaque animal (n=10 images en moyenne par animal). Les résultats présentés sont les moyennes $\pm$ SEM. Signification statistique : **p<0.01 pour le facteur temps entre la condition 7e jour et la condition 14e jour (ANOVA2).

3.13. Quantification du CD44 présent à la surface des macrophages péritonéaux

L'expression du CD44 à la surface des macrophages péritonéaux de souris contrôles (instillation de liquide physiologique) et traitées (instillation de bléomycine) a été étudiée en cytométrie de flux. Les macrophages sont sélectionnés à l'aide du marquage de F4/80 présent exclusivement sur leur membrane (et non sur d'autres leucocytes) (Gordon 2007). Une fois la sous population sélectionnée, la présence de CD44 est quantifiée (**Figure 39**) et les résultats des différents groupes d'études sont comparés (**Figure 40**).

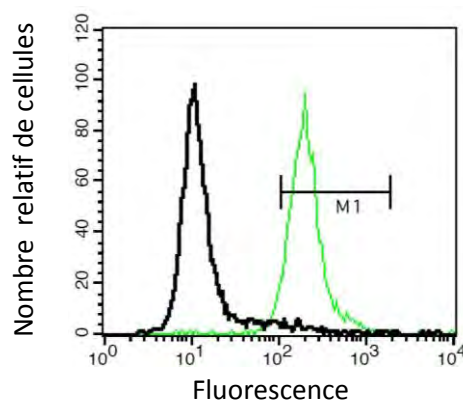


Figure 39. Histogramme représentatif de la fluorescence de l'expression de CD44 à la surface des macrophages péritonéaux de souris Hyal2^{-/-} au 7^e jour post-instillation. Les cellules sont soumises à l'analyse en cytomètre de flux et sélectionnée de façon à ce que M1 représente la population positive.

L'**analyse statistique** indique que le facteur temps est très significatif entre la condition « liquide physiologique » et la condition J7 de cette étude. En d'autres termes, la quantité de CD44 augmente de manière très significative avec le temps, entre ces deux périodes (ANOVA2). De plus, il s'avère que les souris Hyal2^(+/-) ont une augmentation très significative de l'expression de leur CD44 en surface des macrophages péritonéaux, et ce 14 jours après l'instillation de bléomycine (Test de Dunnett).

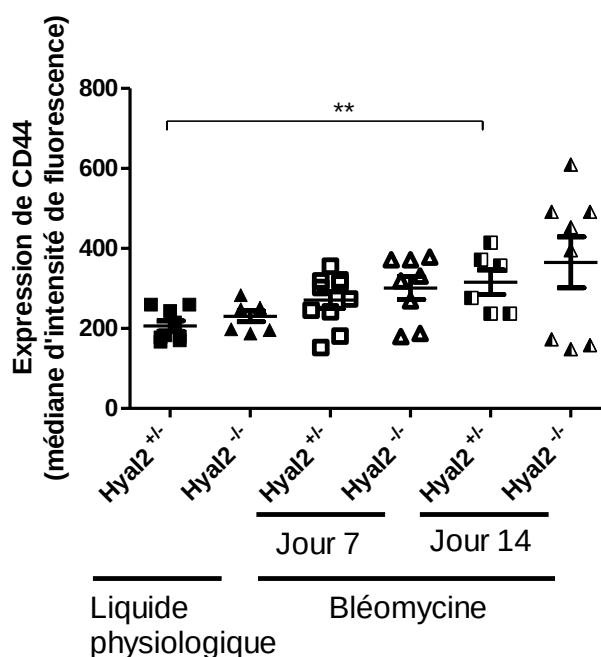


Figure 40. Expression de CD44 à la surface des macrophages péritonéaux quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats présentés sont des moyennes $\pm$ SEM. Signification statistique: ** $p < 0.01$ (Test de Dunnett) et ** $p < 0.01$ pour le facteur temps entre la condition physiologique et la condition 7 jours.

3.14. Endocytose en phase fluide des macrophages péritonéaux

Les cellules inflammatoires ont différentes fonctions y compris l'endocytose. L'HRP peut être considérée comme un traceur de l'endocytose en phase fluide (Steinman and Cohn 1972). Donc, dans cette expérience, l'endocytose de l'HRP a été investiguée dans les macrophages péritonéaux. D'après l'article de Ferrante, nous avons choisi un temps d'incubation de 120 min afin d'obtenir une endocytose optimale (Ferrante et al. 2002).

Trois facteurs sont étudiés dans les analyses statistiques : le temps, le génotype, et l'interaction entre les deux. Il en résulte qu'aucun facteur n'a une influence significative dans cette étude (**Figure 41**).

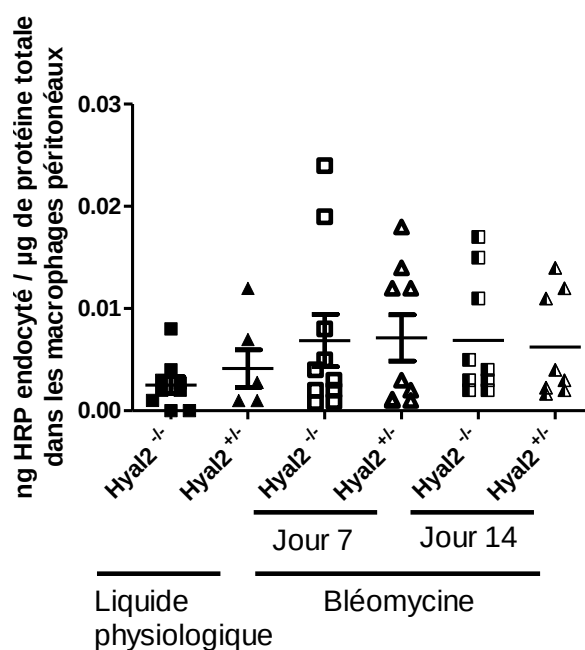


Figure 41. L'endocytose en phase fluide de l'HRP (1mg/ml, 120 min d'exposition à 37 °C) par des macrophages péritonéaux. Les résultats présentés sont des moyennes $\pm$ SEM.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

« Dans toute discussion, le plus délicat est toujours de faire la différence entre une querelle de mots et une querelle de fond. »

Bertrand Russell

1. *Modèle animal de fibrose pulmonaire induite par bléomycine*

La **fibrose pulmonaire** humaine résulte de mois/années d'un remodelage aberrant de la matrice pulmonaire. De nombreux modèles animaux ont été établis afin d'examiner la pathobiologie de la maladie. Le **modèle** de fibrose induite par bléomycine, que nous utilisons, tente de reproduire la genèse fibrotique à travers de plus courtes périodes de temps. Ce modèle est basé sur deux suppositions : premièrement, le dommage induit évolue progressivement en une fibrose interstitielle et alvéolaire ; deuxièmement, les caractéristiques pathologiques étudiées révèlent une étape ponctuelle de la pathologie humaine. En bref, l'imprévisibilité de l'évolution de la maladie fibrotique humaine et l'extrapolation entre l'animal et l'Homme deviennent des considérations secondaires. Finalement, l'approche d'une modélisation animale basée sur l'observation de molécules isolées peut paraître réductionniste. En dépit de tous ces désavantages, il reste vrai que seuls les modèles *in vivo* ont le potentiel de résumer les interactions complexes qui se combinent pour donner, *in fine*, la FP.

La **voie d'administration** de la bléomycine peut varier. Dans notre étude, la voie utilisée est intratracheale afin d'obtenir une fibrose accentuée sur les bronches et *a fortiori* sur les alvéoles. La dose administrée peut aussi être un facteur déterminant. Une dose unique induit une alvéolite aiguë suivie d'un processus fibrotique réversible. Toutefois, elle permet l'étude de leucocytes tels que les macrophages qui augmentent de manière significative dans le BALF après ce type d'instillation (Degryse et al. 2010). Une administration de doses répétées permet une fibrose plus importante, progressive et persistante accompagnée de dépôts accrus de collagène et conduisant à des changements biomécaniques pulmonaires (Pinart et al. 2009; Degryse et al. 2010). Comme nous voulions une méthode simple permettant la reproduction rapide des phases de la genèse fibrotique et l'investigation du rôle d'Hyal2 dans le poumon et les macrophages, nous avons choisi la voie d'instillation intratrachéale à dose unique.

Les **conséquences physiopathologiques** de l'administration du sulfate de bléomycine peuvent être divisées en deux phases, l'inflammation et la fibrose. Après l'administration médicamenteuse, on observe un début d'inflammation aiguë des voies respiratoires inférieures qui se prolonge jusqu'au 8^{ème} jour, suivi par des changements fibrogéniques qui résultent en un dépôt de matrice et une altération de la structure pulmonaire au 21^{ème} jour (Moeller et al. 2008) (**Figure 42**). L'utilisation de ce modèle nous a permis d'investiguer le rôle d'Hyal2 dans le poumon et les macrophages de souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) durant la

genèse d'une FP. En effet, l'association entre la délétion génétique et le stimulus exogène contribue à augmenter la valeur prédictive du modèle.

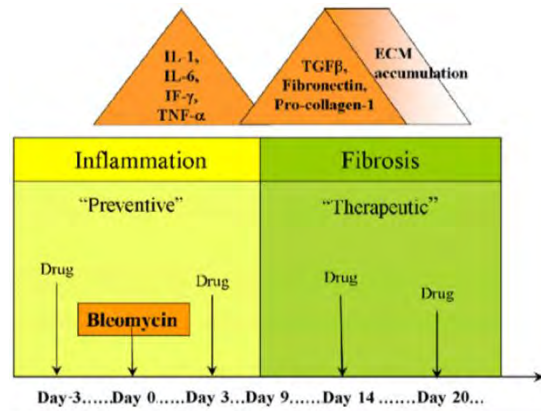


Figure 42. Evènements séquentiels survenant lors d'un modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine à dose unique (Moeller et al. 2008).

Toutefois, la prudence s'impose lors de l'interprétation des données dérivées de ce modèle ainsi que lors de l'extrapolation des résultats à la maladie humaine. En effet, l'utilisation d'agents toxiques locaux pour recréer la fibrose chez l'animal ne peut reproduire parfaitement un état pathologique humain.

2. *Les macrophages alvéolaires, un facteur technique limitant de l'étude*

Initialement, des souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-) sont instillées à la bléomycine à 1 mg/kg. Après leur euthanasie (au 7^e, 14^e et 21^e jour post-administration), nous examinons différents paramètres dans le poumon et les macrophages alvéolaires.

Le **nombre de macrophages alvéolaires** disponibles via le lavage broncho-alvéolaire est un facteur limitant dans notre investigation. C'est pourquoi, quelques expériences ont été réalisées sur des macrophages péritonéaux. Même s'ils diffèrent de leur homologues alvéolaires, il est présumé que les deux types cellulaires partagent la plupart de leurs fonctions ; tout deux possèdent Hyal2 à la surface de leur membrane (données non publiées de notre laboratoire). Finalement, même si les macrophages péritonéaux sont distants du site inflammatoire, ils restent sujets à l'action de certaines molécules inflammatoires libérées dans la circulation (effet systémique présumé). De plus, les cellules récoltées lors des lavages broncholavéolaires et péritonéaux ne sont pas exclusivement des macrophages. Toutefois, lors de dosages biologiques, seul le type cellulaire d'intérêt est isolé par adhésion sur boîte de Pétri ou par immunomarquage.

3. Discussion des résultats

L'histologie pulmonaire présente lors de la genèse de la FP est hétérogène et variable selon les individus d'expérience (souris). Durant la phase fibrotique, l'histologie révèle d'habitude une transition entre une fibrose grossière et le poumon sain, caractéristique d'une pneumonie interstitielle (King 2009). C'est également ce que nous avons observé.

Modifications morphologiques. En conditions physiologiques, les souris utilisées ont une architecture pulmonaire non pathologique. Au 7^{ème} jour post-bléomycine, le tissu est envahi d'infiltrats inflammatoires selon une distribution bronchiolocentrique et angio-centrique (dans le septa interlobulaire et au niveau de la plèvre). De manière moins importante, on trouve des infiltrats au niveau des sacs alvéolaires et en région subpleurale. Au 14^{ème} jour post-instillation, la distribution inflammatoire reste constante. Il en résulte une fibrose de grade 3 (Hubner et al. 2008) caractérisée par des interstitium contigus fibrotiques et des alvéoles raréfiées mais pas de masse fibrotique distincte. Au 21^{ème} jour post-traitement, la fibrose a atteint un grade 5. Elle se caractérise par des masses fibrotiques et des altérations graves de la structure pulmonaire. Les septums intervalvéolaires se voient recouverts de zones fibrotiques et cicatricielles. Une atteinte pleurale est aussi observable et est associée à une hyperplasie mésothéliale et à la présence de mastocytes. Les chymases de ces derniers peuvent être activées par le TGF- β et ainsi jouer un rôle destructeur dans la FP (Tomimori et al. 2003). Pour en revenir à l'inflammation, l'infiltrat inflammatoire semble diminuer au 21^{ème} jour par comparaison aux stades précédents.

En conséquence, nous avons observé, dans les 3 semaines suivant l'instillation de bléomycine, des lésions histologiques similaires à ce qui est décrit dans la littérature pour ce modèle. Cependant, aucune différence histologique frappante n'a été observée entre les poumons des souris Hyal2^(+/-) et Hyal2^(-/-), que ce soit en situation contrôle ou après traitement. **Hyal2 ne semble pas jouer de rôle régulateur** majeur en ce qui concerne l'inflammation ou les conséquences de celle-ci, durant les 2 à 3 premières semaines en tout cas.

Dépôts de collagène. La genèse de la FP se caractérise par une augmentation du collagène. Les dépôts de collagène I/III se localisent de manière angiocentrique et bronchiolocentrique, aux abords des sacs alvéolaires et au niveau du conjonctif sous-mésothélial. Le fait que le marquage soit situé au niveau sous-mésothélial, autrement dit en bord de coupe, pourrait être dû à un « effet de bord ». Cet effet se définit par un marquage abondant entre deux interfaces. Cela ne semble pas être le cas dans notre étude puisque le conjonctif sous-mésothélial est un conjonctif lâche (type III) qui peut donc être marqué par le rouge de picrosirius.

Les souris KO ont un marquage du collagène plus abondant que les souris HZ. Cette observation est assez surprenante, d'autant que l'histologie ordinaire ne montre pas de différence entre les génotypes et certainement pas d'inflammation anormale dans le poumon KO. Les analyses statistiques ont également infirmé une différence de dépôts d'HA entre les poumons KO et HZ à l'état basal, contrairement à ce qu'un survol des résultats

laissait initialement penser (Figure 24). De toute façon, histologiquement, il n'y a pas plus d'HA dans les poumons KO. Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires pour tenter de comprendre pourquoi les souris KO ont plus de collagène intrapulmonaire, par exemple via une augmentation de la concentration locale en TGF- β sous forme active. Une mesure de l'hydroxyproline peut également conforter les observations au rouge de picrosirius.

Ensuite, l'évolution des dépôts de collagène est également surprenante puisqu'elle augmente manifestement chez les souris HZ, depuis la situation contrôle jusqu'au 14^{ème} jour, mais qu'elle n'augmente pas du tout chez les souris KO. Malheureusement, un problème technique nous a empêchés de détecter le collagène dans les coupes des 6 souris examinées à J21. Ces expériences devraient être répétées afin de confirmer que les souris KO sont en quelque sorte protégées contre l'évolution de la FP post-bléomycine, même sans différence visible d'infiltration leucocytaire.

Les phases inflammatoires et fibrotiques encourues lors d'une FP induisent non seulement des modifications histologiques mais aussi des variations de **recrutement cellulaire**.

Numération cellulaire du BALF. Le lavage bronchoalvéolaire renseigne sur le nombre de cellules (macrophages, lymphocytes, neutrophiles) présentes dans les espaces alvéolaires. En condition physiologique, le BALF compte près de 100.000 cellules au total (lavage par 3 mL) alors qu'on en dénombre jusqu'à 5 fois plus en condition post-bléomycine. La technique a permis de mettre en évidence un recrutement cellulaire aux jours 7 et 14 post-traitement. Au 21^{ème} jour, le nombre cellulaire semble retourner à l'état basal. Cette diminution est confirmée par la littérature même si elle semble moins importante dans l'étude de Janick-Buckner (Janick-Buckner et al. 1989). La variation en nombre des cellules est significative pour l'individu Hyal2^(+/-) et est probablement identique pour l'individu Hyal2^(-/-). Une coloration Diff-Quick des cellules du BALF a permis d'identifier les cellules présentes dans le lavage (lymphocytes, macrophages, neutrophiles). Ainsi, la morphologie macrophagique semble assimilable à celle d'une cellule spumeuse 7 jours après traitement.

Cependant, à aucun moment après le traitement (ni à l'état basal) n'est apparue une différence liée aux génotypes.

Numération cellulaire du fluide du lavage péritonéal. En condition physiologique, le lavage péritonéal compte près d'un million de cellules au total. Ceci est confirmé par la littérature (Nowak et al. 2008)]. En condition post-bléomycine, ce chiffre grimpe à près de $2.5 \cdot 10^6$. Ceci confirme une atteinte systémique induite par l'administration médicamenteuse intra-trachéale. Toutefois, aucune différence significative de nombre ni de morphologie des leucocytes dans le lavage péritonéal n'a été observée entre les génotypes. Hyal2 ne semble pas de jouer de rôle majeur dans l'inflammation péritonéale post-bléomycine non plus.

L'IL1- β . La phase inflammatoire de la FP est aussi en relation directe avec certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1- β , produite par les macrophages activés et les cellules épithéliales. IL1- β est à la base de changements structurels observés dans les

poumons de patients ayant une maladie pulmonaire fibrotique chronique (Gasse et al. 2007). Dans notre étude, l'IL1- β du fluide du lavage bronchoalvéolaire est en relation directe (hautement significatif) avec la phase inflammatoire. Les valeurs obtenues pour la souris sont identiques à celles obtenues chez le même animal par Kakizaki et ses collaborateurs (Kakizaki et al. 2009) et chez l'homme atteint de FP idiopathique (Wilson et al. 2010). Dans notre étude, sa variation au cours du temps est fonction du génotype. Chez l'individu Hyal2^(+/-), la valeur basale d'IL1- β est plus faible que chez son homologue Hyal2^(-/-), et au cours de la fibrose post-bléomycine, les souris Hyal2^(-/-) produisent moins d'IL1- β , même si cette différence n'est pas confirmée par les analyses histologiques. De plus, la cytokine pro-inflammatoire IL1- β présente dans le BALF est corrélée, quoiqu'à la limite de la signification statistique ($p=0.053$), à la quantité d'HA présent dans le même fluide. Cette corrélation pourrait reposer sur le fait que la synthèse de l'HA est induite par de multiples stimuli dont l'IL1- β (Lim et al. 2008).

Comment Hyal2 pourrait-il expliquer la différence de production d'IL1- β entre les génotypes ? Nos résultats ne permettent pas de le savoir. La présence d'une grande proportion d'HA de très haut PM dans l'environnement pulmonaire de la souris Hyal2^(-/-) ne semble pas une cause logique, puisque, selon la littérature, c'est l'HA de faible PM qui induit l'expression d'IL-1 β (Jiang et al. 2007). Nous devrions donc pousser les analyses pour comprendre la moindre réactivité en IL1- β des souris KO. Par exemple, cette cytokine pro-inflammatoire pourrait aussi être dosée : 1) au 21^{ème} jour post-bléomycine, afin de compléter les valeurs obtenues ; 2) dans le tissu, afin de confirmer les tendances observées dans le BALF ; 3) dans le lavage péritonéal, pour affirmer la présence d'un effet systémique de l'administration médicamenteuse (bien que le recrutement cellulaire varie de manière probante). De plus, il serait intéressant d'investiguer le complexe moléculaire cytoplasmique formant l'inflammasome chez la souris Hyal2^(-/-), sachant que l'HA joue un rôle dans l'activation de ce complexe (Gasse et al. 2007; Davis et al. 2011).

L'HA, catabolisé entre autres par Hyal2, joue un rôle dans le processus inflammatoire. Il a donc été étudié à la fois dans le tissu et au niveau du BALF et du fluide du lavage péritonéal.

Localisation de l'HA. En condition physiologique, l'HA se localise autour des bronches et des vaisseaux, et au niveau du conjonctif sous-mésothélial et des macrophages alvéolaires. Au 7^{ème} et 14^{ème} jour post-bléomycine, il est omniprésent dans le tissu, à l'exception des cellules inflammatoires non-macrophagiques. Une grande partie de ces observations a été confirmée par Green et ses collègues (Green et al. 1988). Leurs observations renseignent sur une localisation prédominante de l'HA autour des adventices et occasionnellement dans la région subendothéliale de l'intima des artères. Il semblerait qu'en ces lieux, l'HA forme des complexes avec des protéoglycans et soit retenu dans le tissu (Green et al. 1988).

L'HA dans le tissu et dans le BALF (Figure 43). Dans le tissu pulmonaire, l'HA s'accumule significativement durant la première semaine post-traitement et montre une tendance à la diminution durant la seconde semaine. Cette dernière observation est

soutenue par la littérature qui met en avant une diminution de la concentration d'HA, diminution qui aboutira à une concentration basale du substrat dans le tissu (Nettelbladt et al. 1989). Les valeurs absolues sont difficilement comparables à la littérature puisqu'elles sont fonction de la dose de bléomycine instillée (Swaney et al. 2010). Aucune différence inter-génotypique n'a pu être mise en évidence dans nos expériences. Toutefois, durant les deux premières semaines post-traitement, les souris Hyal2^(-/-) affichent des taux un peu plus élevés d'HA, comparés aux groupes Hyal2^(+/-) du même type. Dans le BALF, l'HA s'accumule de manière hautement significative durant la première semaine post-traitement et diminue de manière durant la seconde semaine. Il faut savoir que l'augmentation d'HA dans le BALF est une caractéristique des maladies pulmonaires interstitielles (Lynch 2004). Le profil du graphe et la gamme de valeurs obtenues pour l'individu Hyal2^(+/-) sont confirmés par Zelko (Zelko and Folz 2010). Le taux d'HA retombe dans une gamme de valeurs basales dans le courant de la troisième semaine. L'HA est fonction du génotype car les souris Hyal2^(-/-) présentent des valeurs plus élevées durant les deux semaines post-instillation. Enfin, il existe une corrélation positive assez forte entre l'HA du BALF et du tissu pulmonaire. Il semble aussi exister une corrélation (non calculée) entre le nombre de cellules dans le BALF et la quantité d'HA présente dans le fluide.

Jiang et d'autres soutiennent l'existence de différents rôles de l'HA selon sa masse moléculaire (Jiang et al. 2007). En théorie, l'HA a une « taille » moyenne de 220 kDa dans un poumon physiologique (Nettelbladt et al. 1989) mais il peut y être présent sous forme de polymère de haut PM ($>10^6$ Da) (Lynch 2004). Lors de la phase inflammatoire, l'HA induit par des facteurs synthétisés par les macrophages post-bléomycine (Teder et al. 1995) subit des fragmentations. Ces dernières génèrent des dérivés de faibles PM (Teder et al. 2002). La cause de cette fragmentation n'a pas été déterminée précisément ; elle serait due à une augmentation de l'activité hyaluronidasique ou à une attaque directe des ROS durant l'agression tissulaire (Soltes et al. 2006; Monzon et al. 2008). Ainsi, l'apparence et la modification du PM des nouvelles molécules d'HA devraient être une caractéristique essentielle de la croissance lésionnelle et du processus réparateur de la FP. Par conséquent, il serait intéressant de mesurer la taille de l'HA présent dans le BALF et dans le tissu, avant et après exposition à la bléomycine. Cette mesure serait établie par chromatographie d'exclusion stérique.

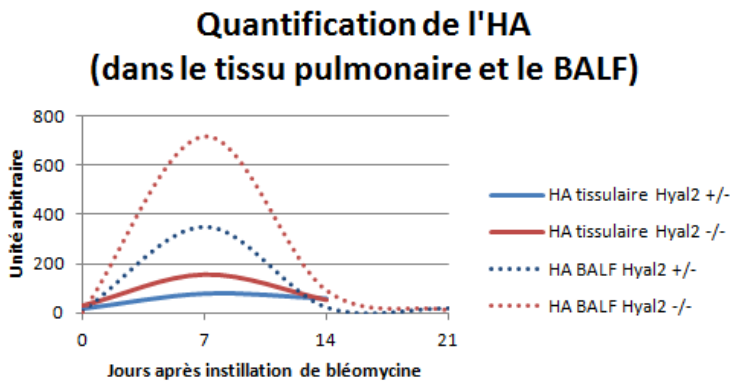
Les profils d'HA dans le tissu et le BALF sont semblables, bien que la quantité d'HA est plus importante dans le tissu pulmonaire que dans le BALF. Ces profils sont en accord avec certaines recherches montrant que l'HA dans le tissu pulmonaire et le BALF atteint son sommet au jour 7 et décline ensuite graduellement pour revenir à des valeurs basales (Jiang et al. 2011). Cette augmentation de l'HA durant la première semaine post-traitement pourrait refléter l'intensité de l'alvéolite (visible en histologie) et de l'avancée de la maladie (Zhao et al. 1999). Ainsi, l'augmentation de l'HA dans le BALF est présentée comme un marqueur sensible de blessures pulmonaires (Teder and Heldin 1997). L'HA semble donc un épiphénomène de la réponse inflammatoire pré-lésionnelle.

Que ce soit dans le tissu ou le BALF, la souris Hyal2^(-/-) présentent une quantité d'HA plus importante que son homologue Hyal2^(+/-). Cette observation est explicable par le rôle

que rempli Hyal2 ; l'animal étant dépourvu d'une enzyme catabolisant l'HA, la quantité du substrat dans l'environnement s'en trouve augmentée.

L'HA dans le fluide du lavage péritonéal. Comme le résume la **Figure 43**, la variation de la quantité d'HA au cours de la genèse d'une FP diffère selon le génotype. Après administration de bléomycine, la quantité d'HA varie de manière très significative, il augmente de manière constante chez l'individu Hyal2^(+/-) alors qu'il croît au 7^{ème} jour puis décroît au 14^{ème} jour chez les souris Hyal2^(-/-). On observe aussi une corrélation positive, quoique faible, entre l'HA du BALF et l'HA du fluide du lavage péritonéal, ce qui permet de conclure à un effet médicamenteux toxique systémique.

A



B

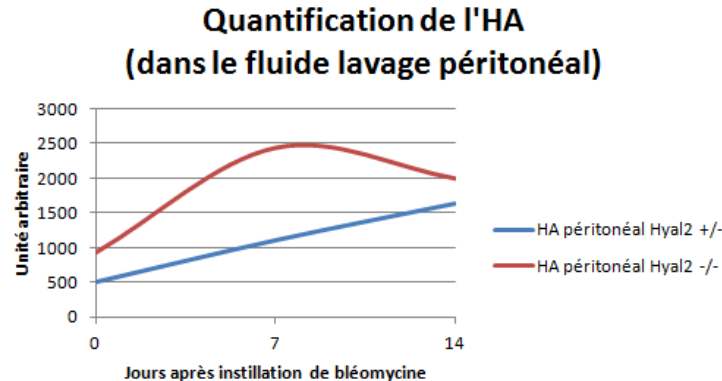


Figure 43. Shématisation des tendances présentes dans l'analyse de quantification de l'HA (A) dans le tissu pulmonaire et le BALF (B) ainsi que dans le fluide du lavage péritonéal.

La variation de la quantité d'HA, au cours de la genèse de la FP, pourrait être due à :

- 1) une variation de l'expression des enzymes de synthèse et/ou de dégradation du substrat ;
- 2) l'existence d'un décalage temporel entre l'augmentation du profil d'expression des synthèses et l'augmentation de la quantité de leur produit de synthèse dans l'environnement ;
- 3) une altération de la fonction des récepteurs cellulaires de l'HA (CD44, RHAMM) ;
- 4) une prolifération et une activation des fibroblastes (Moseley et al. 1986) durant la première semaine post-instillation ;
- 5) une altération du mécanisme de clairance du substrat (déficiency du drainage lymphatique de l'interstitium alvéolaire avec oedème lymphatique ultérieure). Pour comprendre cette dernière hypothèse, il faut savoir que le contenu pulmonaire en HA n'est pas seulement régulé par sa synthèse ou sa dégradation locale, mais aussi par le débit de fluide traversant la barrière endothéliale, l'interstitium, et le réseau lymphatique pulmonaire (Ormiston et al. 2010). L'accumulation de l'HA dans l'interstitium pulmonaire pourrait altérer la pression osmotique et causer une diminution du flux du fluide transinterstitiel, ce qui a été montré déterminant dans le débit lymphatique de l'HA (Lebel et al. 1988). Ainsi, la clairance serait plus faible durant la première semaine post-instillation et augmenterait après le pic des 7 jours. Toutefois, cette hypothèse n'est pas probante pour Teder et Heldin (Teder and Heldin 1997). Grâce à nos investigations, quelques hypothèses seront partiellement discutées dans la suite de ce volet.

Synthèse et catabolisme de l'HA. Notre investigation nous permet de dire que, de manière globale, quelle que soit l'expression de l'ARNm étudié (HAS, HYAL1-2), le profil d'expression relative d'un gène d'intérêt chez un individu Hyal2^(-/-) est un peu plus élevé que celui de son homologue Hyal2^(+/-). Cependant, aucune de ces différences n'est statistiquement significative et nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion probante de ces résultats. Il est relativement étonnant de ne pas observer d'induction plus marquée des HAS (ou d'inhibition totale des hyaluronidases) dans une situation où l'HA s'accumule manifestement. Nous n'avons pas d'explication pour ce fait, sauf de suggérer des régulations post-traductionnelles des HAS ou des hyaluronidases.

De nombreux types cellulaires sont des participants potentiels à la synthèse de l'HA ; cependant, **les macrophages alvéolaires** jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire tissulaire et semblent être en lien direct avec la quantité d'HA présent dans l'environnement dans ce genre de pathologie (Savani et al. 2000). En réponse au traitement de bléomycine, les macrophages alvéolaires s'activent et libèrent des facteurs qui stimulent la production d'HA par les fibroblastes pulmonaires. Cependant, les macrophages alvéolaires possèdent plus de sites de liaison à l'HA sur leur surface et dégradent l'HA plus rapidement que les fibroblastes (Teder and Heldin 1997). Ils devraient donc représenter une part importante de la dégradation de l'HA dans le poumon.

Les sites principaux de liaisons de l'HA présents sur le macrophage alvéolaire sont le CD44 et RHAMM.

Localisation de CD44 et RHAMM. CD44, l'une des protéines les plus abondantes de la surface des macrophages, joue un rôle dans la clairance des fragments d'HA durant les blessures tissulaires (Teder et al. 2002). RHAMM est, quant à lui, important dans les blessures pulmonaires non infectieuses et la réparation tissulaire. Il permet le recrutement cellulaire. L'analyse immunofluorescente nous a permis de confirmer la localisation de ces récepteurs : CD44 est sur la surface des macrophages et RHAMM est à la fois en surface et dans les compartiments intracellulaires. Cependant, aucune différence de localisation de ces récepteurs n'a été observée selon le génotype étudié.

Quantification de CD44. La quantification du récepteur d'internalisation de l'HA, CD44, a été réalisée par imagerie. Durant la seconde semaine post-instillation, le récepteur augmente de manière hautement significative en membrane. L'abondance du même récepteur a été quantifiée par FACS à la surface des macrophages péritonéaux. Durant la première semaine post-traitement, le CD44 augmente de manière hautement significative et se termine par une tendance à l'augmentation au cours de la semaine suivante. D'après Teder et Heldin, il existe une saturation des liaisons CD44-HA au niveau des macrophages alvéolaires de rat (Teder and Heldin 1997). Les récepteurs des macrophages alvéolaires (du BALF ou tissulaires) lient 8 fois moins l'HA après 1 jour de traitement et 14 fois moins après 15 jours (Teder and Heldin 1997). Ainsi, la théorie nous mène vers une déduction assez paradoxale : une augmentation du récepteur d'internalisation de l'HA (de faible PM) et une déficience du système de dégradation des macrophages alvéolaires durant la phase précoce post-traitement [toutes deux observées/pressenties dans notre étude] conduisent à une diminution de la clairance de l'HA pulmonaire. De manière intéressante, cette

information n'explique aucunement l'augmentation d'HA observé après traitement. Ces observations conduisent vers deux hypothèses : 1) les mécanismes d'activation de CD44 [modifications post-traductionnelles (glycosylation), épissage alternatif, attachement au cytosquelette, phosphorylation du domaine intracellulaire, etc.] sont altérés durant la FP ; 2) ou bien il y a une diminution de la liaison du substrat à son récepteur après traitement [comme confirmé par (Teder and Heldin 1997)]. Dans leur investigation, l'interaction HA-CD44 s'améliore graduellement jusqu'au 14^{ème} jour, ce qui peut être expliqué par la maturation d'une nouvelle génération de macrophages alvéolaires (Teder and Heldin 1997). Enfin, sachant que la production d'IL1- β par les macrophages est dépendante de l'interaction CD44-HA (Noble et al. 1996), on peut expliquer les valeurs plus élevées de la cytokine dans le BALF durant les deux premières semaines.

Ces résultats suggèrent quelques perspectives. Premièrement, bien que les *macrophages alvéolaires* soient « sélectionnés » par adhésion sur boîte de Pétri, d'autres macrophages présents à la surface des bronches elles-mêmes sont également récupérés lors du lavage (Rankin 1989) et adhèrent à la boîte. À ce jour, on ne sait pas si leurs propriétés sont différentes de celles des macrophages alvéolaires et pourraient donc avoir entraîné un biais dans l'étude. Dès lors, une technique précise de purification cellulaire selon les sous-types existants devrait être préconisée. En ce qui concerne l'isolement plus efficace de la population des *macrophages péritonéaux*, il serait utile d'appliquer un double marquage (CD44/F4-80). Deuxièmement, une localisation et quantification d'Hyal2 sur macrophage aurait été utile. Sa fonction principale pourrait être la régulation de la concentration de mucus dans les voies respiratoires (Fiszer-Szafarz 1984). En effet, le mucus est constitué essentiellement de glycoprotéines et de GAG dont fait partie l'HA. Lors d'inflammations des bronches, par exemple, les conséquences néfastes d'une augmentation de la sécrétion de mucus pourraient être limitées par l'activation des macrophages et de leurs hyaluronidases. Les fonctions biomécaniques du poumon pourraient donc être investiguées afin de confirmer/infirmier cette hypothèse. Troisièmement, il aurait été intéressant de quantifier l'expression de RHAMM qui devrait augmenter avec le traitement (Zaman et al. 2005). Enfin, les TLR2 et TLR4, autres récepteurs de l'HA, auraient aussi pu être étudiés.

Les macrophages ont différentes **fonctions** qui pourraient être modifiées par Hyal2. Nous en avons examiné une, l'endocytose en phase fluide.

Endocytose en phase fluide. Le processus d'endocytose en phase fluide chez les macrophages péritonéaux n'a révélé aucune différence en fonction du temps ou du génotype. Cette fonction pourrait ne pas être affectée par l'administration médicamenteuse et le microenvironnement variable en HA. Toutefois, pour en être sûr, l'étude devrait être réalisée sur les macrophages alvéolaires (beaucoup moins abondants). De plus, des expériences *in vitro* utilisant des lignées de macrophages alvéolaires pourraient être réalisées afin de comprendre, de manière plus exacte, le rôle de Hyal2 sur la fonction des macrophages alvéolaires.

4. *Modèle hypothétique*

Basé sur quelques données de notre investigation, nous proposons un modèle hypothétique concernant la relation entre Hyal2, le poumon et les macrophages (**Figure 44**).

Chez les souris Hyal2^(+/-), durant une blessure, les ROS sont produit par les cellules endothéliales et les macrophages alvéolaires sont activés. Ces ROS dégradent l'HA extracellulaire en fragments de faibles PM qui induisent différentes fonctions (angiogénese, proinflammation, réparation tissulaire, recrutement de monocytes et de fibroblastes). Quelques-unes de ces fonctions, si elles sont répétées de manière chronique, conduisent à la formation de fibrose. Sur les macrophages alvéolaires, l'HA est capté par le biais de son récepteur majeur, CD44, pour être dégradé par la suite. Hyal2, à la membrane plasmatique, initie le clivage de l'HA en fragments intermédiaires de 20 kDa qui sont endocytés et voyagent au travers d'un compartiment endosomal pour atteindre les lysosomes. A l'intérieur de l'organite, Hyal1, β -glucuronidase et β -N-acétylglucosaminidase dégradent les fragments de 20 kDa en petits oligosaccharides ou monomères.

Chez les souris Hyal2^(-/-), l'absence d'Hyal2 diminue le nombre de fragments d'HA de faibles PM produits et induit un plus grand nombre d'HA de haut PM dans l'environnement cellulaire. La présence de cet HA de haut PM aurait pour conséquence : 1) la surexpression de HAS2 des souris Hyal2^(-/-) par rapport à leur homologue Hyal2^(+/-), (cf. résultats obtenus lors de notre étude, quoique non significatifs) ; 2) la réduction des différentes voies de signalisations engendrées par la présence de l'HA de faible PM. Parmi ces voies, on trouve la libération de l'IL1- β , qui ne varie pas dans le BALF des souris Hyal2^(-/-) investiguées lors de notre étude, contrairement à ce qui se passe chez les souris HZ. Dans le cytoplasme des macrophages alvéolaires, les fragments d'HA de taille inconnue seraient toujours présents. Parfois, ils peuvent être endocytés et voyager au travers de compartiments endosomaux pour atteindre les lysosomes et y être dégradés.

En résumé, les souris Hyal2^(-/-) pourraient contenir du HA de haut PM dans le tissu alvéolaire, ralentissant le processus qui mène à l'évolution vers la FP. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse.

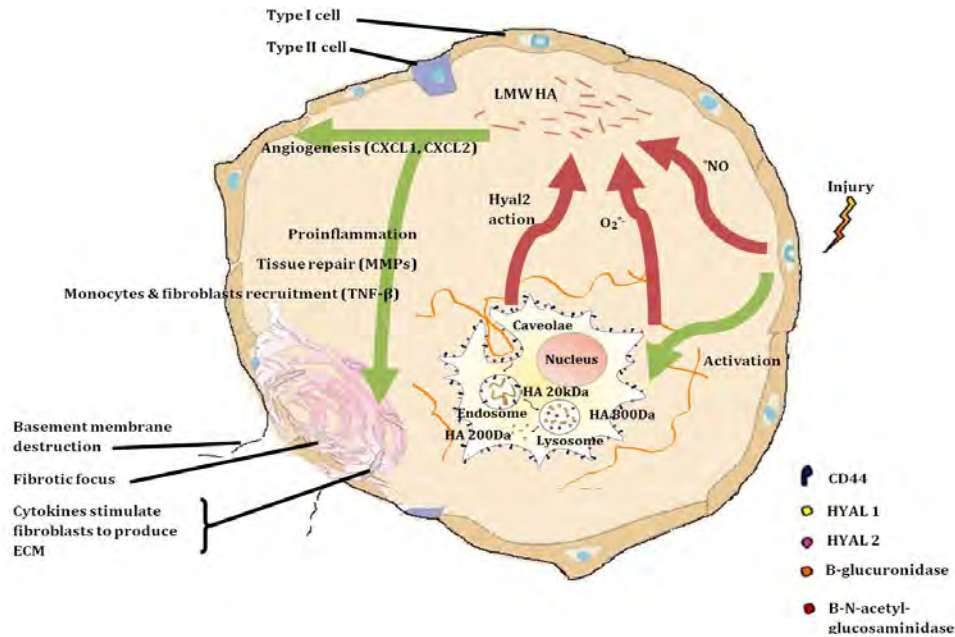
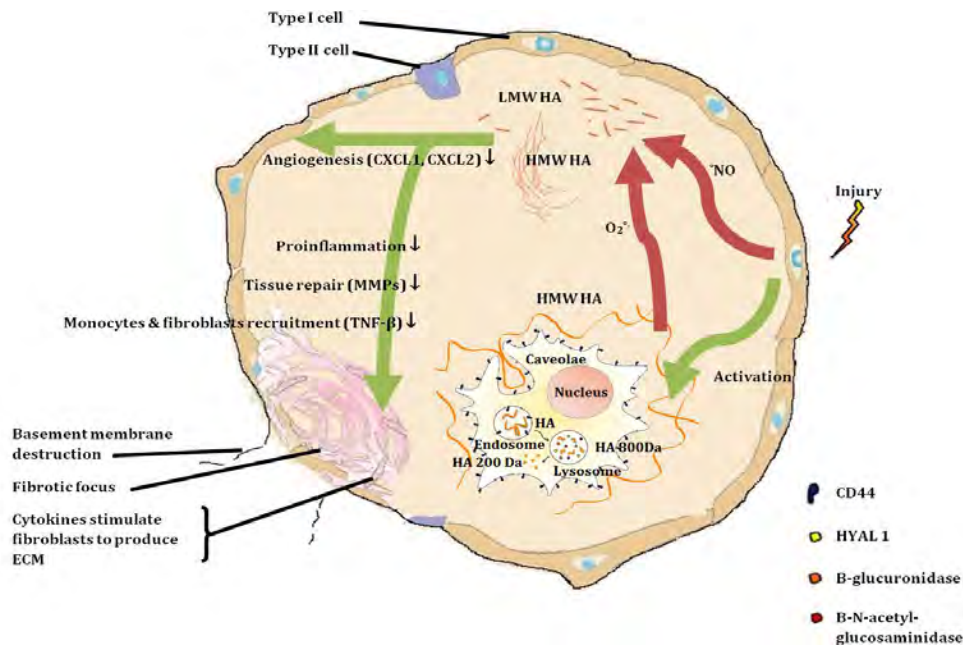
Hyal2^(+/-)**Hyal2^(-/-)**

Figure 44. Modèle d'action de Hyal2 dans le tissu alvéolaire. Chez les souris Hyal2^(+/-), les ROS et l'action de Hyal2 initient la dégradation extracellulaire de l'HA en fragments de faibles PM qui induisent l'angiogenèse, la proinflammation, la réparation tissulaire et le recrutement de monocytes et fibroblastes. Dans l'espace intracellulaire, Hyal2 initie la dégradation de l'HA en fragments de 20kDa. Ils sont, par la suite, dégradés dans les lysosomes par Hyal1 et les exoglycosidases β-glucuronidase et β-N-acetylglucosaminidase. L'internalisation de l'HA est induite par les récepteurs CD44. Chez les souris Hyal2^(-/-), les fragments d'HA de haut PM sont les plus abondants dans la matrice extracellulaire due à l'absence de l'action de Hyal2. Les fragments de haut PM peuvent contre-carrer les actions des fragments de faibles PM.

5. Conclusion

Le rôle d'Hyal2 a été investigué à l'aide d'un modèle murin de FP induite par instillation intratrachéale unique de bléomycine. En fin d'étude, nous pouvons conclure qu'au cours de la genèse d'une FP :

- La délétion du gène Hyal2 ne modifie pas l'histologie pulmonaire ;
- Les individus Hyal2 ^(-/-) présentent des dépôts de collagène plus importants en condition physiologique mais qui n'augmentent pas au cours de la pathologie, contrairement à ce qui se passe chez les souris Hyal2 ^(+/-) ;
- En conséquence, les individus Hyal2 ^(-/-) pourraient être dans une certaine mesure protégés contre la fibrose post-bléomycine (à confirmer par des expériences supplémentaires) ;
- Hyal2 n'influence pas le recrutement des cellules inflammatoires, toutefois ;
- Une éventuelle protection contre la fibrose lors de l'absence d'Hyal2 devrait donc avoir une autre cause qu'une diminution de l'infiltration de cellules inflammatoires ;
- Les individus KO produisent moins d'IL1- β ;
- Cependant, la phase inflammatoire chez les souris KO n'est pas régulée de manière importante par l'IL-1 β ;
- Hyal2 n'influence pas la localisation de l'HA ;
- Une déficience en Hyal2 provoque une tendance à l'augmentation de la quantité d'HA retrouvé dans le tissu et dans le BALF durant les deux premières semaines post-traitement ;
- La déficience en Hyal2 ne modifie aucunement la localisation de CD44 et RHAMM, récepteurs de l'HA ;
- La déficience en Hyal2 ne modifie pas la quantité de CD44 ;
- Il existe un effet médicamenteux systémique dans notre modèle murin ;
- L'endocytose en phase fluide, une fonction macrophagique, n'est ni dépendante du traitement, ni dépendante d'Hyal2 dans notre modèle.

Enfin, la variation de la quantité d'HA, au cours de la genèse d'une FP, ne semble pas trouver une réelle explication dans la variation de l'expression de ses enzymes de synthèse et/ou de dégradation. D'autres voies plus plausibles seraient l'altération des fonctions des récepteurs de l'HA (CD44, RHAMM, TLR2 et TLR4), la prolifération et l'activation variables des fibroblastes et l'altération du mécanisme de clairance du substrat. On postule, d'après la théorie, l'existence d'une quantité plus importante d'HA de haut PM dans le tissu alvéolaire chez les souris Hyal2 ^(-/-), ralentissant le processus inflammatoire durant

pathologie. Ainsi, le rôle d'Hyal2, si rôle il y a, devrait apparaître après l'investigation du PM de l'HA présent dans le milieu environnant le site d'agression.

RÉFÉRENCES

- Adamson, I. Y. (1976). "Pulmonary toxicity of bleomycin." *Environ Health Perspect* **16**: 119-126.
- Adamson, I. Y. and D. H. Bowden (1974). "The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." *Am J Pathol* **77**(2): 185-197.
- Adamson, I. Y. and D. H. Bowden (1974). "The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen." *Lab Invest* **30**(1): 35-42.
- Adolff, C. A., J. A. Golden, et al. (1990). "Reduction in pulmonary fibroblast-stimulating activity as an index of response to treatment of interstitial lung diseases." *N Engl J Med* **322**(26): 1890-1891.
- Andre, B., C. Duterme, et al. (2011). "Hyal2 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored, lipid raft-associated hyaluronidase." *Biochem Biophys Res Commun* **411**(1): 175-179.
- Andreutti, D., G. Gabbiani, et al. (1998). "Early granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by alveolar inflammatory cells during bleomycin-induced rat lung fibrosis." *Lab Invest* **78**(12): 1493-1502.
- Atmuri, V., D. C. Martin, et al. (2008). "Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation." *Matrix Biol* **27**(8): 653-660.
- ATS (2000). "American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS)." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(2 Pt 1): 646-664.
- Baughman, R. P., E. E. Lower, et al. (1999). "Overexpression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor-receptor in idiopathic pulmonary fibrosis." *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* **16**(1): 57-61.
- Becher, R., A. Bucht, et al. (2007). "Involvement of NADPH oxidase and iNOS in rodent pulmonary cytokine responses to urban air and mineral particles." *Inhal Toxicol* **19**(8): 645-655.
- Bourguignon, L. Y., P. A. Singleton, et al. (2004). "CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion." *J Biol Chem* **279**(26): 26991-27007.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bray, B. A. (2001). "The role of hyaluronan in the pulmonary alveolus." *J Theor Biol* **210**(1): 121-130.
- Bringardner, B. D., C. P. Baran, et al. (2008). "The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis." *Antioxid Redox Signal* **10**(2): 287-301.
- Burke, B. and C. E. Lewis (2002). *The macrophage*, Oxford University Press.
- Chanson, M., J. P. Derouette, et al. (2005). "Gap junctional communication in tissue inflammation and repair." *Biochim Biophys Acta* **1711**(2): 197-207.
- Chen, B. D., M. Mueller, et al. (1988). "Role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the regulation of murine alveolar macrophage proliferation and differentiation." *J Immunol* **141**(1): 139-144.
- Cherniack, R. M., R. G. Crystal, et al. (1991). "NHLBI Workshop summary. Current concepts in idiopathic pulmonary fibrosis: a road map for the future." *Am Rev Respir Dis* **143**(3): 680-683.
- Chow, G., C. B. Knudson, et al. (2006). "Expression and cellular localization of human hyaluronidase-2 in articular chondrocytes and cultured cell lines." *Osteoarthritis Cartilage* **14**(9): 849-858.
- Chua, F., J. Gauldie, et al. (2005). "Pulmonary fibrosis: searching for model answers." *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**(1): 9-13.
- Chua, F. and G. J. Laurent (2006). "Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation." *Proc Am Thorac Soc* **3**(5): 424-427.
- Colombaro, V. (2010). Analyse du phénotype rénal de souris knock-out pour Hyal1 ou pour Hyal2. *Physiologie*. Namur, FUNDP.

- Cook, D. N., D. M. Brass, et al. (2002). "A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(2): 122-124.
- Cordier, J. F., Y. Lasne, et al. (1983). "[Fibrotic interstitial pneumopathies. Collagenolytic activity of the alveolar fluid]." Presse Med **12**(21): 1345-1348.
- Cordier, J. F. and R. Loire (1991). "[Diffuse infiltrative lung diseases and fibrosis]." Rev Prat **41**(14): 1243-1246.
- Cottin (2002). Fibrogenèse pulmonaire. Évolution des concepts et données nouvelles. Revue des Maladies Respiratoires. **19**: 44-49.
- Crainie, M., A. R. Belch, et al. (1999). "Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants." Blood **93**(5): 1684-1696.
- Crystal, R. G., J. D. Fulmer, et al. (1976). "Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic, and biochemical aspects." Ann Intern Med **85**(6): 769-788.
- Crystal, R. G., J. E. Gadek, et al. (1981). "Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy." Am J Med **70**(3): 542-568.
- Csoka, A. B., G. I. Frost, et al. (2001). "The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes." Matrix Biol **20**(8): 499-508.
- Culty, M., H. A. Nguyen, et al. (1992). "The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan." J Cell Biol **116**(4): 1055-1062.
- David-Raoudi, M., F. Tranchepain, et al. (2008). "Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing." Wound Repair Regen **16**(2): 274-287.
- Davis, B. K., H. Wen, et al. (2011). "The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases." Annu Rev Immunol **29**: 707-735.
- de la Motte, C. A. (2011). "Hyaluronan in intestinal homeostasis and inflammation: implications for fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **301**(6): G945-949.
- DeAngelis, P. L. (1999). "Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses." Cell Mol Life Sci **56**(7-8): 670-682.
- Degryse, A. L., H. Tanjore, et al. (2010). "Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **299**(4): L442-452.
- Deng, J. C. and T. J. Standiford (2010). Growth Factors and Cytokines in Acute Lung Injury. Comprehensive Physiology, John Wiley & Sons, Inc.
- Di Paola, R., E. Talero, et al. (2011). "Adrenomedullin in inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis." Respir Res **12**(1): 41.
- Downey, G. P., Q. Dong, et al. (1999). "Regulation of neutrophil activation in acute lung injury." Chest **116**(1 Suppl): 46S-54S.
- Dreisin, R. B., M. I. Schwarz, et al. (1978). "Circulating immune complexes in the idiopathic interstitial pneumonias." N Engl J Med **298**(7): 353-357.
- Eggli, P. S. and W. Graber (1995). "Association of hyaluronan with rat vascular endothelial and smooth muscle cells." J Histochem Cytochem **43**(7): 689-697.
- Evanko, S. P., J. C. Angello, et al. (1999). "Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(4): 1004-1013.
- Evanko, S. P. and T. N. Wight (1999). "Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells." J Histochem Cytochem **47**(10): 1331-1342.
- Evans, M. J., L. J. Cabral, et al. (1975). "Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂." Exp Mol Pathol **22**(1): 142-150.
- Fahey, T. J., 3rd, B. Sherry, et al. (1990). "Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1." Cytokine **2**(2): 92-99.
- Ferrante, M. C., R. Meli, et al. (2002). "Effect of fumonisins B1 on structure and function of macrophage plasma membrane." Toxicol Lett **129**(3): 181-187.

- Fischer-Szafarz, B. (1984). "Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum." *Anal Biochem* **143**(1): 76-81.
- Garg, H. G., P. J. Roughley, et al. (2003). *Proteoglycans in lung disease*, M. Dekker.
- Gasingirwa, M. C., J. Thirion, et al. (2010). "Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver." *Biochem J* **430**(2): 305-313.
- Gasse, P., C. Mary, et al. (2007). "IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice." *J Clin Invest* **117**(12): 3786-3799.
- Gasse, P., N. Riteau, et al. (2009). "Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **179**(10): 903-913.
- Gelb, A. F., R. B. Dreisen, et al. (1983). "Immune complexes, gallium lung scans, and bronchoalveolar lavage in idiopathic interstitial pneumonitis-fibrosis." *Chest* **84**(2): 148-153.
- Genovese, T., S. Cuzzocrea, et al. (2005). "Inhibition or knock out of inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury." *Respir Res* **6**: 58.
- Goggins, J. F., G. S. Lazarus, et al. (1968). "Hyaluronidase activity of alveolar macrophages." *J Histochem Cytochem* **16**(11): 688-692.
- Goldstein, R. H. and A. Fine (1995). "Potential therapeutic initiatives for fibrogenic lung diseases." *Chest* **108**(3): 848-855.
- Goldstein, R. H., E. C. Lucey, et al. (1979). "Failure of mechanical properties to parallel changes in lung connective tissue composition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters." *Am Rev Respir Dis* **120**(1): 67-73.
- Gordon, S. (2007). "The macrophage: past, present and future." *Eur J Immunol* **37** Suppl 1: S9-17.
- Grande, N. R., M. N. D. Peao, et al. (1998). "Lung fibrosis induced by bleomycin: Structural changes and overview of recent advances." *Scanning Microsc* **12**(3): 487-494.
- Green, S. J., G. Tarone, et al. (1988). "Distribution of hyaluronate and hyaluronate receptors in the adult lung." *J Cell Sci* **90** (Pt 1): 145-156.
- Hall, C. L., B. Yang, et al. (1995). "Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation." *Cell* **82**(1): 19-26.
- Harada, H. and M. Takahashi (2007). "CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2." *J Biol Chem* **282**(8): 5597-5607.
- Hardwick, C., K. Hoare, et al. (1992). "Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility." *J Cell Biol* **117**(6): 1343-1350.
- Harrison, J. H., Jr. and J. S. Lazo (1987). "High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* **243**(3): 1185-1194.
- Hascall, V. C., A. K. Majors, et al. (2004). "Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?" *Biochim Biophys Acta* **1673**(1-2): 3-12.
- Heinegard, D. and V. C. Hascall (1974). "Aggregation of cartilage proteoglycans. 3. Characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregates." *J Biol Chem* **249**(13): 4250-4256.
- Heldin, P., E. Karousou, et al. (2008). "Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis." *Connect Tissue Res* **49**(3): 215-218.
- Heldin, P., T. C. Laurent, et al. (1989). "Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts." *Biochem J* **258**(3): 919-922.
- Hoquet-Bresciani, S. (2000). La fibrose pulmonaire interstitielle diffuse idiopathique (données actuelles). *Faculté de médecine*, Nancy, Université Henri Poincaré.
- Horton, M. R., M. A. Oltman, et al. (1999). "Hyaluronan fragments induce plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit urokinase activity in mouse alveolar macrophages: a potential mechanism for impaired fibrinolytic activity in acute lung injury." *Chest* **116**(1 Suppl): 17S.
- Horton, M. R., S. Shapiro, et al. (1999). "Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages." *J Immunol* **162**(7): 4171-4176.
- Hubner, R. H., W. Gitter, et al. (2008). "Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples." *Biotechniques* **44**(4): 507-511, 514-507.
- Hunninghake, G. W., J. E. Gadek, et al. (1981). "Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis." *J Clin Invest* **68**(1): 259-269.

- Hunt, T. K., D. R. Knighton, et al. (1984). "Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages." *Surgery* **96**(1): 48-54.
- Inghilleri, S., P. Morbini, et al. (2006). "In situ assessment of oxidant and nitrogenic stress in bleomycin pulmonary fibrosis." *Histochem Cell Biol* **125**(6): 661-669.
- Izbicki, G., M. J. Segel, et al. (2002). "Time course of bleomycin-induced lung fibrosis." *Int J Exp Pathol* **83**(3): 111-119.
- Jackson, D. G. (2004). The central role of lymphatics in HA degradation. *Hyaluronan today*, Glycoforum, www.glycoforum.gr.jp.
- Jadin, L. (2008). Generation and characterization of a HYAL2 deficient mouse. *Physiologie et Pharmacologie*. Namur, FUNDP.
- Janick-Buckner, D., G. E. Ranges, et al. (1989). "Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice." *Toxicol Appl Pharmacol* **100**(3): 465-473.
- Jiang, D., J. Liang, et al. (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." *Nat Med* **11**(11): 1173-1179.
- Jiang, D., J. Liang, et al. (2007). "Hyaluronan in tissue injury and repair." *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 435-461.
- Jiang, D., J. Liang, et al. (2011). "Hyaluronan as an immune regulator in human diseases." *Physiol Rev* **91**(1): 221-264.
- Joris, I. and P. W. Braunstein, Jr. (1982). "Platelets and endothelium: effect of collagen-induced platelet aggregates on pulmonary vessels." *Exp Mol Pathol* **37**(3): 393-405.
- Kakizaki, T., M. Kohno, et al. (2009). "Exacerbation of bleomycin-induced injury and fibrosis by pneumonectomy in the residual lung of mice." *J Surg Res* **154**(2): 336-344.
- Kim, D. S., H. R. Collard, et al. (2006). "Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias." *Proc Am Thorac Soc* **3**(4): 285-292.
- Kim, E., D. Baba, et al. (2005). "Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18028-18033.
- King, M. I. S. T. E. (2009). *Interstitial Lung Disease*, People's Medical Publishing House.
- Kopp, E. B. and R. Medzhitov (1999). "The Toll-receptor family and control of innate immunity." *Curr Opin Immunol* **11**(1): 13-18.
- Kovacs, E. J. and L. A. DiPietro (1994). "Fibrogenic cytokines and connective tissue production." *FASEB J* **8**(11): 854-861.
- Kruger, N. J. (1994). "The Bradford method for protein quantitation." *Methods Mol Biol* **32**: 9-15.
- Kumar, V., A. K. Abbas, et al. (2005). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Elsevier Saunders.
- Laskin, D. L., V. R. Sunil, et al. (2011). "Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **51**: 267-288.
- Laurent, T. C. and J. R. Fraser (1992). "Hyaluronan." *FASEB J* **6**(7): 2397-2404.
- Laurent, T. C., J. R. Fraser, et al. (1986). "Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells." *Biochem J* **234**(3): 653-658.
- Lawrence, E. C., R. R. Martin, et al. (1980). "Increased bronchoalveolar IgG-secreting cells in interstitial lung diseases." *N Engl J Med* **302**(21): 1186-1188.
- Leavell, K. J., M. W. Peterson, et al. (1996). "The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung." *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**(1): 53-60.
- Lebel, L., L. Smith, et al. (1988). "Effect of increased hydrostatic pressure on lymphatic elimination of hyaluronan from sheep lung." *J Appl Physiol* **64**(4): 1327-1332.
- Lepperdinger, G., B. Strobl, et al. (1998). "HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity." *J Biol Chem* **273**(35): 22466-22470.
- Lesley, J., R. Hyman, et al. (1997). "CD44 in inflammation and metastasis." *Glycoconj J* **14**(5): 611-622.
- Li, Y., M. Rahmanian, et al. (2000). "Irradiation-induced expression of hyaluronan (HA) synthase 2 and hyaluronidase 2 genes in rat lung tissue accompanies active turnover of HA and

- induction of types I and III collagen gene expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(3): 411-418.
- Lim, X., D. M. Bless, et al. (2008). "Changes in cytokine signaling and extracellular matrix production induced by inflammatory factors in cultured vocal fold fibroblasts." *Ann Otol Rhinol Laryngol* **117**(3): 227-238.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lympny, P. A. and R. M. du Bois (1997). "Diffuse lung disease: product of genetic susceptibility and environmental encounters." *Thorax* **52**(1): 92-94.
- Lynch, J. P. (2004). *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*, Marcel Dekker.
- Manoury, B., S. Nenan, et al. (2007). "Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis." *Int Immunopharmacol* **7**(7): 900-911.
- Meyer, K. and M. M. Rapport (1952). "Hyaluronidases." *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **13**: 199-236.
- Moeller, A., K. Ask, et al. (2008). "The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?" *Int J Biochem Cell Biol* **40**(3): 362-382.
- Monzon, M. E., D. Manzanares, et al. (2008). "Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**(3): 289-295.
- Moore, B. B. and C. M. Hogaboam (2008). "Murine models of pulmonary fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(2): L152-160.
- Moseley, P. L., C. Hemken, et al. (1986). "Augmentation of fibroblast proliferation by bleomycin." *J Clin Invest* **78**(5): 1150-1154.
- Muggia, F. M., A. C. Louie, et al. (1983). "Pulmonary toxicity of antitumor agents." *Cancer Treat Rev* **10**(4): 221-243.
- Necas, J., L. Bartosikava, et al. (2008). "Hyaluronic acid (hyaluronan): a review." *Veterinari Medicina* **53**(8): 397-311.
- Nettelbladt, O., A. Tengblad, et al. (1989). "Lung accumulation of hyaluronan parallels pulmonary edema in experimental alveolitis." *Am J Physiol* **257**(6 Pt 1): L379-384.
- Noble, L. J., J. E. Kalinyak, et al. (1994). "Fluid-phase endocytosis of horseradish peroxidase by cerebral endothelial cells in primary culture: characterization and kinetic analysis." *J Neurosci Res* **38**(6): 654-663.
- Noble, P. W., C. M. McKee, et al. (1996). "Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages." *J Exp Med* **183**(5): 2373-2378.
- Nowak, N. M., O. M. Fischer, et al. (2008). "Intraperitoneal inflammation decreases endometriosis in a mouse model." *Hum Reprod* **23**(11): 2466-2474.
- O'Neill, L. A. (2005). "TLRs play good cop, bad cop in the lung." *Nat Med* **11**(11): 1161-1162.
- Ober, W. C., D. U. Silverthorn, et al. (2007). *Physiologie humaine: Une approche intégrée*, Pearson Education.
- Okuma, T., Y. Terasaki, et al. (2004). "C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases." *J Pathol* **204**(5): 594-604.
- Ormiston, M. L., G. R. Slaughter, et al. (2010). "The enzymatic degradation of hyaluronan is associated with disease progression in experimental pulmonary hypertension." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**(2): L148-157.
- Ouskova, G., B. Spellerberg, et al. (2004). "Hyaluronan release from Streptococcus pyogenes: export by an ABC transporter." *Glycobiology* **14**(10): 931-938.
- Paech, C., T. Christianson, et al. (1993). "Zymogram of Proteases Made with Developed Film from Nondenaturing Polyacrylamide Gels after Electrophoresis." *Analytical Biochemistry* **208**(2): 249-254.
- Patel, S., P. R. Turner, et al. (2002). "Hyaluronidase gene profiling and role of hyal-1 overexpression in an orthotopic model of prostate cancer." *Int J Cancer* **97**(4): 416-424.

- Phan, S. H., G. Armstrong, et al. (1983). "A comparative study of pulmonary fibrosis induced by bleomycin and an O₂ metabolite producing enzyme system." *Chest* **83**(5 Suppl): 44S-45S.
- Pinart G., M. (2006). Time course of biochemical, biomechanical and histological changes for the assessment of inflammation and remodelling in a bleomycin-induced murine model of lung injury. *Department of physiological sciences 1*. Barcelona, Universitat de Barcelona.
- Pinart, M., A. Serrano-Mollar, et al. (2009). "Single and repeated bleomycin intratracheal instillations lead to different biomechanical changes in lung tissue." *Respir Physiol Neurobiol* **166**(1): 41-46.
- Prehm, P. (1989). "Identification and regulation of the eukaryotic hyaluronate synthase." *Ciba Found Symp* **143**: 21-30; discussion 30-40, 281-285.
- Pulichino, A. M., I. M. Wang, et al. (2008). "Identification of transforming growth factor beta1-driven genetic programs of acute lung fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**(3): 324-336.
- Rai, S. K., F. M. Duh, et al. (2001). "Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4443-4448.
- Rankin, J. A. (1989). "The contribution of alveolar macrophages to hyperreactive airway disease." *J Allergy Clin Immunol* **83**(4): 722-729.
- Razzaque, M. S. and T. Taguchi (2003). "Pulmonary fibrosis: cellular and molecular events." *Pathol Int* **53**(3): 133-145.
- Redente, E. F., K. M. Jacobsen, et al. (2011). "Age and Gender Dimorphisms Contribute to the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Reichel, C. A., M. Rehberg, et al. (2008). "Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling." *J Leukoc Biol* **83**(4): 864-874.
- Rennard, S. I., G. W. Hunninghake, et al. (1981). "Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11): 7147-7151.
- Reynolds, H. Y. (1987). "Bronchoalveolar lavage." *Am Rev Respir Dis* **135**(1): 250-263.
- Rilla, K., R. Tiihonen, et al. (2008). "Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions." *J Histochem Cytochem* **56**(10): 901-910.
- Ross, R. and G. Odland (1968). "Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis." *J Cell Biol* **39**(1): 152-168.
- Savani, R. C., G. Hou, et al. (2000). "A role for hyaluronan in macrophage accumulation and collagen deposition after bleomycin-induced lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(4): 475-484.
- Schrier, D. J., R. G. Kunkel, et al. (1983). "The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Am Rev Respir Dis* **127**(1): 63-66.
- Smith, R. E., R. M. Strieter, et al. (1994). "Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury." *J Immunol* **153**(10): 4704-4712.
- Soltes, L., R. Mendichi, et al. (2006). "Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan." *Biomacromolecules* **7**(3): 659-668.
- Spicer, A. P. and J. A. McDonald (1998). Eukaryotic hyaluronan synthases. *Hyaluronan today, Glycoforum*, www.glycoforum.gr.jp.
- Starcher, B. C., C. Kuhn, et al. (1978). "Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin." *Am Rev Respir Dis* **117**(2): 299-305.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1972). "The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro." *J Cell Biol* **55**(1): 186-204.
- Stern, R. (2003). "Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?" *Glycobiology* **13**(12): 105R-115R.
- Stern, R. (2004). "Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway." *Eur J Cell Biol* **83**(7): 317-325.

- Stern, R. (2004). Update on the mammalian hyaluronidases. Hyaluronan today, Glycoforum, www.glycoforum.gr.jp.
- Stern, R., A. A. Asari, et al. (2006). "Hyaluronan fragments: an information-rich system." Eur J Cell Biol **85**(8): 699-715.
- Stern, R. and A. B. Csoka (2000). Mammalian hyaluronidases. Hyaluronan today, Glycoforum, www.glycoforum.gr.jp.
- Stern, R., G. Kogan, et al. (2007). "The many ways to cleave hyaluronan." Biotechnol Adv **25**(6): 537-557.
- Strieter, R. M. and B. Mehrad (2009). "New mechanisms of pulmonary fibrosis." Chest **136**(5): 1364-1370.
- Suzuki, T., C. W. Chow, et al. (2008). "Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology." Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1348-1361.
- Swaney, J. S., C. Chapman, et al. (2010). "A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model." Br J Pharmacol **160**(7): 1699-1713.
- Systems, R. D. (2011). "Surveyor™ IC ELISA Assay Principle." Retrieved 25/11/11, 2011.
- Tammi, R., K. Rilla, et al. (2001). "Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism." J Biol Chem **276**(37): 35111-35122.
- Tammi, R. H., A. G. Passi, et al. (2011). "Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis." FEBS J **278**(9): 1419-1428.
- Taylor, K. R., J. M. Trowbridge, et al. (2004). "Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4." J Biol Chem **279**(17): 17079-17084.
- Taylor, M. L., P. W. Noble, et al. (2000). "Extensive surface phenotyping of alveolar macrophages in interstitial lung disease." Clin Immunol **94**(1): 33-41.
- Teder, P., J. Bergh, et al. (1995). "Functional hyaluronan receptors are expressed on a squamous cell lung carcinoma cell line but not on other lung carcinoma cell lines." Cancer Res **55**(17): 3908-3914.
- Teder, P. and P. Heldin (1997). "Mechanism of impaired local hyaluronan turnover in bleomycin-induced lung injury in rat." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(3): 376-385.
- Teder, P., O. Nettelbladt, et al. (1995). "Characterization of the mechanism involved in bleomycin-induced increased hyaluronan production in rat lung." Am J Respir Cell Mol Biol **12**(2): 181-189.
- Teder, P., R. W. Vandivier, et al. (2002). "Resolution of lung inflammation by CD44." Science **296**(5565): 155-158.
- Termeer, C., F. Benedix, et al. (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." J Exp Med **195**(1): 99-111.
- Thomas, E. D., R. E. Ramberg, et al. (1976). "Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man." Science **192**(4243): 1016-1018.
- Thrall, R. S., J. R. McCormick, et al. (1979). "Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin." Am J Pathol **95**(1): 117-130.
- Tien, J. Y. and A. P. Spicer (2005). "Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns." Dev Dyn **233**(1): 130-141.
- Tlapak-Simmons, V. L., E. S. Kempner, et al. (1998). "The active streptococcal hyaluronan synthases (HASs) contain a single HAS monomer and multiple cardiolipin molecules." J Biol Chem **273**(40): 26100-26109.
- Tomimori, Y., T. Muto, et al. (2003). "Involvement of mast cell chymase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." Eur J Pharmacol **478**(2-3): 179-185.
- Uchiyama, H., Y. Dobashi, et al. (1990). "Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid." J Biol Chem **265**(14): 7753-7759.
- Uh, S. T., Y. Inoue, et al. (1998). "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**(5 Pt 1): 1626-1635.
- Umezawa, H., M. Ishizuka, et al. (1967). "Studies on bleomycin." Cancer **20**(5): 891-895.

- Underhill, C. B., H. A. Nguyen, et al. (1993). "CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development." *Dev Biol* **155**(2): 324-336.
- Usuki, J. and Y. Fukuda (1995). "Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats." *Pathol Int* **45**(8): 552-564.
- Vaillant, P. and Y. Martinet (1991). "[Mechanisms of pulmonary fibrosis]." *Rev Prat* **41**(19): 1812-1820.
- van der Velden, V. H., A. Hochhaus, et al. (2003). "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects." *Leukemia* **17**(6): 1013-1034.
- Vigdorovich, V., A. D. Miller, et al. (2007). "Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus." *J Virol* **81**(7): 3124-3129.
- Vigdorovich, V., R. K. Strong, et al. (2005). "Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2." *J Virol* **79**(1): 79-86.
- Weigel, P. (1998). Bacterial hyaluronan synthases. *today, Glycoforum*, www.glycoforum.gr.jp.
- Weigel, P. (2004). Bacterial hyaluronan synthases - an update. *Hyaluronan today, Glycoforum*, www.glycoforum.gr.jp.
- Williams, M. C. (2003). "Alveolar type I cells: molecular phenotype and development." *Annu Rev Physiol* **65**: 669-695.
- Wilson, M. S., S. K. Madala, et al. (2010). "Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent." *J Exp Med* **207**(3): 535-552.
- Wilson, M. S. and T. A. Wynn (2009). "Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation." *Mucosal Immunol* **2**(2): 103-121.
- Wright, H. L., R. J. Moots, et al. (2010). "Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases." *Rheumatology (Oxford)* **49**(9): 1618-1631.
- Wynn, T. A. (2007). "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases." *J Clin Invest* **117**(3): 524-529.
- Wynn, T. A. (2011). "Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis." *J Exp Med* **208**(7): 1339-1350.
- Yamasaki, K., J. Muto, et al. (2009). "NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury." *J Biol Chem* **284**(19): 12762-12771.
- Zaman, A., Z. Cui, et al. (2005). "Expression and role of the hyaluronan receptor RHAMM in inflammation after bleomycin injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**(5): 447-454.
- Zelko, I. N. and R. J. Folz (2010). "Extracellular superoxide dismutase attenuates release of pulmonary hyaluronan from the extracellular matrix following bleomycin exposure." *FEBS Lett* **584**(13): 2947-2952.
- Zhang, X., R. Goncalves, et al. (2008). "The isolation and characterization of murine macrophages." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**: Unit 14 11.
- Zhao, H. W., C. J. Lu, et al. (1999). "An increase in hyaluronan by lung fibroblasts: a biomarker for intensity and activity of interstitial pulmonary fibrosis?" *Respirology* **4**(2): 131-138.

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite. Un plein effort est une pleine victoire. »

Ghandi