

UNIVERSITE PARIS 13 - ECOLE DOCTORALE GALILEE

« UFR SANTE MEDECINE BIOLOGIE HUMAINE »

N° Attribué par la bibliothèque

THESE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Yurdagül UZUNHAN

**« EFFET DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES SUR LES ALTERATIONS
EPITHELIALES ALVEOLAIRES INDUITES PAR L'HYPOXIE »**

Directeur de Thèse :

Pr Carole Planès

JURY

Pr Dominique Valeyre, Président

Dr Christelle Coraux, Rapporteur

Pr Jorge Boczkowski, Rapporteur

Pr Jean-Francois Bernaudin, Examineur

Pr Nathalie Charnaux, Examineur

Pr Carole Planès, Directeur

REMERCIEMENTS

« Un matin, au sortir d'un rêve agité, Gregor Samsa s'éveilla transformé dans son lit en une véritable vermine. » C'est ainsi que commence l'œuvre de Franz Kafka, *La Métamorphose*. Une ambiance très particulière règne dans ce roman autour de cette intrigue qui prend une dimension assez indescriptible et qui laisse le lecteur perplexe et plein de questions.

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) de l'adulte créent dans une certaine mesure une atmosphère comparable pour les patients, les médecins et les chercheurs, avec encore beaucoup d'interrogations. Ces pathologies du poumon profond reposent sur des phénomènes cellulaires dans lesquels la cellule épithéliale alvéolaire (CEA) est un des « personnages principaux ». L'hypoxie alvéolaire observée dans ces phénomènes pourrait être non seulement la conséquence mais aussi la cause de certaines étapes de la pathogénie de ces affections. L'absence de traitement efficace dans chacune de ces affections appelle des thérapies innovantes et la thérapie cellulaire à base de cellules souches mésenchymateuses (CSM) allogéniques constitue dans ce contexte une approche particulièrement séduisante, du fait des résultats très prometteurs obtenus dans divers modèles animaux d'agressions alvéolaires aiguës ou fibrosantes. Néanmoins, une meilleure connaissance des mécanismes d'action des CSM dans ces pathologies est nécessaire pour optimiser leur utilisation thérapeutique chez les patients. En particulier, le rôle potentiel des CSM vis-à-vis des CEA « agressées » n'a été que très peu documenté, malgré le rôle pivot joué par les CEA au cours du SDRA et de la FPI.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif général de caractériser *in vitro* les effets paracrines des cellules souches mésenchymateuses sur les CEA soumises à l'hypoxie, d'une part dans un modèle d'agression aiguë des CEA exposées à un environnement inflammatoire et hypoxique mimant le milieu alvéolaire du SDRA, et d'autre part dans un modèle d'hypoxie chronique conduisant à des phénomènes de transformation épithélio-mésenchymateuse comme décrits au cours de la FPI. Dans ces deux modèles, nous avons cherché à comprendre le rôle de l'hypoxie et surtout l'effet bénéfique des cellules souches mésenchymateuses dans cette ou ces « métamorphoses »...

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	3
RÉSUMÉ	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	12
I. LES GRANDES FONCTIONS DES CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES	12
Les cellules épithéliales alvéolaires	13
La fonction de barrière épithéliale	14
Homéostasie liquidienne des alvéoles pulmonaires	16
Schéma général des transports d'ions et d'eau par l'épithélium alvéolaire	16
Le canal ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires.....	18
Production de surfactant	20
Réparation de l'épithélium	21
II. IMPLICATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES DANS LES PATHOLOGIES DU POUMON PROFOND	23
A. La fibrose pulmonaire	23
La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)- éléments cliniques	24
Diagnostic de la FPI et données épidémiologiques	24
Histoire Naturelle de la maladie.....	26
Histologie de la fibrose pulmonaire	27
Généralités sur la Physiopathologie de la fibrose pulmonaire	29
Le TGFβ.....	32
Altérations des CEA au cours de la FPI	33
Rôle des CEA dans l'activation locale des fibroblastes.....	33
Rôle des CEA dans le recrutement des fibrocytes.....	35
Hyperplasie des CEA.....	37
Le stress du réticulum endoplasmique	37
Apoptose des CEA	38

Transition epithelio-mesenchymateuse (TEM)	40
Les critères de TEM	43
Les différents types de TEM (1, 2, 3)	44
Au cours du développement (TEM de type 1 et de type 2)	44
Dans les tissus adultes (TEM de type 2 et de type 3)	45
Les modulateurs de la TEM et les voies de signalisation	46
Les voies de signalisation impliquées	46
La voie de signalisation Wnt/ β -caténine	46
Les facteurs de transcription SNAI, ZEB et TWIST	46
Les inducteurs de TEM	48
Les répresseurs de TEM	51
CEA et facteurs génétiques et épigénétiques	52
Traitement de la FPI	55
B. Le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte	58
Diagnostic et données épidémiologiques du SDRA	58
Facteurs de risque du SDRA	59
Pronostic du SDRA	60
Histologie et Physiopathologie du SDRA	61
Barrière endothéliale	64
Barrière épithéliale	65
Lésions épithéliales	65
Altération de la clairance alvéolaire	65
Traitement du SDRA	66
Techniques ventilatoires	67
Les Médicaments évalués au cours du SDRA	68
Les corticoïdes	68
Les autres molécules	68

III. HYPOXIE ET CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES	70
Les Réponses Cellulaires à l’Hypoxie –rôle de HIF.....	70
Définitions	70
La signalisation hypoxique	71
Les facteurs HIF	71
Activation et regulation de HIF	74
Les dérivés réactifs de l’oxygène (ROS) mitochondriaux	76
Hypoxie et cellules épithéliales alvéolaires	78
Hypoxie et homéostasie liquidienne des alvéoles	78
Hypoxie et Fibrose pulmonaire	80
Hypoxie et apoptose des CEA.....	80
Hypoxie et libération de médiateurs profibrosants	81
Hypoxie et TEM	81
IV. INTERET POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES EXOGENES DANS LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES DU POUMON PROFOND	83
Les Cellules souches- Généralités	83
Les cellules souches mésenchymateuses.....	83
Définition-Propriétés.....	83
CSM et pathologies pulmonaires	84
Thérapie cellulaire au cours du SDRA.....	85
CSM et fibrose pulmonaire	88
OBJECTIFS GENERAUX DU TRAVAIL DE THESE	91
TRAVAIL EXPERIMENTAL	92
I. EFFET DES CSM SUR LES ALTERATIONS DU TRANSPORT TRANSEPITHELIAL ALVEOLAIRE D’IONS INDUITES PAR L’HYPOXIE ET L’INFLAMMATION	92
A. Hypothèse de travail et Objectifs.....	92
B. Résumé des méthodes et des résultats.....	105
Schéma de l’étude.....	105
Résumé des résultats	106

C. Discussion.....	107
Critique du modele utilise	107
Influence de l'environnement hypoxique et inflammatoire sur les CSM.....	108
Influence de l'environnement hypoxique et inflammatoire sur les propriétés de transport de sodium des CEA	110
Conclusion	112
II. EFFET DES CSM SUR LES ALTERATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR L'HYPOXIE CHRONIQUE.....	114
A. Hypothèse de travail et Objectifs.....	114
B. Résumé des méthodes et des résultats	148
Schéma de l'étude.....	148
Résumé des résultats	149
C. Discussion.....	150
Critique et limites du modèle utilisé	150
Influence de l'hypoxie chronique sur le phenotype des cea	152
perte du phenotype epithelial en hypoxie	152
Transformation mésenchymateuse en hypoxie	154
Rôle protecteur des CSM dans un modèle de co-culture	155
Les CSM freinent les altérations épithéliales induites par l'hypoxie.....	155
Les mécanismes impliqués.....	156
Implication des facteurs de transcription de la TEM.....	156
Implication du TGF	157
Implication de la voie de signalisation hypoxique HIF	158
Autres voies potentiellement impliquées	159
Rôle paracrine des CSM	161
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	163
RÉFÉRENCES	166
ANNEXES.....	197

RÉSUMÉ

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) de l'adulte constituent des affections sévères et létales du poumon profond associées à une hypoxie alvéolaire, pour lesquelles les ressources thérapeutiques sont limitées. La thérapie cellulaire utilisant des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) est actuellement envisagée dans ces pathologies, mais les mécanismes d'action des CSMh restent à élucider. Nous avons testé *in vitro* l'hypothèse selon laquelle les CSMh pourraient exercer un effet cytoprotecteur paracrine sur les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) soumises à l'hypoxie.

Dans une première étude, nous avons montré que l'exposition aiguë de CSMh dérivées de moelle osseuse à un environnement inflammatoire (traitement par *cytomix* constitué de TNF α , d'Interféron γ et d'Interleukine 1 β) et hypoxique (3% O $_2$) mimant le microenvironnement alvéolaire du SDRA ne modifiait pas le phénotype ou la viabilité des cellules mais induisait des modifications de leur secretome, notamment de facteurs connus pour réguler le transport trans-épithélial alvéolaire de sodium (Na) et la réabsorption de l'œdème alvéolaire : IL1-ra, PGE2 et KGF. Le milieu de culture des CSMh (MC-CSMh), qu'il soit obtenu en normoxie ou en hypoxie-*cytomix*, prévenait l'augmentation de la perméabilité épithéliale des CEA primaires de rat cultivées sur support semi-perméable et exposées à l'hypoxie et au *cytomix*. Le MC-CSMh provenant de CSMh cultivées en normoxie prévenait l'inhibition du transport transépithélial alvéolaire de Na en restaurant l'expression à la surface de la sous-unité α du canal sodique épithélial ENaC, tandis que le MC-CSMh obtenu sous hypoxie-*cytomix* n'avait pas d'effet protecteur. La sécrétion de Keratinocyte Growth Factor (KGF) par les CSMh était indispensable à leur effet protecteur.

Dans une seconde étude, nous avons montré qu'une exposition prolongée à l'hypoxie telle que rencontrée au cours de la FPI induisait des modifications phénotypiques des CEA de rat évocatrices de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) avec perte progressive d'expression des marqueurs épithéliaux (TTF1, AQP5, ZO-1 et E-Cadhérine) couplée à l'apparition tardive de marqueurs mésenchymateux (α -SMA et Vimentine). Ces modifications phénotypiques s'accompagnaient de l'expression à la phase initiale de l'hypoxie de facteurs de transcription impliqués dans la TEM (SNAI1, TWIST1 et ZEB1) ou induits par l'hypoxie (HIF-1 α et HIF-2 α), et de protéines induisant la TEM (TGF β 1 et CTGF). La co-culture des CEA avec des CSMh en fond de puits prévenait les modifications phénotypiques induites par l'hypoxie ainsi que l'expression des facteurs pro-TEM TWIST1, ZEB1, TGF β 1 et CTGF. Là encore, le KGF était au moins en partie responsable des effets protecteurs des CSMh.

Ces deux études indiquent que les CSMh sont susceptibles d'exercer des effets cytoprotecteurs paracrines vis-à-vis des CEA soumises à l'hypoxie aiguë ou prolongée, en limitant d'une part les effets délétères de l'hypoxie sur les propriétés de transport vectoriel de Na et en prévenant d'autre part les modifications phénotypiques évocatrices de TEM. La sécrétion par les CSMh de KGF, facteur de croissance épithélial bien connu pour ses effets bénéfiques sur les CEA, explique en partie les effets protecteurs paracrines des CSMh. Nos résultats suggèrent que les effets cytoprotecteurs des CSMh vis-à-vis des CEA pourraient contribuer aux effets bénéfiques des CSMh observés *in vivo* dans différents modèles animaux d'agressions alvéolaires aiguës ou à tendance fibrosante.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALI: acute lung injury

AQP: aquaporine

ATP: adenosine triphosphate

BMP: bone morphogenetic protein

CAP: channel-activating proteases

CD: cluster de différenciation

CEA: cellule épithéliale alvéolaire

CFTR: cystic fibrosis trans membrane conductance regulator channel

CNG: cyclic nucleotide-gated

CSM: cellules souches mésenchymateuses

CTGF: connective tissue growth factor

CCL : chemokine (CC motif) ligand

CXCL: chemokine (CXC motif) ligand

CXCR: chemokine (CXC motif) receptor

DV: décubitus ventral

EGF: epidermal growth factor

ENaC: epithelial sodium channel

FGF: fibroblast growth factor

FIH: facteur inhibiteur de HIF

FPI: fibrose pulmonaire idiopathique

GTP: guanosine triphosphate

GTPase: guanosine triphosphate hydroxylase

HGF: hepatocyte growth factor

HIF: hypoxia inducible factor

HRE: hypoxia response element

HSP: heat shock protein

Hx: hypoxie

ICAM : molécule d'adhésion intercellulaire

IFN: interferon

IGF: insulin-like growth factor

IL: interleukine

KGF: keratinocyte growth factor = FGF7

LOX: lysyls oxydases

MC-CSM: milieu de culture conditionné de cellules souches mésenchymateuses

MEC : matrice extra-cellulaire

MMP: métalloprotéinase

MUC: Mucine

Na,K-ATPase : sodium-potassium adenosine triphosphatase

NAC : N-acetylcysteine

NO : monoxyde d'azote

NOS : NO-synthase

PAI : plasminogen activator inhibitor

PAR-1: proteinase activated receptor-1

PDGF: platelet derived growth factor

PEEP: positive end-expiratory pressure

PGE2 : prostaglandine E2

PHD : prolyl hydroxylase domain

PIC: pneumopathie interstitielle commune

PID: pneumopathie interstitielle diffuse

PII : pneumopathie interstitielle idiopathique

PKA : protéine kinase A (PKA)

pVHL : protéine de von-Hippel-Lindau

RAGE: receptor for advanced glycation end product

RE: réticulum endoplasmique

ROS: espèces réactives de l'oxygène

SDF: stromal-derived factor

SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigue

SGK-1: serum and glucocorticoid Induced kinase 1

Shh: Sonic Hedgehog

SMA: smooth muscle actin

SOD: super oxyde dismutase

SP: apoprotéine du surfactant

TEM: transition épithélio-mésenchymateuse

TERC : TElomerase RNA Component

TERT : TElomerase Reverse Transcriptase

TGF: transforming growth factor

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase

TNF: tumor necrosis factor

TTF-1: thyroid-transcription factor-1

VEGF: vascular endothelial growth factor

Vt : volume courant (tidal volume)

ZO-1: zonula occludens-1

INTRODUCTION

I. LES GRANDES FONCTIONS DES CELLULES EPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES

Le rôle essentiel du poumon est d'assurer les échanges gazeux entre l'air et l'organisme. La respiration normale intègre deux composantes majeures, la ventilation à travers les voies de conduction (de la trachée aux bronchioles) et la diffusion des gaz dans le parenchyme pulmonaire, au sein de l'unité alvéolo-capillaire [Figure 1], dont l'intégrité est mise à mal dans les pathologies du poumon profond.

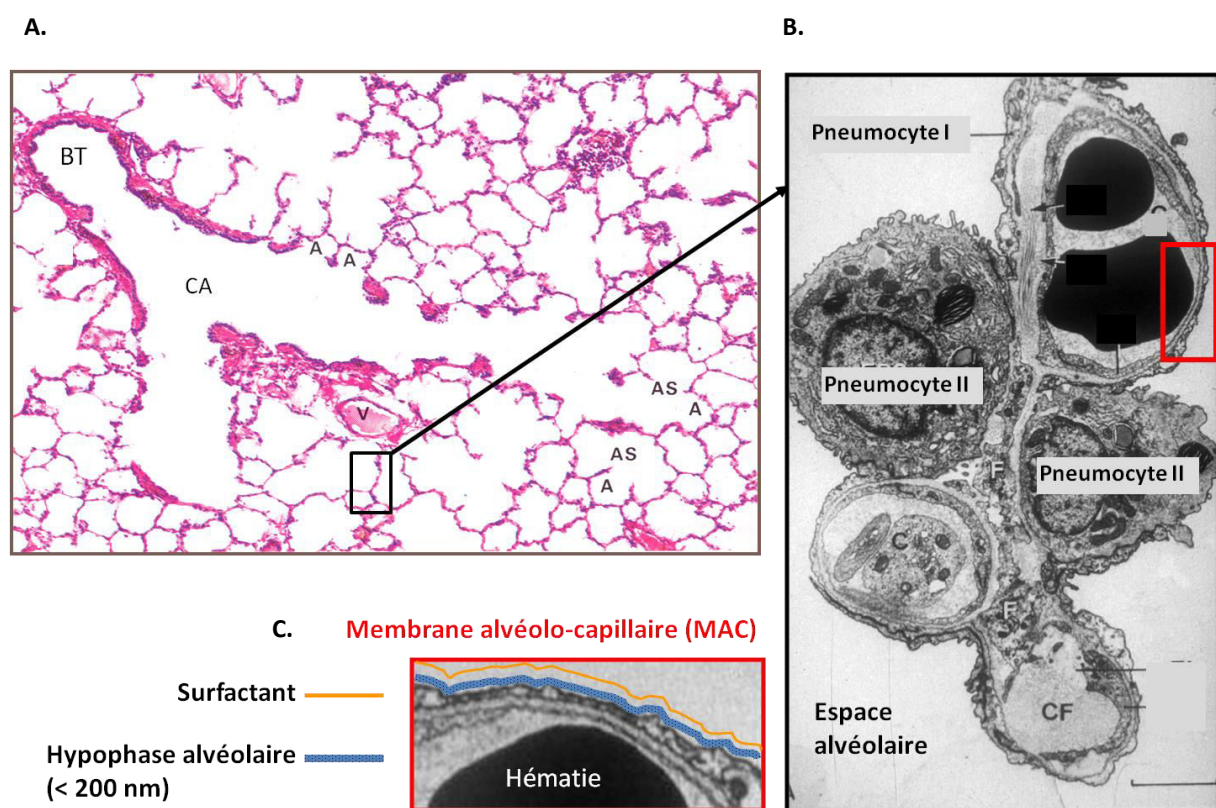


Figure 1 : La structure alvéolo-capillaire (modifié d'après (Weibel 1997)). **A.** Histologie du poumon profond en microscopie optique (coloration hématine éosine, x 90). **B.** Microscopie électronique à transmission d'une cloison alvéolaire (aimablement fournie par le Pr P. Soler). **C.** Détail de la membrane alvéolo-capillaire. Abréviations : A alvéole, AS sac alvéolaire, CA canal alvéolaire, BT bronchiole terminale, V veinule.

LES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES

L'épithélium alvéolaire est constitué par les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) en monocouche, les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II avec une proportion respective d'un tiers et deux tiers.

Les pneumocytes de type I sont des cellules larges et très aplaties (0,1 à 0,2 μm) reposant sur une membrane basale partagée au niveau de la barrière air-sang par les cellules endothéliales capillaires. Ces pneumocytes I sont impliqués non seulement dans l'échange des gaz, mais aussi dans le maintien du fluide de surface alvéolaire (hypophase) grâce à l'expression de canaux sodiques ENaC (Epithelial Na^+ Channel) et d'une sodium-potassium adénosine triphosphatase (Na/K ATPase) (Johnson, Widdicombe et al. 2002). Bien qu'ils ne représentent que 8% des cellules d'un poumon normal adulte, les pneumocytes I couvrent environ 95% de la surface épithéliale alvéolaire (Crapo, Barry et al. 1982). Ils sont caractérisés par l'expression de marqueurs « spécifiques » tels que l'aquaporine 5 (AQP5), la protéine T1alpha ou encore la cavéoline 1 (Herzog, Brody et al. 2008). L'AQP5 est une protéine trans-membranaire de 27-34 KDa présente à la surface apicale de la cellule. Son expression peut être modulée par l'hyperoxie ou les solutions hypertoniques tandis que le keratinocyte growth factor (KGF) entraîne une baisse d'expression. La délétion du gène de l'AQP5 n'a pas de conséquence sur l'hématose dans un modèle murin (Ma, Fukuda et al. 2000). En revanche, la souris invalidée pour le gène codant pour la protéine T1-alpha, autre marqueur caractéristique de ces cellules (Chen, Chen et al. 2004), n'est pas viable et meurt d'asphyxie à la naissance (Herzog, Brody et al. 2008). Enfin, les pneumocytes I contiennent la cavéoline 1 (Maniatis, Chernaya et al. 2012), protéine transmembranaire participant à la constitution des cavéoles, microvésicules de 50-100 nm. Elle intervient dans l'inactivation et la séquestration de récepteurs dans des sous-compartiments de la membrane cellulaire et joue ainsi un rôle important dans les transports intra-cellulaires et les échanges inter-cellulaires (Liu, Rudick et al. 2002; Cohen, Hnasko et al. 2004).

Les pneumocytes de type II, cellules cuboïdes, sont plus nombreuses et constituent 15% de l'ensemble des cellules du poumon, mais ne couvrent que 5% de la surface de l'épithélium alvéolaire (Crapo, Barry et al. 1982). Les propriétés de ces cellules sont nombreuses avec un

rôle dans la défense immunitaire innée à travers les apoprotéines du surfactant du type collectines, un rôle dans l'homéostasie du fluide alvéolaire ainsi qu'un rôle de progéniteur de pneumocytes I. Ces cellules sont caractérisées par la présence dans leur cytoplasme de corps lamellaires, organites de stockage du surfactant qu'elles produisent. Dans le poumon adulte normal, quelques macrophages alvéolaires peuvent être observés dans la lumière alvéolaire. Les fibroblastes de l'interstitium constituent 30-40% de l'ensemble des cellules du poumon profond et contribuent à la production de sa fine charpente matricielle. Au cours du développement, les cellules mésenchymateuses stromales jouent un rôle essentiel dans l'organogénèse, l'angiogénèse et la maturation cellulaire. Elles synthétisent le collagène I et expriment l'alpha-actine de type muscle lisse (α -SMA) caractéristiques également des myofibroblastes présents dans le poumon adulte pathologique et non des fibroblastes du poumon normal.

Le dialogue entre les CEA et les fibroblastes repose avant tout sur leur proximité physique bien visible en microscopie électronique (Adamson and King 1984; Adamson and King 1984; Adamson, Young et al. 1988; Adamson, Hedgecock et al. 1990). Leurs interactions ont été évaluées essentiellement dans le cadre de la morphogénèse pulmonaire par des modèles de co-culture *in vitro* avec des fibroblastes. Dans ces modèles, les pneumocytes de type II restent différenciés avec une augmentation de l'expression des protéines du surfactant, en partie liée à la production de KGF par les fibroblastes (Shannon, Pan et al. 2001). Les médiateurs paracrines impliqués dans ce dialogue comptent notamment la prostaglandine E2 (PGE2), issue des CEA et ayant pour effet la répression de la prolifération fibroblastique et les facteurs de croissance émanant des fibroblastes HGF (hepatocyte growth factor) et KGF, ayant essentiellement un rôle protecteur des CEA.

LA FONCTION DE BARRIERE EPITHELIALE

La perméabilité de l'épithélium alvéolaire aux petites molécules hydrophiles est environ 100 fois plus faible que celle de l'endothélium capillaire pulmonaire. Ceci est dû d'une part à la grande surface occupée par les pneumocytes I qui raréfie les jonctions intercellulaires, et d'autre part aux jonctions intercellulaires elles-mêmes [Figure 2]: de type jonctions serrées

ou *zonula occludens*, jonctions de type *zonula adherens*, desmosomes et jonctions communicantes ou *gap junctions*.

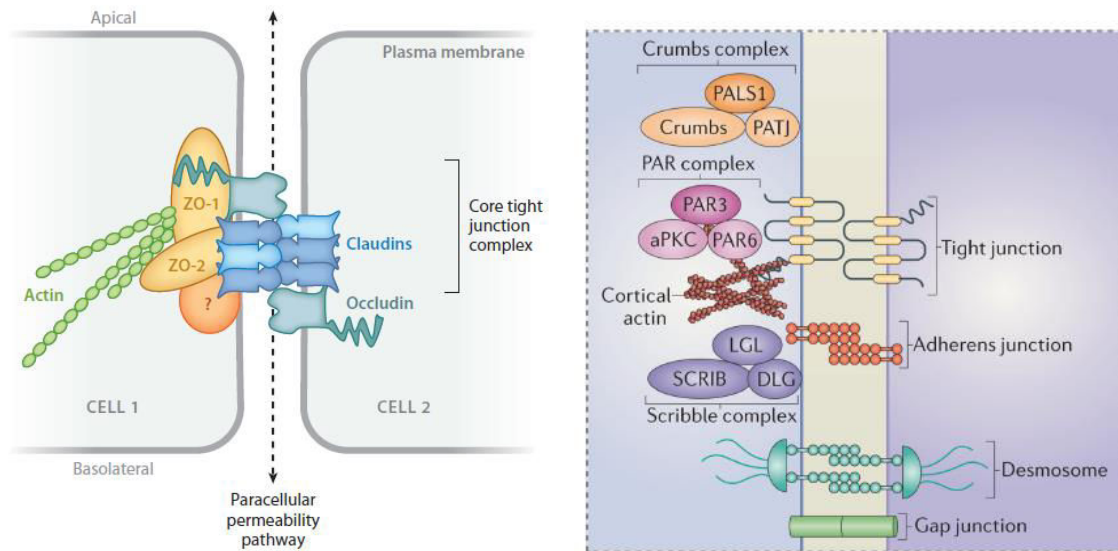


Figure 2 : Schéma des jonctions inter-cellulaires (d'après (Koval 2013) et (Lamouille, Xu et al. 2014)). Abréviations : ZO Zonula occludens, Cell cellule, aPKC, atypical protein kinase C; DLG, discs large; LGL, lethal giant larvae; PALS1, protein associated with Lin-7 1; PATJ, PALS1-associated tight-junction protein.

Les jonctions serrées situées au pôle apical des cellules sont composées de protéines transmembranaires telles que les claudines et l'occludine, de protéines d'ancrage au cytoplasme que sont les protéines ZO1, ZO2 et ZO3 (ZO pour zonula occludens), liées elles-mêmes au cytosquelette d'actine (Tsukita, Furuse et al. 2001). Elles forment une ceinture au pôle apico-latéral des cellules épithéliales, limitant ainsi les transports paracellulaires de solvant et de solutés. Elles assurent également la polarité cellulaire en séparant le pôle apical du pôle basolatéral avec une distribution asymétrique des composants cellulaires.

Les zonula adherens situées immédiatement sous les jonctions serrées, sont formées par des cadhérines, essentiellement et notamment la Cadhérine-E, reliées au cytosquelette d'actine via entre autres des caténines (Yamada and Nelson 2007). L'importance des forces de liaison associant les caténines aux cadhérines dépend du degré de phosphorylation des caténines. Des signaux intracellulaires peuvent ainsi conduire au désassemblage de ces jonctions par

défaut d'interaction caténine-cadhérine. D'autres signaux intracellulaires, en particulier les guanosine triphosphate hydroxylases (GTPases), peuvent également perturber la fonction des cadhérines, et en particulier l'E (epithelial) - Cadhérine.

Les desmosomes sont constitués de protéines transmembranaires de type cadhérines (desmocollines et desmogleines) et de protéines de la plaque cytoplasmique (desmoplakines). Ils sont liés au cytosquelette par des filaments de cytokeratine. Les desmosomes forment ainsi un réseau de cytokeratine participant à la cohésion architecturale du tissu épithélial permettant de lutter contre les forces de traction mécanique.

Les jonctions communicantes (*gap junctions*) sont formées de molécules transmembranaires, formant des canaux appartenant à la famille des connexines. Elles permettent le passage d'eau, d'ions et de métabolites (inférieurs à 1500Da), entre cellules adjacentes (Falk 2000).

L'ancrage de l'épithélium à la membrane basale implique des hémidesmosomes constituées d'intégrines hétérodimériques et d'une plaque dense composée de desmoplakine.

Les intégrines sont des molécules d'adhésion cellulaire et des récepteurs transmembranaires qui lient le cytosquelette à la matrice extra-cellulaire. Il s'agit d'hétérodimères composés de sous-unités α et β (18 sous-unités α and 8 sous-unités β) (Hynes 1992). En plus de l'adhésion à la membrane basale, elles régulent les processus fondamentaux des cellules comme la différenciation, la prolifération ou encore la migration cellulaire.

HOMEOSTASIE LIQUIDIENNE DES ALVEOLES PULMONAIRES

SCHEMA GENERAL DES TRANSPORTS D'IONS ET D'EAU PAR L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE

La qualité des échanges gazeux alvéolo-capillaires nécessite que le volume de liquide du film alvéolaire à la surface des CEA (épaisseur ~ 200 nm) contenant des électrolytes, notamment des ions sodium (Na^+) et chlorures (Cl^-), appelé hypophase alvéolaire, soit contrôlé. Le volume de l'hypophase est essentiellement régulé par un transport vectoriel actif d'ions Na^+

de l'hypophase vers l'interstitium pulmonaire (Matthay, Landolt et al. 1982) (Basset, Crone et al. 1987; Basset, Crone et al. 1987; Matthay, Clerici et al. 2002), couplé secondairement à un passage passif essentiellement paracellulaire d'ions Cl^- dans le même sens, et à une réabsorption d'eau du fait du gradient osmotique localement créé. Les ions Na^+ pénètrent passivement au pôle apical des CEA du fait d'un gradient électrochimique favorable grâce principalement au canal sodique épithélial sensible à l'amiloride ENaC (Epithelial Na^+ Channel) (Canessa, Horisberger et al. 1993) (Canessa, Schild et al. 1994) et à des canaux cationiques CNG (Cyclic Nucleotide-Gated channels) sensibles au pimozide. Ils sont ensuite activement extrudés vers l'interstitium par des sodium-potassium adénosine triphosphatases (Na , K -ATPase) localisées au pôle basolatéral des pneumocytes I et II [Figure 3]. En situation normale, les ions Cl^- sont principalement réabsorbés par voie paracellulaire. Néanmoins, sous l'effet des catécholamines circulantes produites en condition de stress, les ions chlorures peuvent être réabsorbés par voie transcellulaire grâce à des canaux de type CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) situés dans la membrane apicale des pneumocytes I et II. La réabsorption de l'eau peut se faire par voie paracellulaire ou via des AQP5, très richement exprimées par les pneumocytes I.

La réabsorption d'ions et d'eau par l'épithélium alvéolaire, encore appelée clairance du fluide alvéolaire, est particulièrement importante à la naissance, lorsque le nouveau-né doit éliminer très rapidement le fluide présent dans les alvéoles pendant la vie fœtale. Il a ainsi été montré que l'inactivation complète de la sous-unité α du canal ENaC chez la souris inhibant le transport trans-épithélial d'ions Na^+ induisait un décès par détresse respiratoire des souriceaux nouveau-nés dans les 40 heures suivant la naissance par impossibilité de clairance du fluide alvéolaire fœtal (Hummler, Barker et al. 1996). La clairance du fluide alvéolaire joue également un rôle primordial en cas d'œdème pulmonaire puisqu'elle constitue le principal mode de réabsorption du fluide d'œdème alvéolaire à condition toutefois que l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'épithélium alvéolaire soit préservée (Matthay 2014).

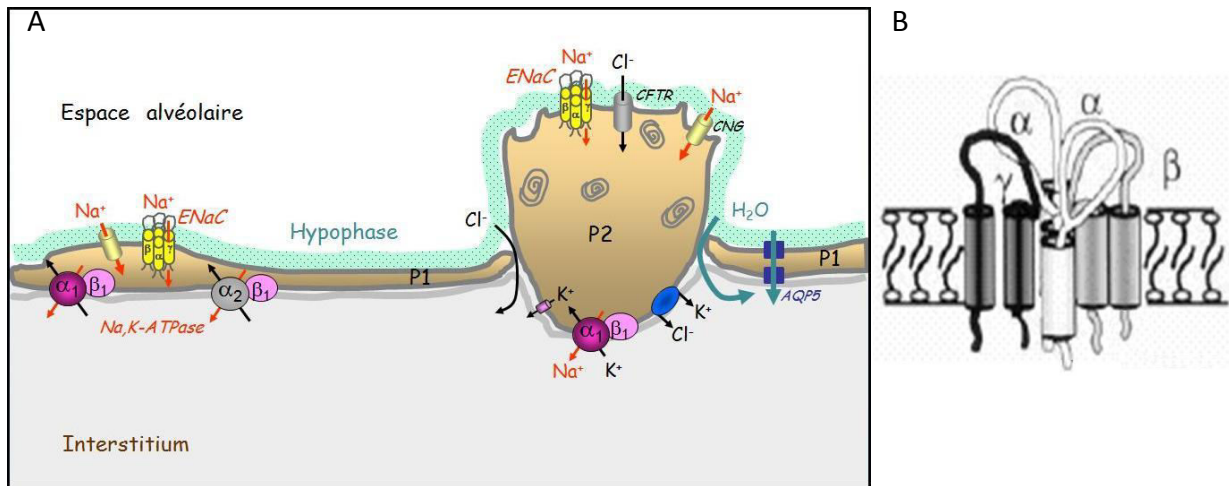


Figure 3. Transport d'électrolytes et d'eau par l'épithélium alvéolaire. D'après (Johnson and Bennett 2006) et (Firsov, Gautschi et al. 1998). Représentation schématique des mouvements vectoriels d'électrolytes et d'eau à travers l'épithélium alvéolaire, et des principaux canaux et transporteurs impliqués. **B.** Stoïchiométrie supposée d'ENaC, hétérotétramère composé de 2 sous-unités α , 1 sous-unité β et 1 sous-unité γ ; chaque sous-unité comprend 2 domaines transmembranaires, 1 large boucle extracellulaire et des extrémités N- et C-terminales intra cytoplasmiques. Abréviations : AQP5 : aquaporine 5 ; CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel ; CNG : cyclic nucleotide-gated ; ENaC : epithelial sodium channel ; Na, K-ATPase : sodium-potassium adenosine triphosphatase ; P1 : pneumocyte de type I ; P2 : pneumocyte de type II.

LE CANAL ENaC DANS LES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES

Le canal ENaC, présent à la surface apicale des pneumocytes I comme des pneumocytes II (Johnson and Bennett 2006), est classiquement constitué de 3 sous-unités homologues α , β et γ présentant 40% d'homologie entre elle et dont la structure est présentée sur la figure 3 (Canessa, Horisberger et al. 1993; Canessa, Schild et al. 1994). La sous-unité α -ENaC semble fonctionnellement la plus importante puisque lorsqu'elle est exprimée seule ou en association avec β - et γ -ENaC dans l'oocyte de Xénope, il existe une activité canal, alors que β - ou γ -ENaC exprimées seules ou en association ne donnent pas d'activité canal (Canessa, Horisberger et al. 1993; Canessa, Schild et al. 1994). La stoïchiométrie d'ENaC n'est pas connue avec certitude, mais pourrait être un assemblage en hétérotétramère comprenant 2

sous-unités α , 1 sous-unité β et 1 sous-unité γ (Firsov, Gautschi et al. 1998) [Figure 3]. Une sous-unité δ -ENaC a plus récemment été décrite mais son rôle et son importance physiologique sont encore mal connus. Dans sa forme typique, ENaC est un canal de faible conductance (4-6 pico Siemens), de forte sélectivité pour le Na^+ par rapport au K^+ , inhibé par de faibles concentrations d'amiloride (K_i amiloride < 50 nM). Il est exprimé dans tous les épithéliums transportant du Na^+ (colon distal, néphron distal, voies aériennes et alvéoles, glandes sudoripares ...) et est en général considéré comme l'étape limitante du transport de Na^+ , notamment dans l'épithélium alvéolaire. Ainsi, chez la souris adulte, la réduction de l'activité d'ENaC dans les alvéoles induite par une diminution d'expression d' α -ENaC augmente la sévérité de l'œdème pulmonaire induit (Egli, Duplain et al. 2004) par altération de la clairance du fluide alvéolaire. A l'inverse, les souris homozygotes pour la mutation gain-de-fonction d'ENaC β -Liddle affectant le gène de β -ENaC présentent une augmentation de la clairance du fluide alvéolaire et sont protégées de l'œdème alvéolaire par surcharge hydrostatique par rapport aux souris sauvages (Randrianarison, Escoubet et al. 2007).

La régulation d'ENaC est complexe et tissu-spécifique, et se fait au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Dans l'épithélium alvéolaire, l'expression ou l'activité d'ENaC sont principalement stimulées par les hormones glucocorticoïdes et les catécholamines endogènes (ou les agonistes β -adrénergiques), même si d'autres hormones/facteurs de croissance tels que la dopamine, les hormones thyroïdiennes, le KGF ont aussi été décrits comme activateurs d'ENaC (Matthay 2002; Matthay, Clerici et al. 2002; Eaton, Helms et al. 2009). Les glucocorticoïdes et les agonistes β -adrénergiques ont une action génomique mais aussi post-traductionnelle, en régulant notamment l'expression de surface du canal. Les β -agonistes stimulent en particulier l'adressage d'ENaC à la membrane (Minakata, Suzuki et al. 1998; Snyder 2000; Chen, Eaton et al. 2002; Planes, Blot-Chabaud et al. 2002). Les sous-unités d'ENaC, dont la demi-vie membranaire est courte (une quinzaine de minutes), sont ensuite internalisées après ubiquitination par la protéine-ubiquitine ligase Nedd4-2 qui lie un motif PY contenu dans l'extrémité C-terminale intracellulaire de la sous-unité β -ENaC (Loffing-Cueni, Flores et al. 2006); Staub 2006). La fixation des molécules d'ubiquitine sur les sous-unités d'ENaC induit leur endocytose et leur dégradation par le

protéasome ou le lysosome, selon les conditions et le type cellulaire (Weisz, Wang et al. 2000; Malik, Schlanger et al. 2001; Snyder 2005; Gille, Randrianarison-Pellan et al. 2014) ; Malik 2001 ; Weisz 2003 ; Snyder 2005 ; Gille 2014). Dans les CEA, la protéine kinase A (PKA) stimulée par les β 2-agonistes et la Serum and Glucocorticoid Induced Kinase 1 (SGK-1) induite par les glucocorticoïdes phosphorylent Nedd4-2, ce qui inhibe sa fixation à ENaC et aboutit *in fine* à une augmentation de l'expression de surface du canal (Snyder 2005). La probabilité d'ouverture (P_o) du canal est de façon physiologique régulée par des sérine-protéases membranaires appelées Channel-Activating Proteases (CAP) qui sont co-exprimées avec ENaC dans les épithélia transportant du Na^+ (Vallet, Chraïbi et al. 1997 ; Vallet, Pfister et al. 2002). Trois CAP (CAP1 ou prostasine, CAP2, et CAP3 ou matriptase) sont exprimées dans les CEA (Planes, Leyvraz et al. 2005). Elles ont la capacité d'activer ENaC lorsque celui-ci est adressé, sous forme inactive, à la membrane apicale vraisemblablement par clivage protéolytique des sous-unités α - et γ -ENaC, ce qui induit un changement conformationnel du canal et une importante augmentation de sa P_o . Ainsi l'inhibition pharmacologique des CAP par l'aprotinine, ou encore l'invalidation ciblée de CAP1 dans les CEA de souris réduit l'activité d'ENaC et la clairance du fluide alvéolaire, et aggrave la sévérité de l'œdème alvéolaire induit par surcharge hydrosodée (Planes, Randrianarison et al. 2010).

PRODUCTION DE SURFACTANT

Les pneumocytes II produisent, secrètent et recyclent les phospholipides et les protéines spécifiques du surfactant (Rugonyi, Biswas et al. 2008). Le surfactant, composé de 85-90% de lipides, 10% de protéines (dont les 4 apoprotéines A, B, C et D à hauteur de 3%) et 2% de glucides, constitue un film très mince (Fehrenbach, Ochs et al. 2000). La protéine C du surfactant (SP-C), petite protéine de 3,5 – 3,7 kDa est produite exclusivement par les pneumocytes de type II (Beers, Kim et al. 1994). Les CEA ont une influence sur la transformation extra-cellulaire du surfactant en régulant notamment le pH et la concentration de calcium de l'hypophase. L'absence acquise de surfactant conduit en effet à un œdème pulmonaire dans les modèles expérimentaux d'œdème pulmonaire lésionnel ou « acute lung injury » (ALI). L'augmentation de la tension de surface alvéolaire due au déficit

de surfactant aboutit à la diminution de la pression hydrostatique interstitielle autour des capillaires pulmonaires favorisant ainsi l'extravasation de liquide et donc l'œdème pulmonaire. Le surfactant a donc un rôle non seulement dans le maintien de l'ouverture des alvéoles mais aussi dans le maintien de l'équilibre du volume de l'hypophase ainsi que dans la défense innée (Wright 2005).

REPARATION DE L'EPITHELIUM

A l'interface entre le milieu extérieur et le secteur vasculaire, l'épithélium alvéolaire est constamment soumis aux agressions. Tout signal de danger détecté déclenche des mécanismes d'adaptation permettant la restitution de l'unité fonctionnelle indispensable aux échanges gazeux. Ainsi, les interactions épithélio-mésenchymateuses permettraient une réparation épithéliale harmonieuse après agression (Adamson, Hedgecock et al. 1990). Les CEA sont douées d'une machinerie sécrétoire élaborée permettant la synthèse de médiateurs garants de l'homéostasie cellulaire.

Les pneumocytes de type II, en particulier, jouent un rôle important dans le processus de réparation après agression épithéliale. La ré épithélialisation alvéolaire se fait en effet grâce à une prolifération des pneumocytes de type II ayant résisté à l'agression, qui forment, en réponse à des signaux présents dans le microenvironnement, d'abord une métaplasie cubique puis se transdifférencient en pneumocytes I recouvrant la membrane basale mise à nu (Adamson, Hedgecock et al. 1990). Cette phase de prolifération et réparation se fait sous le contrôle de facteurs de croissance épithéliaux produits par les cellules mésenchymateuses voisines tels que le KGF ou l'HGF. Les CEA libèrent par ailleurs des facteurs chimiotactiques qui recrutent des fibroblastes ainsi que des cellules inflammatoires sur le site de la lésion (Crosby and Waters 2010; Chapman 2011). Ces cellules vont en retour sécréter des médiateurs solubles et des cytokines parmi lesquelles le TGF(transforming growth factor)- β , l'interleukine (IL)-13 ou le PDGF (platelet derived growth factor), qui vont induire une modification phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes, contribuant à la contraction du tissu lésé et la synthèse de médiateurs favorisant la réparation épithéliale.

Le rôle des pneumocytes de type II, dans l'homéostasie et la réparation alvéolaire a récemment été démontré par une élégante étude de traçage génétique (Barkauskas, Crouce et al. 2013). Barkauskas et al. soulignent l'influence essentielle des interactions épithélio-mésenchymateuses dans cette homéostasie cellulaire épithéliale et notamment dans la prolifération et la différenciation des pneumocytes de type II (Barkauskas, Crouce et al. 2013). Le rôle des cellules épithéliales bronchiolaires de phénotype sécrétoire (équivalent de cellules de Clara) exprimant *scgb1a1* (secretoglobine de la famille 1A membre 1) est débattu et il serait marginal dans le renouvellement des pneumocytes de type II (Kim, Jackson et al. 2005; Rawlins, Okubo et al. 2009; Rock and Hogan 2011) (Tropea, Leder et al. 2012). Là encore, une hiérarchie se dessine dans la contribution des différents types de cellules progénitrices au cours de la réparation alvéolaire. Comme pour d'autres tissus tels que la peau et le tube intestinal, les éléments de cette réparation pourront bientôt mieux être définis (Lopez-Garcia, Klein et al. 2010; Mascre, Dekoninck et al. 2012).

Plus récemment, Desai et al. ont précisé différents aspects de la réparation alvéolaire (Desai, Brownfield et al. 2014). Ils montrent en effet que seule une faible fraction (~1%) des pneumocytes de type II, matures ont des propriétés de cellules souches et se divisent de façon intermittente (avec un temps de doublement d'environ 40 jours) permettant alors le renouvellement de l'épithélium de 7% des alvéoles par an. Ce phénomène de réparation est induit après agression des pneumocytes de type I (Desai, Brownfield et al. 2014; Treutlein, Brownfield et al. 2014).

Au cours des agressions épithéliales répétées et/ou sévères, ces mécanismes de réparation et de clairance alvéolaire semblent dépassés, conduisant à des tableaux de défaillance respiratoire sévère comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ou encore des processus fibrosants, qui font l'objet de ce travail. La question du rôle des CEA et de ses progéniteurs cellulaires, apparaît centrale dans la survenue de ces états pathologiques.

II. IMPLICATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES DANS LES PATHOLOGIES DU POU MON PROFOND

Dans ce travail de Thèse, nous nous sommes focalisés sur deux pathologies graves affectant le poumon distal et s'accompagnant d'une hypoxie alvéolaire, dans lesquelles les altérations des CEA jouent un rôle particulièrement important : la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA).

A. LA FIBROSE PULMONAIRE

La fibrose pulmonaire est un terme générique qui désigne les pathologies interstitielles fibrosantes responsables d'une insuffisance respiratoire progressive et chronique. Les pneumopathies interstitielles diffuses chroniques (PIDC) comptent plus de 200 affections.

On distingue parmi les PIDC 4 grandes catégories, à savoir les PID de causes connues (médicaments, connectivites, expositions environnementales ou professionnelles...), les pneumopathies interstitielles idiopathiques (PII), les granulomatoses pulmonaires (avec essentiellement la sarcoïdose) et les PID particulières définissant des entités bien caractérisées comme l'histiocytose pulmonaire à cellules de Langerhans, la lymphangioleiomyomatose ou encore la pneumopathie chronique idiopathique à éosinophiles.

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) constitue la plus fréquente et la plus grave des PIDC, ce qui la met au centre des préoccupations de la recherche clinique et fondamentale dans ce domaine pneumologique. Bien que les modèles de fibrogénèse animale et les modèles *in vitro* ne puissent pas reproduire clairement les phénomènes cliniques, les processus fibrosants pulmonaires sont analysés à travers ce spectre dans la perspective d'améliorer la qualité de vie et le pronostic de ces patients.

LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE (FPI)- ELEMENTS CLINIQUES

DIAGNOSTIC DE LA FPI ET DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

La FPI est révélée par une dyspnée d'installation progressive associée à une toux sèche généralement chez un homme ancien fumeur âgé de plus de 60 ans. Cliniquement, l'auscultation pulmonaire montre des crépitations secs avec un bruit de « velcro » à l'inspiration. L'hippocratisme digital, qui consiste en un bombement en « baguette de tambour » des extrémités des doigts peut être observé chez 40% des patients (King, Schwarz et al. 2001). Les explorations fonctionnelles respiratoires montrent le plus souvent un syndrome restrictif défini par une baisse de la CPT (capacité pulmonaire totale) inférieure à 80%, qui s'accompagne d'une baisse de la CVF (capacité vitale forcée) et de la DLCO (diffusion libre du monoxyde de carbone), indices essentiels pour le suivi de la maladie (Raghu, Collard et al. 2011).

Chez un patient rigoureusement interrogé sur d'éventuelles expositions environnementales, médicamenteuses et professionnelles et examiné à la recherche de signes de connectivite, la tomodensitométrie (TDM) thoracique [Figure 4] constitue l'examen majeur du diagnostic avec des lésions parenchymateuses basales bilatérales à type de réticulations sous-pleurales associées à des bronchectasies par traction et à des opacités en rayon de miel ; la présence de ces quatre éléments définit une PIC (pneumopathie interstitielle commune) certaine. La biopsie pulmonaire chirurgicale, lorsqu'elle est envisageable, est proposée dans les cas où l'aspect TDM ne montre pas de PIC certaine. Le diagnostic de FPI exige une discussion multidisciplinaire impliquant le pneumologue, le radiologue et, le cas échéant, l'anatomopathologiste, ces trois acteurs devant être experts dans le domaine des PID (Raghu, Collard et al. 2011).



Figure 4 : Coupe tomodensitométrique en fenêtre parenchymateuse d'un patient âgé de 72 ans ayant une fibrose pulmonaire idiopathique. Les critères de pneumopathie interstitielle commune certaine sont tous présents avec des lésions basales sous-pleurales associant réticulations intralobulaires, bronchectasies par traction et images en rayon de miel.

La FPI constitue avec la sarcoïdose, les plus fréquentes PIDC à travers le monde (Valeyre, Freynet et al. 2010). Les chiffres de prévalence et d'incidence sont respectivement de 0.5-63/100 000 à 0.22-17.4/100 000 personnes-années (Kaunisto, Salomaa et al. 2013; Ley and Collard 2013). Récemment, l'incidence de la FPI parmi les bénéficiaires de la couverture US Medicare et âgés de 65 ans et plus s'élevait à 93.7/100 000 personnes-années (Raghu, Chen et al. 2014). L'âge moyen du diagnostic de FPI se situe entre 65 et 74 ans, la maladie étant plus rare avant 59 ans. Le sexe ratio est de 1,2 homme pour une femme. Les sujets de peau noire ont moins de risque que les sujets de peau blanche, qui ont eux-mêmes plus de risque que les Hispaniques de décéder de FPI aux Etats Unis (Swigris, Olson et al. 2012). Une augmentation dans le temps de l'incidence de la FPI a été suggérée par certains auteurs (Gribbin, Hubbard et al. 2006; Navaratnam, Fleming et al. 2011) mais elle reste débattue (Fernandez Perez, Daniels et al. 2010). Bien que l'incidence de la maladie soit stable, il est

montré que sa prévalence augmente du fait de l'allongement de la survie des patients entre 2001 et 2011 dans une étude récente menée chez des patients de plus de 65 ans (Raghu, Chen et al. 2014).

Le tabagisme ancien ou actif constitue un facteur de risque établi de FPI, y compris dans les formes familiales de fibrose pulmonaire (Steele, Speer et al. 2005). L'exposition à des poussières minérales ou de bois est également un facteur favorisant. Le reflux gastro-œsophagien semble être incriminé dans la pathogénie avec notamment les micro-inhalations associées (Tobin, Pope et al. 1998; Lee, Collard et al. 2010; Lee, Collard et al. 2013).

La FPI est le plus souvent sporadique mais des formes familiales existent et peuvent concerner jusqu'à 20% des cas (Steele, Speer et al. 2005; Garcia-Sancho, Buendia-Roldan et al. 2011) [Annexe 1]. Les mutations de *TERT* (TElomerase Reverse Transcriptase), de *TERC* (TElomerase RNA Component) et de *SPC* peuvent être identifiées chez 20% des formes familiales de fibrose pulmonaire. Le polymorphisme du promoteur du gène *MUC5B* a été mis en évidence au sein des formes sporadiques et familiales de FPI (Fingerlin, Murphy et al. 2013). Dans une étude récente, il a été montré que le principal facteur de risque de fibrose pulmonaire était l'existence d'un antécédent familial de fibrose pulmonaire, devant le tabagisme, le reflux gastro-œsophagien et l'exposition à des polluants (Garcia-Sancho, Buendia-Roldan et al. 2011; Ley and Collard 2013). Vraisemblablement, tous les facteurs impliqués dans la sénescence cellulaire jouent un rôle dans la survenue d'une FPI (Selman and Pardo 2014).

HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE

L'histoire naturelle de la FPI est imprévisible d'un patient à l'autre. L'aggravation respiratoire se fait classiquement selon un mode plus ou moins lentement progressif qui aboutit à l'insuffisance respiratoire chronique et au décès. Une exacerbation aiguë (EA) de la FPI peut survenir à n'importe quelle phase de la maladie, voire même d'emblée. L'incidence de cette complication a été estimée à 14.2% à 1 an et 20.7% à 3 ans dans une étude rétrospective récente (Song, Hong et al. 2011). Il s'agit d'une détérioration respiratoire (dégradation de la

PaO₂) très rapide (<1mois) sans cause retrouvée et répondant à des critères clinico-radiologiques bien définis (Collard, Moore et al. 2007). L'EA constitue un évènement redoutable responsable de 47 à 71% des décès observés chez ces patients (Martinez, Grossman et al. 2005; Daniels, Yi et al. 2008).

La survie médiane des patients ayant une FPI est estimée à 3 ans, mais elle peut être très variable d'un sujet à l'autre, rendant nécessaire l'élaboration d'indices pronostiques fiables. A l'échelle histologique, une corrélation a été établie entre le nombre de foyers fibroblastiques jeunes et la survie des patients (Flaherty, Colby et al. 2003). Cependant, l'âge avancé des patients et surtout les recommandations actuelles permettant un diagnostic sans recours à l'histologie, rendent ce marqueur inutilisable. Des indices pronostiques cliniques sont proposés intégrant notamment l'âge et la progression fonctionnelle respiratoire (du Bois, Weycker et al. 2011; Ley, Ryerson et al. 2012; Mura, Porretta et al. 2012).

HISTOLOGIE DE LA FIBROSE PULMONAIRE

Le substratum histologique de la FPI est la pneumopathie interstitielle commune (PIC) [Figure 5]. Marquée par une désorganisation architecturale du poumon profond, la PIC est caractérisée par une hétérogénéité spatiale et temporelle des lésions. Des zones de fibrose de stades différents jouxtent un parenchyme sain. Les lésions les plus sévères sont distribuées essentiellement dans le parenchyme basal sous-pleural et les espaces paraseptaux. On note en particulier une accumulation de collagène et l'existence de foyers fibroblastiques jeunes (FFJ) qui forment une structure tridimensionnelle coordonnée à base pleurale (Cool, Groshong et al. 2006). On observe des zones de rayon de miel composées de fibrose kystique et recouvertes d'un épithélium bronchiolaire avec amas de mucus et de cellules inflammatoires. Ce phénomène dit de bronchiolisation des alvéoles pulmonaires ou encore d'hyperplasie des pneumocytes II constitue un trait histologique de la FPI. Marqueur de la destruction complète des alvéoles d'un lobule pulmonaire, le rayon de miel est en effet tapissé d'une muqueuse bronchiolaire (Pimentel 1967). Le rôle des cellules de l'immunité demeure plausible avec une polarisation de type Th2 (Strieter 2005). Une métaplasie de

tissu musculaire lisse est par ailleurs fréquemment décrite dans ces zones de fibrose (Raghu, Collard et al. 2011). Enfin, un remodelage vasculaire vient compléter le tableau histologique.

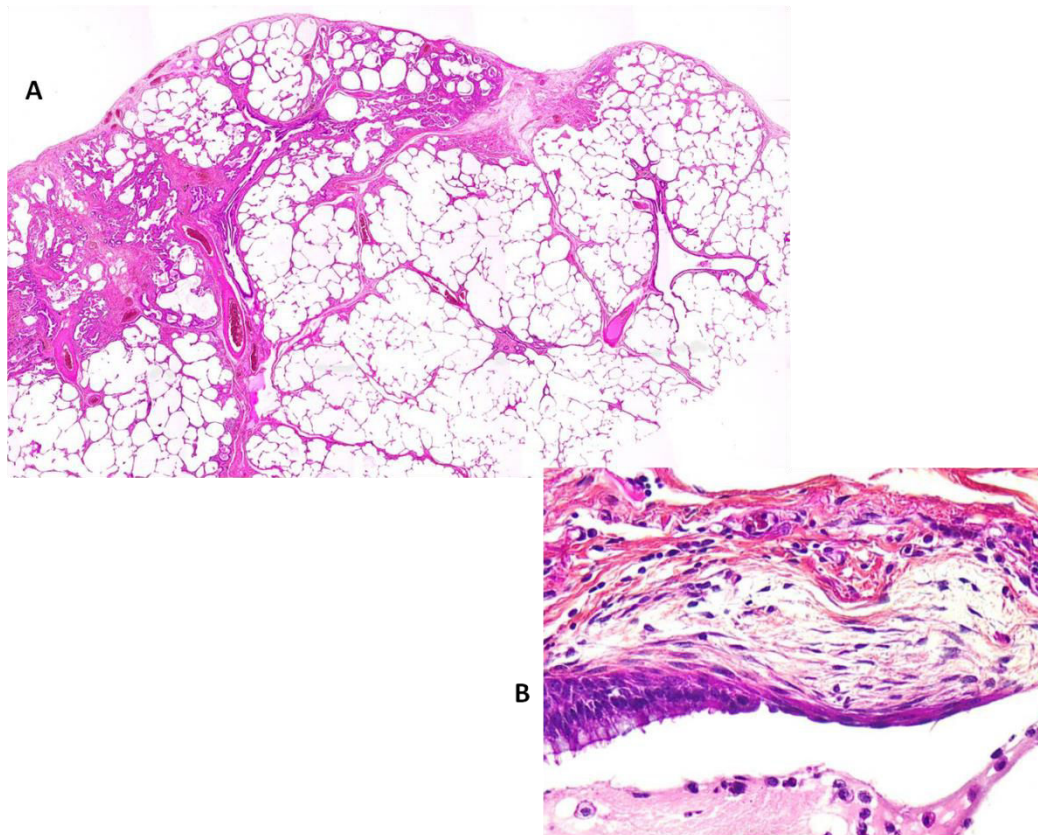


Figure 5: coupe histologique d'une biopsie pulmonaire chirurgicale montrant des lésions caractéristiques de fibrose pulmonaire idiopathique (aimablement fournie par le Dr Marianne Kambouchner, Service d'Anatomopathologie, Hôpital Avicenne, Bobigny).

A : Coupe histologique de poumon colorée à l'Hématéine Eosine grossissement x40 qui montre une prédominance sous-pleurale et septale des lésions avec un dépôt de collagène dense et des zones de collapsus. Les lésions sont hétérogènes d'âge différent avec des espaces de parenchyme sain. B : agrandissement (x200) d'une lésion caractéristique de foyer fibroblastique jeune.

GENERALITES SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA FIBROSE PULMONAIRE

Bien que la pathogénie de la maladie reste mal connue, les avancées réalisées ces dernières années dans ce domaine mettent en exergue l'implication des CEA [Figure 6] (King, Pardo et al. 2011; Selman and Pardo 2014). L'unité épithélio-mésenchymato-endothéliale constituerait le trigone de la physiopathologie de la maladie. L'hypothèse qui prévaut est non plus centrée sur l'inflammation mais sur le défaut de réparation épithéliale alvéolaire après lésion aboutissant *in fine* à la destruction de l'architecture du poumon et à l'altération de sa fonction (Selman, King et al. 2001). Garant en temps normal d'une réparation harmonieuse, le dialogue entre cellules épithéliales et fibroblastes semble dérégulé favorisant ainsi la prolifération, le recrutement et l'activation des fibroblastes en myofibroblastes à l'origine d'un excès de production de matrice extra-cellulaire (MEC) (Selman and Pardo 2006; Sakai and Tager 2013; Camelo, Dunmore et al. 2014; Selman and Pardo 2014).

Le rôle clé des CEA dans le processus fibrosant est souligné par des modèles animaux d'agression épithéliale aboutissant à des lésions de fibrose (Kuwano, Kunitake et al. 1996; Lee, Cho et al. 2004; Sisson, Mendez et al. 2010). Bien que le trigger de la maladie reste énigmatique, plusieurs facteurs environnementaux semblent contribuer à l'agression des CEA comme en premier lieu le tabac, les micro-inhalations ou encore les infections virales, notamment herpétiques (Taskar and Coultas 2008; Attili, Kazerooni et al. 2008; Vannella, Luckhardt et al. 2010; King, Pardo et al. 2011). Les contraintes mécaniques imposées au parenchyme pulmonaire sous pleural pourraient participer à l'agression des CEA et contribuer à l'installation de la fibrose et à sa progression (Leslie 2012). Par ailleurs, la maladie survenant le plus souvent à un âge avancé, le vieillissement cellulaire, la sénescence induite ou programmée constituent une approche pathogénique particulièrement intéressante (Selman and Pardo 2014).

Différents phénotypes de CEA sont observés dans le poumon de FPI : cellules hyperplasiques, activées, CEA apoptotiques, CEA soumises à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et CEA sénescents. Les CEA présentes dans le poumon de fibrose

subissent ainsi des modifications morphologiques et fonctionnelles participant au processus fibrosant. Une profonde altération de la trans-differentiation des pneumocytes II en pneumocytes I est décrite, liée en partie au remaniement de la MEC, mais surtout à la rupture de la membrane basale. Cela conduit à une hyperplasie des pneumocytes II, dont le rôle pathogénique n'est pas clair. Le phénomène dit de bronchiolisation qui concerne les zones de fibrose évoluée pourrait avoir un rôle dans la pathogénie de la maladie, comme le suggère la mise en évidence d'un polymorphisme particulier de *MUC5B* dans la FPI, qu'elle soit familiale ou sporadique (Seibold, Wise et al. 2011). Sur le plan fonctionnel, comme détaillée plus loin, la machinerie sécrétoire des CEA est ébranlée et participe à la formation des foyers fibroblastiques jeunes et au remodelage tissulaire progressif (Sakai and Tager 2013). A cela s'ajoute une reprogrammation des CEA avec activation des voies de signalisation impliquées dans l'embryogénèse et le développement pulmonaire. Sont concernées notamment les voies de Sonic Hedgehog (Shh) (Bolanos, Milla et al. 2012), les voies Wnt/ β caténine (Chilosi, Poletti et al. 2003; Konigshoff, Balsara et al. 2008) et Notch (Aoyagi-Ikeda, Maeno et al. 2011). On note également une surexpression des gènes codant pour les protéines de la superfamille des TGF β et en particulier les BMPs (bone morphogenetic protein) 4 et 7, le TGF β 1 et TGF β 3, et un panel de ligands interagissant avec des récepteurs de tyrosine kinases comme les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs), le facteur de croissance endothélial (VEGF), le facteur de croissance épithélial (EGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et enfin le CTGF (Connective-tissue growth factor).

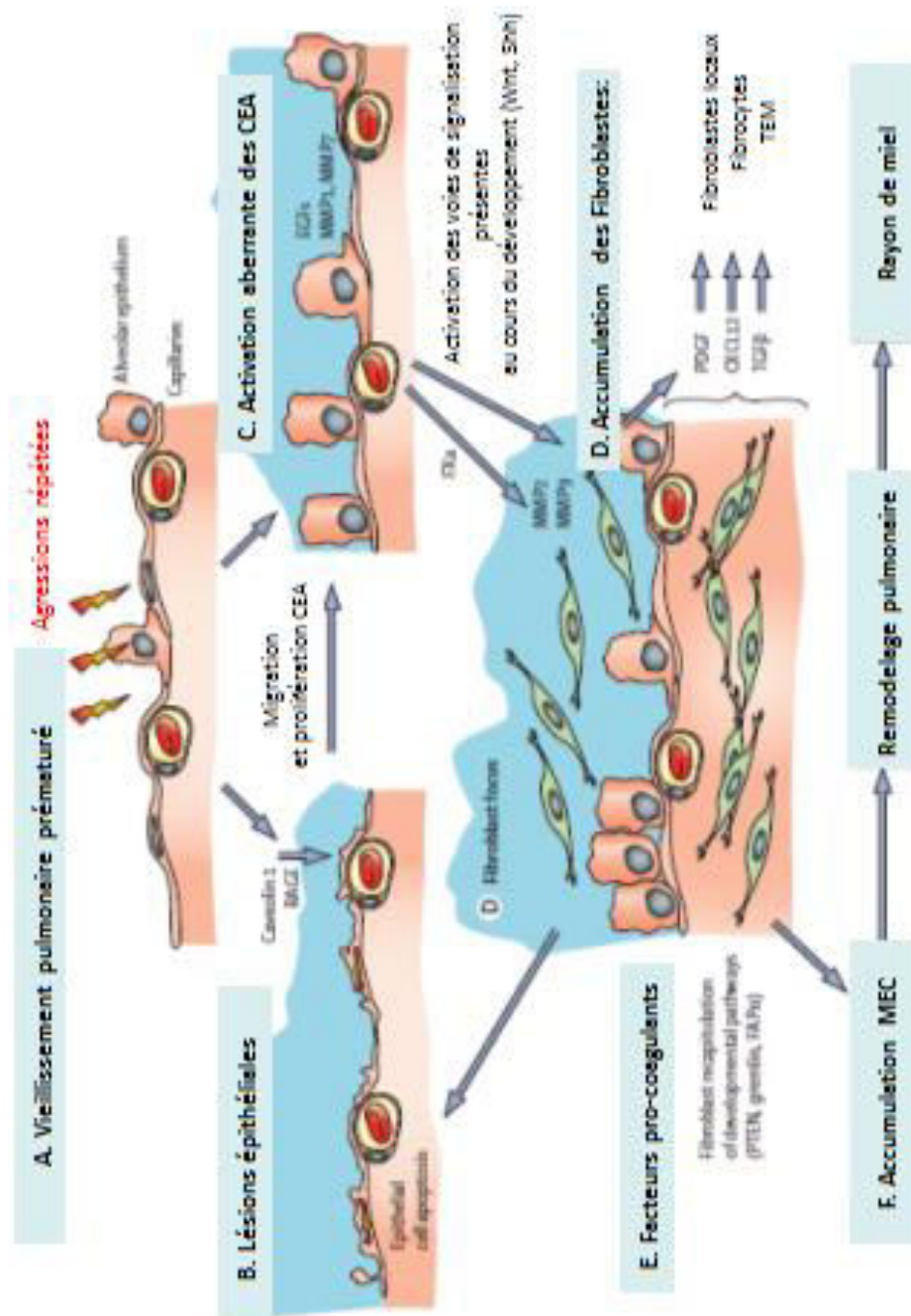


Figure 6 : Schéma de la pathogénie de la fibrogénèse (d'après (King, Pardo et al. 2011)).
 Abréviations: MEC matrice extra-cellulaire, PDGF platelet derived growth factor, TGF transforming growth factor, CXCL12 chemokine récepteur (CXC motif)-12, Shh Sonic hedghog, TEM transition épithélio-mésenchymateuse. CEA cellule épithéliale alvéolaire, RAGE receptor of advanced glycation end product.

Prototype des facteurs profibrosants, le TGF- β 1 appartient à la superfamille du TGF β comme les BMP, les activines et les inhibines (Moustakas and Heldin 2009). Après fixation à son récepteur transmembranaire serine/thréonine kinase type II, qui est phosphorylé et permet la formation d'un hétérodimère avec le récepteur de type I créant un complexe ligand-récepteur, qui entraîne la phosphorylation de Smad2 et Smad3 conduisant à leur association avec Smad4 et à leur translocation dans le noyau [Figure 7] (Bonniaud, Margetts et al. 2005; Bonniaud, Margetts et al. 2005). La transactivation des gènes de réponse au TGF- β est alors lancée incluant les protéines pro-fibrosantes comme entre autres le CTGF, l' α -SMA, le collagène de type I, la fibronectine et le PAI (plasminogen activator inhibitor)-1. Les 3 isoformes du TGF β sont présents dans le poumon sous forme de complexes latents. Les cellules épithéliales induisent des modifications conformationnelles nécessaires à l'activation de ces complexes via leurs intégrines. L'activation du TGF- β via l'intégrine $\alpha\beta$ 6, spécifique de l'épithélium, apparaît être essentielle à la fibrogénèse pulmonaire. L'inactivation de la sous-unité β 6 par délétion ou anticorps bloquant prévient l'installation de la fibrose par absence de signalisation TGF- β (Munger, Huang et al. 1999).

Le rôle de ce processus d'activation du TGF β est souligné par la surexpression de cette intégrine $\alpha\beta$ 6 dans le poumon que ce soit dans le cadre des modèles expérimentaux de fibrose mais également au cours de la FPI (Horan, Wood et al. 2008). L'augmentation de cette intégrine est elle-même induite par la forme active du TGF- β (Wang, Yokosaki et al. 1996).

Le TGF- β activé contribue à la fibrogénèse par différents mécanismes comme le recrutement, la différenciation et la prolifération de myofibroblastes et la production de MEC. Il agit également sur le caractère pro-fibrosant des CEA en induisant une apoptose des CEA in vitro (Lee, Cho et al. 2004) ainsi qu'une TEM (Willis, Liebler et al. 2005), mécanisme d'échappement à l'apoptose (Kage and Borok 2012).

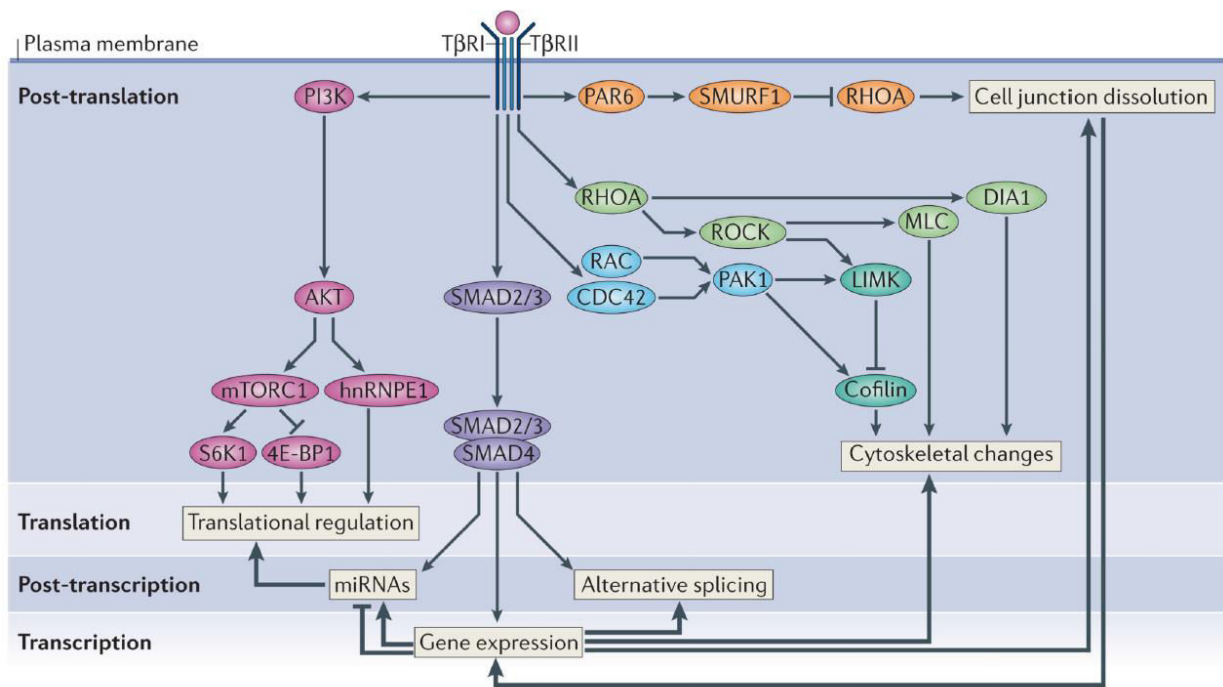


Figure 7 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse liée au TGF- β (d'après (Lamouille, Xu et al. 2014))

ALTERATIONS DES CEA AU COURS DE LA FPI

ROLE DES CEA DANS L'ACTIVATION LOCALE DES FIBROBLASTES

L'analyse du LBA des patients ayant une FPI montre une augmentation de nombreuses cytokines et facteurs de croissance profibrosants (Prasse, Pechkovsky et al. 2006; Tager, LaCamera et al. 2008; Oga, Matsuoka et al. 2009). L'étude immunohistochimique des poumons de fibrose précise l'expression épithéliale de nombre de ces médiateurs (Antoniades, Bravo et al. 1990; Piguet, Ribaux et al. 1993). Les CEA activées, hyperplasiques présentes au sein des foyers de fibrose dans un poumon de FPI synthétisent en effet une variété de facteurs profibrosants. On peut citer les facteurs pro-coagulants, comme PAI-1 et PAI-2 (Kotani, Sato et al. 1995), des facteurs de croissance avec essentiellement le TGF β (Khalil, O'Connor et al. 1996), dont la CEA permet l'activation, mais aussi le PDGF (Antoniades, Bravo et al. 1990), le CTGF, le TNF (tumor necrosis factor)- α , l'endothéline-1

ainsi que des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) contribuant au remodelage de la MEC (Willis and Borok 2007). Ces différents médiateurs participent à l'activation et à la prolifération des cellules fibroblastiques adjacentes parfois organisées en foyers fibroblastiques jeunes.

Favorisé par les exsudats alvéolaires de fibrine, un état pro-coagulant est en effet observé dans le poumon de fibrose (Chambers 2008), qui participe au chemotactisme, à la migration et à la prolifération des fibroblastes d'une part et d'autre part au développement d'une néo-vascularisation pulmonaire (Colombat, Mal et al. 2007). En effet, le complexe facteur tissulaire VIIa- facteur X participe à l'activation des fibroblastes en myofibroblastes via la PAR-1 (proteinase activated receptor-1).

Par ailleurs, la perte des pneumocytes I induit une baisse des molécules anti-fibrosantes comme la caveoline-1 (Maniatis, Chernaya et al. 2012; Odajima, Betsuyaku et al. 2007) ou encore la PGE2 (Lama, Moore et al. 2002; Moore, Peters-Golden et al. 2003; Maher, Evans et al. 2010). Cette prostaglandine, issue essentiellement de la cyclo-oxygénase 2 des cellules épithéliales, est diminuée de moitié dans le poumon de fibrose (Borok, Gillissen et al. 1991). Induite par le HGF, la production de PGE2 est inhibée par PAI-1 et la chimiokine CCL2 (chemokine-(CC motif)-ligand 2), qui sont surexprimés dans le poumon de fibrose (Moore, Paine et al. 2001; Bauman, Wettlaufer et al. 2010). En condition de co-culture les CEA induisent en effet un ralentissement de la prolifération des fibroblastes médié en partie par la PGE2 (Lama, Moore et al. 2002). Les propriétés antifibrosantes de la PGE2 incluent également la diminution de synthèse de collagène, l'inhibition de la migration des fibroblastes et de leur activation en myofibroblastes (Kolodsick, Peters-Golden et al. 2003).

La diminution de l'expression de la caveoline-1 est observée non seulement dans les modèles de fibrose induite chez l'animal (Kasper, Reimann et al. 1998; Barth, Blasche et al. 2006), mais également dans le poumon humain de FPI (Wang, Zhang et al. 2006). L'inactivation ciblée du gène codant pour cette protéine conduit à une fibrose pulmonaire dans un modèle murin, confirmant ainsi son implication dans la pathogénie du processus fibrosant (Drab, Verkade et al. 2001). Cette baisse d'expression de la cavéoline-1 est également observée dans de nombreux cancers solides. La surexpression de la cavéoline-1

conduit quant à elle à un arrêt du cycle cellulaire et à une sénescence programmée. Enfin, le récepteur RAGE (receptor for advanced glycation end product), membre de la superfamille des récepteurs de surface exprimés par les CEA, est diminué au cours de la FPI (Englert, Hanford et al. 2008). La perte de ce récepteur expliquerait dans une certaine mesure l'absence d'adhésion des CEA à la membrane basale et ainsi le défaut de re-épithélialisation observé au cours de la fibrogénèse.

ROLE DES CEA DANS LE RECRUTEMENT DES FIBROCYTES

Sous-population de cellules myéloïdes, les fibrocytes sont présents dans la circulation et les tissus. Ils sont caractérisés par des marqueurs mésenchymateux avec la présence de prolyl 4-hydroxylase et d' α -SMA ainsi que des marqueurs hématopoïétiques comme le CD45, marqueur leucocytaire, les marqueurs monocytaires (CD11a, CD11b, CD13), ainsi que le CD34, marqueur de cellules souches. Ces cellules expriment pour 90% d'entre elles le récepteur de chémokines CXCR4 et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Strieter, Keeley et al. 2009; Bucala, Spiegel et al. 1994; Abe, Donnelly et al. 2001). Au cours de la fibrose, les CEA expriment fortement le ligand de chémokine CXCL-12, encore nommé SDF-1 pour stromal-derived factor 1, conduisant au recrutement des fibrocytes selon l'axe CXCR4-CXCL12 (Phillips, Burdick et al. 2004; Andersson-Sjoland, de Alba et al. 2008; Andersson-Sjoland, Nihlberg et al. 2011). Au cours d'une exacerbation aiguë de fibrose, l'augmentation du taux circulant de fibrocytes semble corrélée au pronostic de la maladie (Moeller, Gilpin et al. 2009). Néanmoins, la participation de ces cellules d'origine myéloïde, variable d'un organe à l'autre, serait inférieure à 0,1% dans le poumon de fibrose (Duffield, Lupper et al. 2013). Aussi, le rôle protecteur ou délétère de ces cellules est sujet à controverse (Borie, Quesnel et al. 2013; Maharaj, Shimbori et al. 2013).

Principales cellules effectrices de la fibrogénèse, les fibroblastes activés, les myofibroblastes, jouent un rôle majeur dans les éléments cardinaux de la fibrose, à savoir son caractère rétractile, la perte de l'architecture tissulaire et de l'homéostasie cellulaire, le dépôt d'une MEC particulièrement riche en collagène I et en fibronectine ainsi que le phénotype aberrant des cellules environnantes (Duffield, Lupper et al. 2013). Les myofibroblastes, qui ont des

propriétés contractiles particulières sont le prototype cellulaire du tissu conjonctif fibreux participant au remodelage de la MEC. A défaut d'être un marqueur réellement spécifique, la caractéristique essentielle des myofibroblastes est l'expression *de novo* de l' α -SMA qui est présent dans les fibres de stress et assure la force contractile permanente de la cellule. La survie, la différenciation cellulaire mésenchymateuse et la préservation du phénotype contractile dépendent de processus complexes intriquant les régulations épigénétiques, les phénomènes d'hyper méthylation, d'acétylation d'histones ou encore les micro-ARN (Hinz, Phan et al. 2012). Les contraintes biomécaniques et la rigidité de la matrice extra-cellulaire contribueraient au maintien du phénotype myofibroblastique, via l'activation du TGF- β 1, prototype des facteurs profibrosants (Wipff, Rifkin et al. 2007). Les myofibroblastes peuvent percevoir les propriétés biochimiques et biophysiques de la MEC à travers les intégrines de surface. Les lysyls oxydases (LOX), les transglutaminases, enzymes productrices d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'autres peroxydases extra-cellulaires peuvent participer au remodelage dynamique de la MEC (Duffield, Luper et al. 2013). Les fibroblastes et myofibroblastes pulmonaires constituent une population hétérogène de cellules dont les origines sont débattues (Hinz, Phan et al. 2012). On décrit des fibroblastes issus de la prolifération et de l'activation du pool local de fibroblastes, ceux provenant des progéniteurs médullaires ou monocytaires, les fibrocytes (exprimant CD45, CD34, collagène I, et CXCR4) et enfin ceux issus respectivement de la transition épithélio-mésenchymateuse, de la transition endothélio-mésenchymateuse voire de la transition mesothélio-mésenchymateuse.

Les résultats des modèles expérimentaux et des différentes mesures réalisées pour déterminer la proportion de chaque voie sont variables voire même contradictoires. D'aucuns défendent même une origine exclusive des cellules mésenchymateuses d'organes à partir des cellules dérivées du mésenchyme embryonnaire.

Plusieurs phénotypes de CEA coexistent dans le poumon de FPI avec notamment des CEA hyperplasiques jouxtant les FFJ et les CEA apoptotiques, témoignant de la perte de dialogue entre CEA et fibroblastes (Selman, King et al. 2001; Pan, Yamauchi et al. 2001; Chilosi, Poletti et al. 2002; Horowitz and Thannickal 2006). L'activation de la voie Wnt/ β -caténine, décrite plus loin, constitue un des éléments à l'origine de cette hyperplasie épithéliale (Chilosi, Poletti et al. 2003; Konigshoff, Balsara et al. 2008). Sur une analyse transcriptomique du poumon de FPI, Selman et al. ont souligné la surexpression de WISP-1 (Selman, Pardo et al. 2006). Cette protéine de signal induite par la voie Wnt dans la CEA participe en effet à la fibrogénèse en activant non seulement la prolifération des CEA mais aussi en favorisant la synthèse par les CEA de nombreux médiateurs pro-fibrosants autocrines comme par exemple les métalloprotéinases de la matrice MMP7 MMP9 ainsi que PAI- 1 (Konigshoff, Kramer et al. 2009). Outre un effet sur la prolifération *in vitro* des CEA, et sur l'activation des fibroblastes WISP-1 conduit à un phénomène de TEM et sa neutralisation permet d'atténuer les lésions de fibrose induite par la bléomycine chez la souris (Konigshoff, Kramer et al. 2009).

LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Ces dernières années ont vu émerger un concept nouveau, celui du rôle du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la fibrogénèse pulmonaire (Mulugeta, Nguyen et al. 2005; Korfei, Ruppert et al. 2008; Lawson, Crossno et al. 2008; Tanjore, Blackwell et al. 2012).

Le RE rugueux est un organite cytoplasmique dans lequel les protéines synthétisées sont assemblées dans toutes les dimensions. Le stress du RE est lié à l'activation des voies de signalisation en réponse à une altération des capacités d'assemblage des protéines (Walter and Ron 2011). Au cours de certaines fibroses familiales, et en particulier dans le cadre d'une mutation de la protéine C du surfactant, il a été observé une augmentation du stress du RE en rapport avec une accumulation de protéines, dites mutantes ou mal assemblées. Ce

stress du RE est incriminé selon son intensité dans les phénomènes d'apoptose ou de TEM des CEA (Mulugeta, Nguyen et al. 2005; Maitra, Wang et al. 2010; Zhong, Zhou et al. 2011).

Au cours de la FPI sporadique, il a également été montré une augmentation du stress du RE, suggérant le rôle pathogénique de ce phénomène dans la fibrogénèse pulmonaire (Korfei, Ruppert et al. 2008; Lawson, Crossno et al. 2008). Le stress du RE peut être augmenté dans de nombreuses conditions comme des troubles de l'homéostasie calcique, l'expression de protéines mutantes ou encore des anomalies de glycosylation (Kaufman 2002; Kaufman, Scheuner et al. 2002). Dans le cadre de la FPI, ces conditions peuvent être observées non seulement en cas d'infection virale et de mutation des protéines du surfactant, mais aussi en cas de reflux gastro-œsophagien chronique et dans les situations responsables d'une accumulation des ROS (Selman and Pardo 2006; Korfei, Ruppert et al. 2008). Les facteurs environnementaux comme le tabac et les infections virales peuvent augmenter le stress du RE et ils contribuent au raccourcissement des télomères conduisant à une sénescence prématurée des CEA (Tsuji, Aoshiba et al. 2004).

APOPTOSE DES CEA

Au cours de la FPI, outre leurs modifications phénotypiques, une perte importante de CEA et notamment de pneumocytes de type I est observée. Cette perte cellulaire peut être expliquée par plusieurs phénomènes comme la nécrose épithéliale, la sénescence, l'autophagie ainsi que l'apoptose. L'apoptose qui est un phénomène physiologique dans le renouvellement cellulaire de l'organisme est ici très augmentée et constitue la principale voie de perte cellulaire épithéliale au cours de la fibrose (Jin and Dong 2011).

Le rôle pathogène de l'apoptose des CEA dans la fibrogénèse s'appuie sur des modèles expérimentaux d'apoptose induite notamment par les anticorps anti-Fas chez la souris (Hagimoto, Kuwano et al. 1997; Hagimoto, Kuwano et al. 1997; Matute-Bello, Wurfel et al. 2007) ou des modèles de surexpression du TGF- β (Lee, Cho et al. 2004) ou encore d'autres modèles d'agressions épithéliales alvéolaires (Sisson, Mendez et al. 2010). L'inhibition de l'apoptose prévient la fibrose pulmonaire dans un modèle murin, ce qui vient conforter son rôle pathogène (Kuwano, Kunitake et al. 2001).

Dans le poumon de FPI, et plus particulièrement dans les CEA, une augmentation des marqueurs pro-apoptotiques (p53, p21, bax, caspase 3) est observée avec une baisse des marqueurs anti-apoptotiques (Bcl-2) (Plataki, Koutsopoulos et al. 2005). Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose peuvent être sollicitées dans le poumon de fibrose. La voie extrinsèque va permettre l'activation directe de la cascade des caspases *via* un récepteur membranaire appartenant à la super famille des récepteurs du TNF- α (incluant Fas/CD95 et DR 4/5). Après fixation à son récepteur, le ligand provoque l'activation de la procaspase 8, qui va induire l'apoptose cellulaire après activation des caspases 3-7. La voie intrinsèque part de la mitochondrie et va conduire à une signalisation intra-cellulaire aboutissant à une répression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et une augmentation des protéines pro-apoptotiques telles que Bak, Bax et Bid conduisant à la libération de cytochrome C qui active la procaspase 8-9 et conduit elle aussi à l'étape finale des caspases 3-7. L'effet protecteur des inhibiteurs des caspases et de l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine conforte le rôle de l'apoptose dans la pathogénie de la fibrose dans des modèles murins (Wang, Dembo et al. 2000; Wang, Ibarra-Sunga et al. 2000; Kuwano, Kunitake et al. 2001).

Les CEA apoptotiques sont situées essentiellement à proximité des FFJ, suggérant l'influence de ces derniers (Kuwano, Kunitake et al. 1996; Uhal, Joshi et al. 1998; Barbas-Filho, Ferreira et al. 2001). Le milieu conditionné issu de cultures de fibroblastes de fibrose induit en effet une apoptose des CEA *in vitro* (Uhal, Joshi et al. 1995).

Les principaux inducteurs de l'apoptose sont également ceux qui favorisent la TEM, suggérant que la TEM pourrait constituer un mode d'échappement à la mort cellulaire par apoptose. Le TGF β joue là aussi un rôle principal (Hagimoto, Kuwano et al. 2002; Li, Krishnaveni et al. 2011). L'angiotensine II, dont le rôle physiologique est d'entraîner une vasoconstriction artérielle, constitue un inducteur majeur d'apoptose des CEA (Wang, Ramos et al. 1999; Wang, Alam et al. 2000; Wang, Ibarra-Sunga et al. 2000). La CEA est le siège de la synthèse autocrine de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I sous l'effet de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Ce système est régulé par une seconde enzyme (ECA-2)

qui permet la synthèse d'angiotensine 1-7, qui a un effet anti-apoptotique (Uhal, Li et al. 2011).

L'augmentation du stress du RE, observée par exemple dans les fibroses familiales avec mutation de SPC, constitue un inducteur majeur d'apoptose et souligne là encore la place déterminante de la CEA dans la pathogénie de la maladie (Whitsett 2002).

Enfin, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle pro-apoptotique sur les CEA. Dans le poumon de FPI, une augmentation du niveau de stress oxydant est observée avec des niveaux élevés de peroxyde d'hydrogène, de myéloperoxydase, de monoxyde d'azote et de produits de peroxydation des lipides, alors que les molécules anti-oxydantes comme le glutathion et la super oxyde dismutase sont diminuées (Waghray, Cui et al. 2005) (Psathakis, Mermigkis et al. 2006) (Beeh, Beier et al. 2002) (Kuwano, Nakashima et al. 2003; Rahman, Biswas et al. 2006). Cette élévation du stress oxydant est particulièrement nette dans les CEA au sein des poumons de FPI (Kuwano, Nakashima et al. 2003). Dans un modèle de co-culture, les myofibroblastes activés induisent une apoptose des CEA par la production de peroxyde d'hydrogène (Waghray, Cui et al. 2005). Chez la souris soumise à une agression épithéliale par la bléomycine, il a été montré que l'apoptose des CEA était dépendante de NOX-4 (Geiser, Ishigaki et al. 2004). La prévention des lésions de fibrose chez la souris invalidé pour le gène de NOX-4 et l'amélioration des lésions en cas d'administration de l'antioxydant superoxyde dismutase plaident pour le rôle pro-apoptotique des ROS (Tanaka, Ishihara et al. 2010).

TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE (TEM)

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est, comme l'a défini Betty Hay en 1995 (Hay 1995), un processus biologique qui conduit une cellule épithéliale polarisée, interagissant normalement avec la membrane basale, à subir de multiples modifications morphologiques et comportementales aboutissant au phénotype mésenchymateux. Sont alors augmentées les capacités d'invasion, de migration, d'échappement à l'apoptose des cellules ainsi que leur production de composants de la matrice extra-cellulaire. Phénomène fondamental au cours du développement, ie de la morphogénèse, la TEM est un processus

dynamique et complexe, qui intervient également au cours de processus pathologiques tels que la formation de métastases ou encore de processus dégénératifs, fibrosants. Ce phénomène est distingué de la métaplasie, définie comme une trans-différentiation spontanée d'un phénotype très différencié à un autre (Zeisberg and Neilson 2009).

La contribution de la TEM à la fibrogénèse pulmonaire reste débattue (Kage and Borok 2012; Duffield, Luper et al. 2013). Les arguments de l'existence d'une TEM dans le poumon de fibrose reposent sur des techniques de traçage génétique des cellules dans des modèles murins et d'autre part à la co-localisation dans les poumons de patients atteints de FPI des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux.

Sur les 7 études de traçage des CEA réalisées, 6 ont montré la contribution de la TEM dans la fibrogénèse pulmonaire (Kim, Kugler et al. 2006; Kim, Wei et al. 2009; DeMaio, Buckley et al. 2012; Tanjore, Xu et al. 2009; Degryse, Tanjore et al. 2010; Degryse, Tanjore et al. 2011). Près de 30% des fibroblastes accumulés dans un modèle murin de fibrose seraient issus de la TEM (Tanjore, Xu et al. 2009). Sur poumons humains de fibrose, plusieurs travaux ont montré une co-localisation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (Willis, Liebler et al. 2005; Kim, Kugler et al. 2006; Harada, Nabeshima et al. 2010). Les techniques de microdissection par capture laser (Marmai, Sutherland et al. 2011) ont permis d'isoler l'ARN des CEA, et de montrer l'expression de marqueurs mésenchymateux (calponin 1, α -SMA et collagène type I), confirmant les résultats de cytométrie en flux. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite, la colocalisation de SPC et α -SMA concerne jusqu'à 40% des cellules épithéliales (Pandit, Corcoran et al. 2010). Néanmoins, plus récemment Rock et al. n'ont pas montré de participation des CEA au contingent de cellules mésenchymateuses par microscopie confocale que ce soit dans un poumon murin de fibrose induite par la bléomycine ou de poumon humain de fibrose (Rock and Hogan 2011). La variabilité des résultats d'une équipe à l'autre pose question. Zea Borok, qui a une grande expertise de la TEM émet plusieurs hypothèses (Kage and Borok 2012) évoquant les difficultés techniques du traçage cellulaire et de la résolution des images de microscopie à fluorescence, ainsi que les difficultés de choix de marqueurs mésenchymateux.

La TEM constituerait un mécanisme d'échappement de la CEA lésée, agressée à l'apoptose et participerait par ailleurs à l'élaboration de facteurs pro-fibrosants favorisant la prolifération des fibroblastes et leur activation en myofibroblastes (Kage and Borok 2012). D'autres processus de trans-différenciation cellulaire pourraient contribuer à l'accumulation des fibroblastes et myofibroblastes au cours de la fibrogénèse pulmonaire. Il s'agit des phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse (Hashimoto, Phan et al. 2010; Piera-Velazquez, Li et al. 2011) et de transition mésothélio-mésenchymateuse; Mubarak, Montes-Worboys et al. 2012). Ainsi, dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, Hashimoto et coll. comptent grâce au traçage cellulaire jusqu'à 16% de fibroblastes d'origine endothéliale (Hashimoto, Phan et al. 2010). Cette observation n'est pas propre à la fibrose pulmonaire et a été étudiée dans d'autres affections fibrosantes. Pour ce qui de la transition mésothélio-mésenchymateuse, elle repose sur le constat que la fibrose pulmonaire débute et concerne essentiellement la périphérie du poumon et en particulier l'espace sous-pleural. Les foyers fibroblastiques constituent d'ailleurs un réseau complexe en trois dimensions et à base pleurale (Cool, Groshong et al. 2006). Les cellules mésothéliales de la plèvre ont donc été incriminées dans la physiopathologie de la fibrose et en effet, elles sont retrouvées dans le parenchyme pulmonaire dans un modèle murin de fibrose pleurale (Decologne, Kolb et al. 2007; Decologne, Wettstein et al. 2010). Bien qu'il existe des différences anatomiques évidentes entre la plèvre murine et celle de l'homme, la présence de cellules d'origine mésothéliale a été confirmée sur des explants de poumon de FPI (Mubarak, Montes-Worboys et al. 2012). L'intensité du marquage par la calretinine des cellules mésothéliales était corrélée à la sévérité de la fibrose dans ce travail (Mubarak, Montes-Worboys et al. 2012). A noter que le rôle des cellules mésothéliales a également été confirmé dans un modèle murin de fibrose induite par inhalation de TGF β (Mubarak, Montes-Worboys et al. 2012), soulignant ainsi les interactions étroites entre la plèvre et le parenchyme pulmonaire, comme pouvaient le laisser supposer les pathologies liées à l'exposition à l'amiante.

Témoin d'une particulière plasticité cellulaire épithéliale, la TEM est caractérisée par la perte de la polarité des cellules et de leurs marqueurs épithéliaux (incluant les protéines de jonction ou d'adhésion comme le ZO-1 et l'E-Cadhérine). La réorganisation du cytosquelette accompagne la modification morphologique vers un morphotype stellaire. L'acquisition d'un potentiel migrateur pour affirmer une TEM est plus controversée, notamment dans un contexte de fibrose (Nawshad, Lagamba et al. 2005). La perte du phénotype épithélial peut être attestée par un panel de marqueurs comme le ZO-1, l'E-Cadhérine, des cytokératines, l'aquaporine 5 (AQP5) ou la protéine apicale MUC-1. Le facteur de transcription nucléaire TTF-1 (Thyroid-transcription factor-1), anciennement nommé Nkx2.1, exprimé essentiellement dans les cellules épithéliales du poumon profond peut également être utilisé. L'acquisition du phénotype mésenchymateux peut être suggéré par le panel de marqueurs suivant : la vimentine, α SMA, fibroblast-specific protein-1 (FSP-1), la desmine, le (pro)-collagène, la fibronectine, le connective tissue growth factor (CTGF), la N-Cadhérine, les facteurs de transcription Snail et Slug (SNAI1 et SNAI2), la translocation nucléaire de la β -catenine ainsi que l'expression de MMPs.

La protéine du cytosquelette FSP-1, membre de la famille des protéines S-100 porteuses de Ca, constitue un marqueur prototypique des fibroblastes. La vimentine est un filament intermédiaire du cytosquelette présent non seulement dans les fibroblastes mais parfois également dans les cellules endothéliales, les cellules hématopoïétiques, les cellules gliales voire même certaines cellules épithéliales agressées. Sa place en tant que marqueur de TEM est controversée. L' α -SMA est l'un des six membres de la famille des actines. Présent de façon constitutive dans certaines cellules, il caractérise la cellule myofibroblastique, sans en être spécifique. La β -catenine est une protéine de plaque cytoplasmique qui a un rôle double au cours de la TEM : elle lie les cadhérines au cytosquelette et sert de facteur transcriptionnel avec le facteur cellulaire T. Ce complexe contrôle directement l'expression génique associée à la TEM et en particulier SNAI1. Présente sur la membrane cellulaire dans

les cellules épithéliales normales, sa localisation est cytoplasmique voire nucléaire en cas de TEM (Gavert and Ben-Ze'ev 2007).

Un des évènements principaux de la TEM reste la répression de l'E-Cadhérine, protéine de jonction intercellulaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines, garant du phénotype épithélial et conduisant à la relocalisation de la β -catenine dans le noyau, permettant son interaction avec Wnt. On parle de switch des cadhérines avec la baisse de la E-Cadhérine parallèlement à la hausse de la N (neural) -Cadhérine, voire de la OB (osteoblaste)-Cadhérine (Strutz, Zeisberg et al. 2002). De même, on assiste au cours des processus de TEM à un switch des intégrines, qui sera propre à chaque tissu concerné.

L'absence de spécificité de ces marqueurs pris isolément rend nécessaire l'utilisation de plusieurs d'entre eux et la conjonction claire de la perte du phénotype épithélial et l'apparition des marqueurs mésenchymateux. Néanmoins, puisqu'il est question d'un phénomène dynamique, les cellules peuvent être observées à des phases de transition rendant difficile l'application de critères stricts. Pour illustrer une TEM, l'idéal est donc d'observer la coexistence des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans la même cellule, d'où la pratique des co-marquages dans la plupart des travaux menés dans ce domaine. Enfin, l'activation des voies de signalisation de la TEM est considérée par certains auteurs comme le seul garant de l'existence d'un tel phénomène (Duffield, Lopher et al. 2013; Lamouille, Xu et al. 2014).

LES DIFFERENTS TYPES DE TEM (1, 2, 3)

AU COURS DU DEVELOPPEMENT (TEM DE TYPE 1 ET DE TYPE 2)

La formation des tissus et des organes au cours de l'embryogénèse fait intervenir la notion cruciale de plasticité cellulaire aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Thiery and Sleeman 2006). La TEM intervient dans l'implantation utérine de l'embryon et au cours de l'embryogénèse elle-même. Elle existe initialement à la phase de gastrulation, permettant de passer d'une monocouche de cellules (épiblaste) à 3 couches germinales, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. On parle alors de TEM de type 1, conduisant à la formation de

cellules mésenchymateuses multi-potentes et non à des fibroblastes. L'ectoderme forme la peau et le système nerveux. Le mésoderme et l'endoderme contribuent à la formation de différents tissus de l'organisme adulte (essentiellement du squelette et du tissu cardiaque pour le premier et du tube digestif pour l'autre) et sont donc le siège de multiples étapes de TEM et de transition mésenchymato-épithéliale (TME) (Acloque, Adams et al. 2009). Ce potentiel de TME est d'ailleurs un élément caractéristique de la TEM de type 1 (Zeisberg and Neilson 2009). Le poumon est issu d'un petit diverticule de la bouche antérieure de l'endoderme. Les phénomènes de branching décrits au cours de la morphogénèse pulmonaire impliquent une coordination épithélio-mésenchymateuse étroite orchestrée par des signaux cellulaires et extra-cellulaires. A cette phase du développement, la TEM aboutit à la production de fibroblastes composant les tissus matures ; elle est alors désignée TEM de type 2.

DANS LES TISSUS ADULTES (TEM DE TYPE 2 ET DE TYPE 3)

A l'âge adulte, le bain de cytokines généré par des agressions tissulaires persistantes conduit à la formation de nombreux fibroblastes participant au processus de fibrogénèse (Thiery 2006), dans le cadre d'une TEM de type 2 (Kalluri and Neilson 2003; Zeisberg and Neilson 2009). Quant à la TEM de type 3, elle désigne les phénomènes observés au cours des carcinomes invasifs (Yang and Weinberg 2008). La finalité n'est alors pas la formation de fibroblastes, mais plutôt l'acquisition des potentiels de migration (Zeisberg and Neilson 2009). La TEM est en effet reconnue comme étant un processus de formation des métastases de nombreux cancers solides et témoigne de leur agressivité (Thompson, Torri et al. 1994; Xue, Plieth et al. 2003; Thiery, Acloque et al. 2009). Les phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse et mesothélio-mésenchymateuse sont classés dans les TEM de type 2. Ils impliquent également le rôle du TGF β et de la voie de signalisation Smad2 comme décrit plus loin au cours de la TEM.

LES MODULATEURS DE LA TEM ET LES VOIES DE SIGNALISATION

Dans différents tissus, la cellule épithéliale agressée et lésée est considérée comme chef d'orchestre des processus fibrosants. Les premiers travaux ont été réalisés dans le rein où des modifications phénotypiques évocatrices de TEM ont été observées dans un modèle d'agression aiguë du rein conduisant à une fibrose rénale (Iwano, Plieth et al. 2002). Certains auteurs ont montré que l'induction de l'expression du facteur de transcription SNAI1 chez une souris transgénique induit une fibrose rénale (Boutet, De Frutos et al. 2006).

LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES

LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ β -CATENINE

Le terme Wnt est un acronyme issu des noms de 2 gènes « *wingless* » et « *int-1* », découverts de façon parallèle, et qui codent pour la même protéine. La famille Wnt comprend 19 membres de glycoprotéines avec des résidus cystéine fortement conservés. La protéine Wnt subit des modifications post-traductionnelles la rendant hydrophobe. Trois voies de signalisation impliquant Wnt sont décrites avec notamment la voie Wnt/ β -caténine, la voie Wnt/calciun via la calmoduline kinase II et la protéine kinase C et enfin la voie Wnt/JNK à travers de petites GTPases.

En l'absence de ligand Wnt, la β -caténine subit une phosphorylation et une dégradation après ubiquitination. Dans le cas contraire, elle se localise dans le noyau et permet la transcription de gènes définis. L'activation constitutive de la voie β -caténine conduit à des anomalies épithéliales avec dysplasies épithéliales et une localisation ectopique de pneumocytes II.

LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SNAI, ZEB ET TWIST

Les activateurs et les répresseurs de TEM ont un rôle variable selon le contexte et le microenvironnement et vont agir sur des molécules effectrices intra-cellulaires, comme la famille des GTPases (Ras, Rho, Rac) ou des membres de la famille des Src-tyrosine kinases.

Ces voies de signalisation vont aboutir à l'activation de régulateurs transcriptionnels comme les snails (SNAI1 et SNAI2) [Figure 8].

SNAI1 et 2 sont des protéines en doigt de zinc anciennement nommées respectivement Snail et Slug. Ces facteurs de transcription ont un rôle important au cours des différents types de TEM, que ce soit donc au cours du développement ou en pathologie (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). Leur expression induit notamment une répression transcriptionnelle de la protéine de jonction E-Cadhérine ainsi que des gènes Crumbs responsables de la polarité des cellules. Ils assurent la modification morphologique et la mobilité des cellules en agissant par ailleurs sur l'expression des marqueurs mésenchymateux. Ils agissent également sur l'expression de MMP et inhibent la prolifération cellulaire *via* la répression de la cycline D. Ils protègent de la mort cellulaire programmée *via* des agonistes de Bcl et la suppression de caspases. La phosphorylation de SNAI conduit à son passage du noyau vers le cytoplasme, ce qui amène une inactivation de ses propriétés de facteur transcriptionnel. Le facteur NF- κ B empêche la phosphorylation de SNAI1 *via* une glycogène synthase kinase (GSK)-3, empêchant ainsi son inactivation (Wu, Evers et al. 2009).

TWIST est une protéine en hélice dont l'activité comme facteur transcriptionnel opère au cours de la différenciation cellulaire. Il intervient essentiellement au cours de la morphogénèse et apparaît à la phase embryonnaire précoce (Castanon and Baylies 2002). Il a été également impliqué dans les fibroses et les métastases de cancer (Yang, Wu et al. 2008). Il agit le plus souvent en synergie avec Snail, mais peut parfois mener une action indépendante comme cela a été observé au cours du cancer métastatique (Yang, Mani et al. 2004).

FOXC2 (Forkhead box C2) est un inducteur pléiotrope de TEM, notamment au cours du développement et de la formation des métastases.

ZEB (pour zinc finger E-Box binding homeobox) est également un facteur de transcription impliqué dans la TEM et agit notamment comme répresseur d'E-Cadhérine.

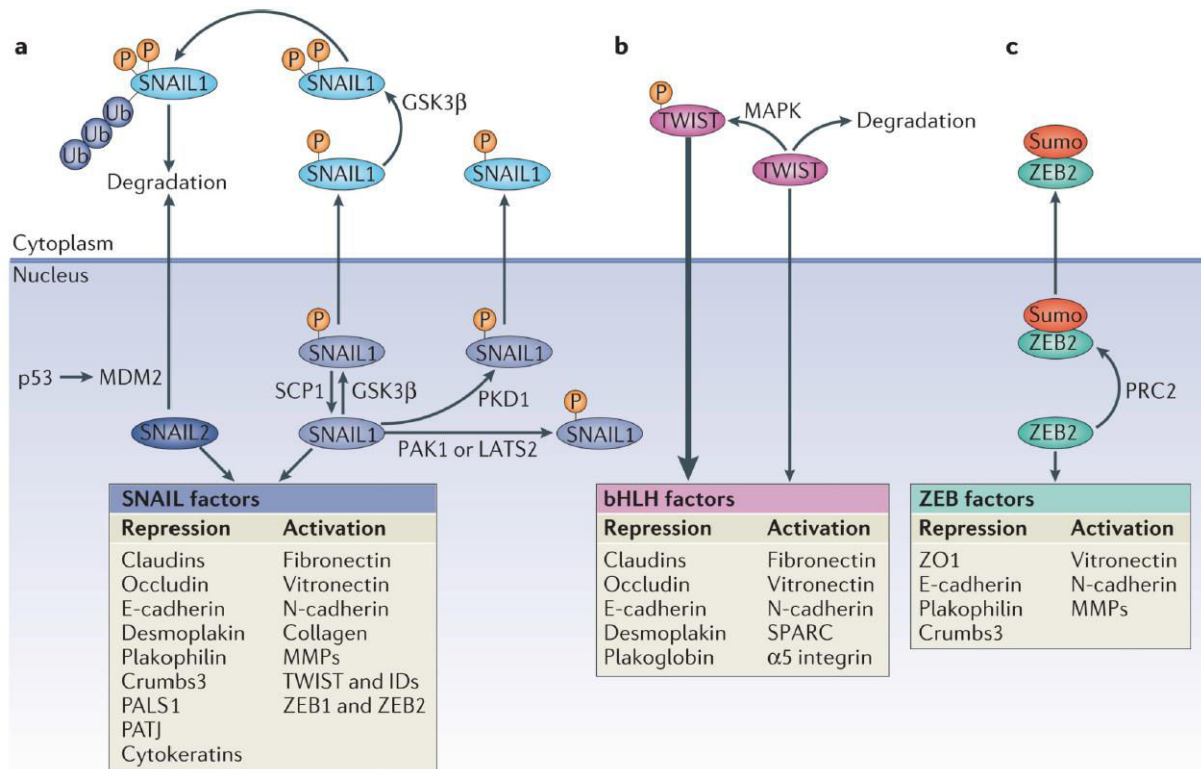


Figure 8 : Rôle et régulation des principaux facteurs de transcription de la TEM (d'après (Lamouille, Xu et al. 2014))

LES INDUCTEURS DE TEM

La TEM est un point de convergence de l'inflammation et des pathologies létales (Lopez-Novoa and Nieto 2009). Les médiateurs sécrétés comme le $TNF\alpha$ et le $TGF\beta$ contribuent à l'activation de $NF-\kappa B$ et donc à l'expression de $SNAI$, favorisant ainsi la TEM [Figure 9]. Les ROS peuvent également induire $SNAI$. Bien que réduire l'oxygénation des cellules cancéreuses constitue dans certains cas une approche thérapeutique (anti-angiogéniques), le rôle de l'hypoxie a été incriminé dans l'invasion tumorale *via* $HIF1\alpha$, activateur potentiel de Twist et d'autres activateurs de TEM. Les principaux effecteurs impliqués dans la TEM ont été conservés au cours de l'évolution et incluent les molécules Wnt, les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs), les molécules snails, le facteur nucléaire $NF-\kappa B$ et l'E-Cadhérine.

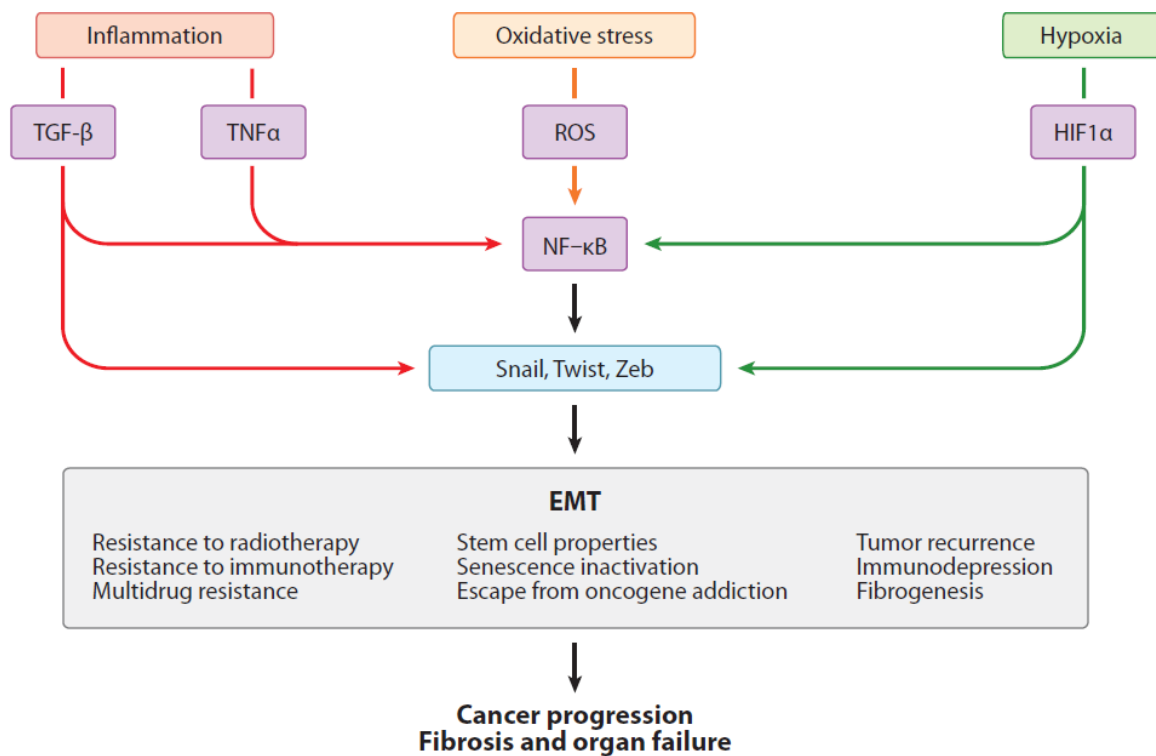


Figure 9: Schéma des principales voies pouvant conduire à l'activation des facteurs de transcription de la TEM (d'après (Nieto 2011)).

De nombreux signaux extra-cellulaires, y compris des éléments de la matrice extra-cellulaire comme le collagène et l'acide hyaluronique peuvent induire une TEM permettant aux cellules de l'endoderme de contribuer avec le mésoderme aux cellules mésenchymateuses.

Principal facteur profibrosant, le TGFβ1 constitue le prototype même de l'inducteur de TEM (Willis, Liebler et al. 2005; Willis and Borok 2007). Le TGFβ1 est une cytokine ayant en effet de multiples fonctions permettant de réguler la morphogénèse tissulaire et sa différenciation à travers un rôle sur la prolifération, la différenciation, l'apoptose des cellules mais aussi sur la production de matrice extra-cellulaire.

Le **TGFβ1** est un inducteur majeur de TEM au cours du développement mais aussi en carcinogénèse et dans les processus fibrosants avec différents isoformes ayant un effet variable selon le contexte (Nawshad, Lagamba et al. 2005). En cancérologie, les interactions

de TGF β et de Ras conduisent à une activation autocrine de la synthèse du TGF participant à l'agressivité des tumeurs (Janda, Lehmann et al. 2002). Le TGF β 1 est impliqué dans la TEM de différentes cellules épithéliales, comme celles du tube contourné proximal dans le rein, celles de l'œil ou bien du poumon. L'implication de Smad3, essentielle à la signalisation du TGF β , dans la TEM des processus fibrosants a été clairement démontrée *in vitro* et *in vivo* dans l'œil et le rein (Sato, Muragaki et al. 2003; Saika, Kono-Saika et al. 2004). Ainsi, dans l'œil ou le rein des souris ayant une invalidation du gène codant pour Smad3, la TEM est abolie y compris après stimulation par le TGF β (Sato, Muragaki et al. 2003; Saika, Kono-Saika et al. 2004). Les rôles respectifs de Smad2 et Smad3 ont été soulignés selon le type cellulaire concerné (Willis and Borok 2007). Smad7, antagoniste de la signalisation de TGF β ou encore le BMP-7 agissant par la voie des Smad, peuvent prévenir la fibrose dans les cellules rénales ou rétiniennes. Dans un modèle de souris triple transgénique avec marquage des CEA de type II et surexpression du TGF β par vecteur adénoviral, un tiers des fibroblastes observés dans la fibrose pulmonaire induite sont X-gal positives soulignant l'importance de la TEM induite par le TGF dans la fibrogénèse (Kim, Kugler et al. 2006). Le TGF β peut également emprunter des voies de signalisation indépendantes de Smad et qui impliquent RhoA, Ras, MAPK, PI3 kinase, Notch, et la voie de signalisation Wnt (Zavadil, Bitzer et al. 2001). Enfin, il existe des interactions selon le type cellulaire entre le TGF β et les voies de signalisation Wnt/ β catenine, SNAI1 et SNAI2 ou encore TWIST.

Selon le contexte, la TEM peut être induite par de nombreux médiateurs extracellulaires autres que le TGF β , comme le FGF2, l'EGF, le CTGF, l'insulin-like growth factor-2 (IGF-II), l'interleukine-1 (IL-1), l'hépatocyte growth factor (HGF), ou encore les ligands de Wnt (Zavadil and Bottinger 2005). Les effets de ces médiateurs peuvent être potentialisés par les interactions avec les éléments de dégradation de la membrane basale, la perte d'interaction matrice/intégrines ou encore les MMPs (Kim, Wei et al. 2009; Chapman 2011). La matrice provisoire formée de fibrine et de fibronectine induit une TEM en l'absence même de TGF β 1 (Kim, Kugler et al. 2006).

HIF α a été incriminé dans les phénomènes de TEM essentiellement dans les modèles de fibrose rénale induite (Higgins, Kimura et al. 2007; Zhou, Dada et al. 2009).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kinnula 2008; Kinnula and Myllarniemi 2008) apparaissent également comme pourvoyeurs de TEM. L'H₂O₂, connu pour augmenter le stress oxydant extra-cellulaire, n'a pas d'effet sur le phénotype épithélial des CEA *in vitro* (Felton, Borok et al. 2009). En revanche, l'augmentation des ROS intracellulaires provoquée par le TGFβ, semble être incriminée dans la TEM observée sur des lignées de CEA de rats (Felton, Borok et al. 2009).

HSP27 (heat shock protein) intervient dans la TEM au cours de la fibrogénèse pulmonaire en particulier dans un modèle murin de fibrose induite par instillations d'un vecteur adénoviral couplé au TGFβ dans l'espace pleural. Le rôle de **HSP27** a été souligné plus particulièrement au cours de la transition mesothélio-mésenchymateuse (Wettstein, Bellaye et al. 2013). L'inhibition de cette protéine de choc thermique a permis de bloquer *in vitro* l'EMT induite par le TGFβ et dans un modèle murin de prévenir la fibrose pulmonaire.

LES REPRESSEURS DE TEM

Parmi les modulateurs de TEM, on s'intéresse bien sûr beaucoup aux éléments répresseurs. **Le BMP-7** permet de contrer *in vivo* dans le rein la TEM induite par le TGFβ via Smad3 (Zeisberg, Shah et al. 2005). Ce phénomène est également décrit dans l'œil où la surexpression de **Smad7** empêche la survenue d'une TEM. En effet, comme BMP7, Smad7, antagoniste de la signalisation Smad de TGFβ peut prévenir la fibrose dans les cellules rénales ou cornéennes. L'importance de la TEM induite par le TGFβ dans la fibrogénèse est soulignée dans un modèle de souris triple transgénique avec marquage des pneumocytes de type II et surexpression du TGFβ par vecteur adénoviral, un tiers des fibroblastes observés dans la fibrose pulmonaire induite sont X-gal positives (Kim, Kugler et al. 2006).

Le rôle complexe de l'**HGF** dans les interactions épithélio-mésenchymateuses a été étudié dans le poumon (Crestani, Marchand-Adam et al. 2012). Ce facteur de croissance bloque la TEM des cellules épithéliales rénales en augmentant le corépresseur de Smad, SnoN, conduisant à la formation de complexes inactifs SnoN/Smad (Yang, Dai et al. 2005).

La **N-acétyl-cystéine**, substrat du glutathion, puissant anti-oxydant permet de limiter la TEM induite par le TGF β *in vitro* selon les travaux de l'équipe de Z. Borok (Felton, Borok et al. 2009). Cet effet bénéfique semble être expliqué par la restauration du stock de glutathion mais aussi par l'inhibition de la synthèse de ROS intra-cellulaires sous l'effet du TGF β . La NAC semble empêcher la cascade de signalisation induite par le TGF β en agissant en particulier sur la phosphorylation de Smad3 (Felton, Borok et al. 2009).

Le monoxyde d'azote (**NO**), qui est important dans le développement pulmonaire, et qui peut être bénéfique au cours des agressions pulmonaires, semble avoir une action directe sur les CEA, en empêchant les phénomènes de TEM. Il existe 3 isoformes de NO, à savoir nNOS pour la forme neuronale, iNOS pour la forme inducible et eNOS pour la forme endothéliale. Il a été montré que ces deux derniers isoformes sont présents dans les CEA et qu'ils interviennent dans le maintien du phénotype épithélial. Le TGF β provoque une baisse de l'expression d'eNOS, dont la supplémentation prévient entre autres les phénomènes de TEM (Vyas-Read, Shaul et al. 2007).

CEA ET FACTEURS GENETIQUES ET EPIGENETIQUES

En tout état de cause, la fibrose pulmonaire semble survenir sur un terrain prédisposé dont l'exploration met en avant le rôle majeur des CEA, qui sont concernées par la plupart des anomalies génétiques à l'origine de fibroses familiales (Thomas, Lane et al. 2002; Armanios, Chen et al. 2007; Tsakiri, Cronkhite et al. 2007; Korfei, Ruppert et al. 2008). Les travaux réalisés mettent en évidence les gènes de susceptibilité à la fibrose pulmonaire, dont la survenue est soumise à l'influence des facteurs épigénétiques.

Les PID familiales suivent une hérédité mendélienne avec une transmission le plus souvent dominante autosomique de pénétrance variable (Lawson, Loyd et al. 2011; Spagnolo, Grunewald et al. 2014). Les mutations des gènes des protéines du surfactant (SPB, SPC) (Thomas, Lane et al.), responsables dans certains cas d'un stress du réticulum endoplasmique ciblent essentiellement les CEA (Korfei, Ruppert et al. 2008). Les mutations des gènes codant pour le complexe des télomérases (Armanios, Chen et al. 2007; Tsakiri, Cronkhite et al. 2007), impliquées dans la sénescence cellulaire prématurée, concernent

également la CEA. La télomérase, ribonucléoprotéine associant un composant ARN *TERC* et une sous-unité protéique, la reverse transcriptase *TERT*, permet de catalyser l'addition des télomères, séquences répétitives d'ADN $(TTAGGG)_n$ à l'extrémité des chromosomes. Elles empêchent ainsi le raccourcissement progressif des télomères au cours de la réplication de l'ADN à chaque division cellulaire. La prévalence des mutations hétérozygotes du complexe télomérase est estimée à 18% des PID familiales, et à 1-3% des PII sporadiques avec essentiellement des mutations de *TERT* (Armanios, Chen et al. 2007; Diaz de Leon, Cronkhite et al.). La plus grande analyse pan génomique réalisée jusque-là est celle de Fingerlin et al. incluant 2492 patients ayant une PII (avec une majorité de FPI) et plus de 6000 témoins (Fingerlin, Murphy et al. 2013). Ce travail confirme les associations génétiques impliquant *TERC* situé en 3q26, *TERT* situé en 5p15, et *MUC5B* situé en 11p15) et identifie 7 nouveaux loci concernant des gènes impliqués dans l'immunité innée, l'adhésion intercellulaire (le gène *DSP*, locus 6p24.3 codant pour un desmosome) et la réparation de l'ADN. Le risque de développer une FPI est également associé au gène *OBFC1*, qui intervient dans la longueur des télomères, soulignant ainsi le rôle pathogénique de la sénescence cellulaire au cours de la FPI. Le polymorphisme du promoteur du gène *MUC5B*, associé aux formes familiales mais aussi aux formes sporadiques de FPI, a également été mis en évidence par cette approche génétique. Une forte association entre le polymorphisme rs35705950 du promoteur du gène de *MUC5B* et la fibrose pulmonaire familiale ou sporadique a ainsi été mise en évidence. Ce polymorphisme est présent chez 34% des patients ayant une PID familiale, 38% de ceux ayant une FPI sporadique et 9% des témoins (Seibold, Wise et al. 2011). Ce polymorphisme semble de façon intéressante conférer un meilleur pronostic (Peljto, Zhang et al. 2013). En immunohistochimie, on note une surexpression de *MUC5B* qui se distribue dans les zones de fibrose à l'interface entre les bronchioles et les alvéoles et notamment dans les territoires d'hyperplasie épithéliale adjacents aux lésions de rayon de miel microscopique. La protéine *MUC5B* étant exprimée dans le gel muqueux de l'épithélium bronchiolaire, ses anomalies sont habituellement associées aux affections chroniques des petites voies aériennes. Dans le cadre de la fibrose pulmonaire, plusieurs hypothèses pathogéniques sont formulées (King, Pardo et al. 2011; Seibold, Wise et al. 2011; Spagnolo, Grunewald et al. 2014). L'excès de

mucus serait responsable d'un défaut de clairance des agents extérieurs, potentiels facteurs d'agression des CEA. Cet excès de mucus pourrait constituer un obstacle physique à la re-épithélialisation. Le phénomène de bronchiolisation des espaces alvéolaires décrits au cours de la FPI, pourrait constituer une autre approche pathogénique. Enfin, la participation de MUC5B dans l'augmentation du niveau de stress du RE est proposée (Spagnolo, Grunewald et al. 2014).

Exprimé dans les CEA et les macrophages alvéolaires, ELMOD2 est un des premiers gènes à avoir été mis en évidence ainsi dans une population Finlandaise (Hodgson, Pulkkinen et al. 2006). Son rôle dans l'immunité innée et la pathogénie de la maladie reste à définir et le séquençage de ce gène n'a pas identifié la mutation. Plus récemment, de nouveaux variants associés à la FPI ont été mis en évidence : les gènes *TOLLIP* (11p15.59) et *SPPL2C* (17q21.31) (Noth, Zhang et al. 2013). Leur expression est diminuée dans le poumon de FPI. *TOLLIP* est un régulateur de l'immunité innée qui s'associe avec Smad7, qui lui-même inhibe dans la cascade de signalisation du TGF β . Il semble donc être vraisemblablement impliqué dans la pathogénie de la FPI (Spagnolo, Grunewald et al. 2014).

L'apparition de la maladie à un âge avancé que ce soit dans la forme sporadique ou dans certaines formes familiales souligne l'importance des altérations épigénétiques dans la pathogénie de la FPI. Ces anomalies consistent en des modifications réversibles de la structure de la chromatine sans modification de la séquence nucléotidique et incluent la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones, ou encore la régulation des microARN. Ces microARN sont des petits ARN non codants de 22 nucléotides qui régulent l'expression post-transcriptionnelle de gènes cibles. Il a été montré une variation de divers microARN dans le poumon de FPI intervenant dans les éléments déterminants de la maladie. Certains microARN ciblent les fibroblastes quand d'autres concernent les CEA. Let-7d, miR-200, et miR-326 ciblent la signalisation du TGF β et sont diminués tandis que miR-21, qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse est augmentée dans les CEA de FPI (Pandit, Milosevic et al. 2011; Yang, Banerjee et al. 2012; Yamada, Kubo et al. 2013). Certains microARN ont un rôle particulier dans la réactivation de gènes fœtaux impliqués dans la morphogénèse

comme Wnt/ β caténine et Sonic hedgehog, qui contribuent à l'activation anormale des CEA et des fibroblastes (Selman, Pardo et al. 2008). En effet, certains microARN impliqués dans le développement sont dérégulés dans la FPI. Ainsi, la surexpression de la voie Wnt/ β caténine constatée dans le poumon de FPI (Chilosi, Poletti et al. 2003; Konigshoff, Kramer et al. 2009; Konigshoff and Eickelberg 2010) est corrélée avec la baisse de miR-375 et miR-487b, qui ont pour cible Frizzled 8 et WNT5A. L'augmentation de miR-154, qui cible les inhibiteurs de Wnt, entraîne par conséquent une activation de cette voie (Wang, Huang et al. 2013) (Milosevic, Pandit et al. 2012).

TRAITEMENT DE LA FPI

A ce jour, seule la transplantation pulmonaire améliore la survie des patients ayant une FPI avec une médiane de survie post-greffe estimée à 4,5 ans (Egan, Martinez et al. 2005) (Raghu, Collard et al. 2011; Kistler, Nalysnyk et al. 2014). Discutée chez les patients âgés de moins de 65 ans ayant une forme évoluée de la maladie sous réserve de l'absence de contre-indication chez des patients (Kistler, Nalysnyk et al. 2014), cette procédure constitue une alternative thérapeutique seulement pour une minorité de patients. Nombreux patients décèdent sur liste d'attente de greffe (du Bois 2010) (Spagnolo, Maher et al. 2015).

La nocivité des immunosuppresseurs est clairement démontrée au cours de la FPI (Raghu, Anstrom et al. 2012). Des essais cliniques bien conduits et de grande envergure n'ont pas montré de bénéfice significatif pour les médicaments suivants : anti-TNF α (etanercept) (Raghu, Brown et al. 2008), IFN- γ (Bajwa, Ayas et al. 2005), antagonistes des récepteurs de l'endotheline-1 (bosentan, macitentan, ambrisentan) (King, Brown et al. 2011; Raghu, Behr et al. 2013), anti-tyrosine kinase (imatinib mesylate) (Daniels, Lasky et al. 2010), inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 (sildenafil) (Zisman, Schwarz et al. 2010) et plus récemment un anti-coagulant oral (anti-vitamine K, la warfarine) (Noth, Anstrom et al. 2012) et la N-acétylcystéine (NAC) (Martinez, de Andrade et al. 2014). En effet, malgré les connaissances physiopathologiques sur le niveau élevé de stress oxydant dans le poumon de FPI (Kinnula, Fattman et al. 2005), la prise à fortes doses de NAC semble non seulement ne pas être

bénéfique mais elle serait associée à une plus grande fréquence d'événements cardiovasculaires (Martinez, de Andrade et al. 2014).

Les traitements spécifiques dits « anti-fibrosants » actuellement disponibles sont la pirfenidone et le nintedanib, seuls médicaments susceptibles de pouvoir freiner le déclin fonctionnel des patients (Noble, Albera et al. 2011; Richeldi, du Bois et al. 2014 ; Valeyre, Albera et al. 2014). La pirfenidone aurait des propriétés anti-fibrosantes, anti-oxydantes et anti-inflammatoires dont les mécanismes restent mal connus (Oku, Shimizu et al. 2008; Tanaka, Azuma et al. 2012; Macias-Barragan, Sandoval-Rodriguez et al. 2010; Ahluwalia, Shea et al. 2014). Dans les modèles animaux de fibrose, la pirfenidone diminue la production de facteurs profibrosants (cytokines, chemokines, facteurs de croissance comme le TGF- β ou le TNF- α (Iyer, Wild et al. 1995; Oku, Shimizu et al. 2008; Tanaka, Azuma et al. 2012). La pirfenidone permettrait également de diminuer le recrutement de fibrocytes impliqués dans la fibrogénèse dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine (Inomata, Kamio et al. 2014). *In vitro*, la pirfenidone semble inhiber la protéine HSP (heat shock protein)-47, chaperonne spécifique du collagène, conduisant à la baisse de la production de collagène de type I par les fibroblastes (Nakayama, Mukae et al. 2008).

Parmi les molécules très répandues dans la pharmacopée anti-tumorale que sont les inhibiteurs de tyrosine-kinases, le nintedanib a obtenu très récemment l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de la FPI (Richeldi, Costabel et al. 2011; Richeldi, du Bois et al. 2014). Il agit en aval non seulement des récepteurs du PDGF, mais aussi du FGF (fibroblast growth factor) et du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Macias-Barragan, Sandoval-Rodriguez et al. 2010; Wollin, Maillet et al. 2014; Wollin, Wex et al. 2015). Le nintedanib inhibe *in vitro* l'activation en myofibroblastes, la migration ainsi que la prolifération des fibroblastes (sains et de fibrose) induite par les facteurs PDGF-BB, FGF-2 and VEGF (Wollin, Maillet et al. 2014; Wollin, Wex et al. 2015). La baisse de l'accumulation de fibroblastes et myofibroblastes aboutit ainsi à la baisse de dépôt de matrice extracellulaire (Wollin, Maillet et al. 2014; Wollin, Wex et al. 2015).

Différents agents anti-fibrosants sont en cours de développement, incluant ceux ayant pour cible TGF- β 1, IL-13, LPA, CTGF, α v β 6 intégrine, Galectin-3, LOXL2, transglutaminase-2, NOX4, et les voies de JNK, ainsi que ceux stimulant PGE2, HGF, Nrf2, et les voies de PTX-2 (Uzunhan, Nunes et al. 2011; Duffield, Lupper et al. 2013; Spagnolo, Maher et al. 2015; Spagnolo, Sverzellati et al. 2015) [Annexe 2].

Le prototype même de la cytokine pro-fibrosante est le TGF- β 1, mais la multiplicité de ses rôles dont certains sont protecteurs rend les tentatives d'inhibition de cette molécule non seulement complexes, mais aussi risquées. Surexprimée dans l'épithélium lésé ou siège d'une inflammation, l'intégrine α v β 6 semble jouer un rôle clé dans l'activation du TGF- β 1. Un anticorps monoclonal humanisé (STX-100) permettant l'inhibition partielle de cette intégrine est actuellement en phase 2 aux Etats Unis (ClinicalTrials.gov [NCT01371305](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01371305)).

Participant non seulement à l'altération des échanges gazeux mais aussi à la perpétuation du processus fibrosant, les constituants de la MEC ou plutôt les enzymes impliquées dans leur modulation, sont une autre cible thérapeutique. Ainsi, les lysyls oxydases (LOX) et en particulier LOXL2, surexprimé dans le poumon des patients ayant une FPI, mais également dans les tumeurs, interviennent dans l'organisation des fibres de collagène et leur inhibition semble freiner considérablement les lésions de fibrose dans des modèles animaux. Ainsi, le Simtuzumab, inhibiteur de LOXL2 fait l'objet d'un essai international multicentrique de phase 2 dans le traitement de la FPI.

Approche thérapeutique innovante qui repose sur des travaux précliniques convaincants discutés plus bas, l'administration de cellules souches mésenchymateuses (CSM) fait l'objet de vives discussions (Toonkel, Hare et al. 2013).

B. LE SYNDROME DE DETRESSE RESPIRATOIRE DE L'ADULTE

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une affection décrite initialement chez des soldats américains au cours de la guerre du Vietnam (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). Les causes de SDRA sont multiples et elles sont dominées par les processus infectieux. Les mécanismes physiopathologiques sont essentiellement axés sur une altération des barrières épithéliales et endothéliales avec exsudats alvéolaires. Trois phases sont décrites exsudative, fibro-proliférative et de résolution avec possible récupération *ad integrum*. Les connaissances acquises ont conduit à des ajustements dans les soins de réanimation en termes de ventilation et de perfusion permettant une amélioration certes substantielle de la survie mais qui demeure insuffisante et appelle des innovations thérapeutiques très attendues dans ce domaine.

DIAGNOSTIC ET DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DU SDRA

Les critères diagnostiques du SDRA ont évolué depuis leur description originelle qui mentionnait une détresse respiratoire rapidement progressive liée à un œdème pulmonaire non cardiogénique et nécessitant une ventilation mécanique (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). En 1988, un score de 4 points permettait de quantifier la sévérité des lésions pulmonaires basée sur le degré d'hypoxémie, le niveau de pression de fin d'expiration positive (PEEP pour positive end-expiratory pressure), la compliance pulmonaire statique et des infiltrats pulmonaires étendus sur la radiographie de thorax (Murray, Matthay et al. 1988). En 1994, la conférence de consensus Américaine et Européenne recommande des critères simplifiés avec une hypoxémie artérielle définie par une PaO₂/FiO₂ inférieure à 300 mm Hg pour l'ALI (acute lung injury) et inférieure à 200mmHg pour le SDRA et un infiltrat pulmonaire bilatéral à la radiographie de thorax sans élément pour une défaillance cardiaque gauche (Bernard, Artigas et al. 1994). Ces critères simplifiés ont été largement employés, mais ils restaient critiqués pour le défaut d'intégration de la PEEP notamment. Plus récemment ont été proposés des critères dits de Berlin qui distinguent trois catégories

de SDRA selon le degré d'hypoxémie : léger ($200 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$), modéré ($100 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$), et sévère ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$) (Ranieri, Rubenfeld et al. 2012). L'impact de cette classification sur le diagnostic et surtout l'histoire naturelle du SDRA reste à préciser. Toutes ces définitions concernent les patients ventilés et les efforts sont actuellement dirigés vers un diagnostic plus précoce avant même le recours à la ventilation mécanique dans le but de proposer des traitements permettant d'enrayer l'évolution de la maladie.

Sur le plan épidémiologique, une étude prospective a permis d'estimer le nombre annuel de cas d'ALI et de SDRA à 190,000 patients aux Etats Unis (Rubenfeld, Caldwell et al. 2005). Observés également chez l'enfant, le SDRA et l'ALI ont des chiffres d'incidence qui s'élèvent à 78-86 cas/100 000/an (Flori, Glidden et al. 2005; Randolph 2009). L'évolution de ces chiffres semble néanmoins montrer un certain déclin compte tenu des progrès réalisés en matière de techniques ventilatoires et de soins de support (Li, Malinchoc et al. 2011).

FACTEURS DE RISQUE DU SDRA

Les causes de SDRA sont essentiellement infectieuses, qu'ils s'agissent d'infections bactériennes ou virales respiratoires. Les autres causes sont le speiss à point de départ extra-pulmonaire, l'inhalation du contenu gastrique ou encore les traumatismes avec état de choc. Plus rarement, il s'agit d'infections fongiques ou parasitaires, de pancréatites aiguës, des transfusions, des réactions médicamenteuses.

Les facteurs de risque d'ALI et de SDRA conjuguent des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques de susceptibilité à la maladie. L'éthylisme chronique constitue une circonstance majeure de survenue d'ALI et de SDRA ainsi que de défaillance multiple d'organes (Moss and Burnham 2003). Le tabagisme passif ou actif est associé au risque de SDRA après traumatisme fermé (Calfee, Matthay et al. 2011).

Les explorations génétiques réalisées dans ce domaine mettent en avant plus d'une vingtaine de gènes impliqués dans les processus de réparation épithéliale après lésion sévère à savoir la régulation de l'inflammation, la coagulation, la fonction endothéliale, les ROS et

l'apoptose (Gao and Barnes 2009; Meyer, Li et al. 2011; Christie, Wurfel et al. 2012; Kangelaris, Sapru et al. 2012) (Glavan, Holden et al. 2011). Les analyses d'associations pan génomiques récentes ont identifié le gène *PPF1A1*, qui code pour une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, les interactions cellules-matrice, la liprine α comme élément prédictif de la survenue d'un ALI après un traumatisme majeur (Christie, Wurfel et al. 2012). La mortalité des afro-américains ayant un ALI est supérieure à celle des caucasiens. Ce phénomène semble être en partie lié au polymorphisme T-46C (rs2814778) du promoteur du gène Duffy antigène/récepteur pour chemokines (*DARC*), qui est associé à une augmentation de 17% de la mortalité à 60 jours des patients Afro-Américains. Ces patients ont un taux d'interleukine (IL)-8 plus élevé, qui est corrélé au mauvais pronostic (Kangelaris, Sapru et al. 2012). D'autres polymorphismes sont associés à des infections bactériennes ou virales plus sévères (Mizgerd 2008; Opitz, van Laak et al. 2010).

PRONOSTIC DU SDRA

Bien que la mortalité du SDRA ait sensiblement diminué ces vingt dernières années, elle reste élevée avec un taux de mortalité à 60j de 22% (Spragg, Bernard et al. 2010). Selon la NHLBI (pour NIH Heart, Lung and Blood Institute), cette mortalité à J60 est passée de 36% en 1996–1997 à 26% en 2004–2005 (Erickson, Martin et al. 2009; Erickson, Shlipak et al. 2009).

Les facteurs pronostiques identifiés dans ce contexte sont l'existence d'une défaillance associée comme un état de choc, une insuffisance hépatique ou une insuffisance rénale aiguë, un âge supérieur à 60ans, un score de sévérité élevé et bien sûr la profondeur de l'atteinte respiratoire avec PaO_2/FiO_2 inférieure à 100mmHg (Liu, Glidden et al. 2007; Cooke, Kahn et al. 2008; Brown, Calfee et al. 2011).

Plusieurs marqueurs biologiques permettent de prédire la mortalité ou la durée de la défaillance d'organe. Ces molécules reflètent la complexité de la pathogénie du SDRA avec des marqueurs inflammatoires comme les interleukines (IL)-6, IL-8, le tumor necrosis factor receptor-1 (TNF-r1)), des marqueurs d'activation et de lésions endothéliales pulmonaires et

systemiques (von Willebrand factor (VWF)), des marqueurs de lésion épithéliale pulmonaire comme la protéine D du surfactant (SP-D), la molécule RAGE (receptor for advanced glycation end products), ou les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), et enfin l'activation de la coagulation avec inhibition de la fibrinolyse (protein C, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)) (Ware 2006) (Ware, Koyama et al. 2010).

La combinaison de marqueurs cliniques et biologiques permet une meilleure approche pronostique que chacun des indices cliniques ou biologiques pris séparément (Ware, Koyama et al. 2010). Les taux notamment de l'IL-8 et de SP-D semblent avoir une valeur pronostique majeure quand ils sont associés avec des paramètres cliniques, soulignant ainsi l'importance de l'inflammation et des lésions épithéliales dans la pathogénie et la résolution du SDRA (Ware, Koyama et al. 2010).

HISTOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DU SDRA

Les lésions histologiques observées au cours du SDRA consistent essentiellement en un dommage alvéolaire diffus caractérisé notamment par la présence de membranes hyalines [Figure 10]. Trois phases sont décrites, à savoir la phase aiguë exsudative, la phase proliférative ou d'organisation et enfin la phase chronique fibrotique. Ainsi, à la phase aiguë, la première semaine du tableau clinique, l'aspect histologique peut comporter une congestion capillaire un œdème intra-alvéolaire et interstitiel associé à des dépôts de fibrine et de membranes hyalines présentes essentiellement à ce stade (Castro 2006) (Sarmiento, Guardiola et al. 2011). Les thrombi peuvent se former in situ du fait des troubles de la coagulation locale. La phase d'organisation commence après une à deux semaines et elle est caractérisée par la prolifération de fibroblastes entourés de nombreuses cellules inflammatoires s'organisant en tissu de granulation (Ketai and Godwin 1998; Sarmiento, Guardiola et al. 2011). Une hyperplasie des pneumocytes de type II est également observée avec cependant des atypies cytologiques (Sarmiento, Guardiola et al. 2011). La phase fibreuse est caractérisée par des lésions de fibrose interstitielle avec un épaississement des septas alvéolaires par des dépôts de collagène (Castro 2006).

Les autres lésions histologiques visibles au cours du SDRA ou de l'ALI sont des lésions de pneumopathies aigues à éosinophiles, des lésions d'AFOP (acute fibrinous and organising pneumonia) ou encore des lésions de pneumopathie organisée (Obadina, Torrealba et al. 2013).

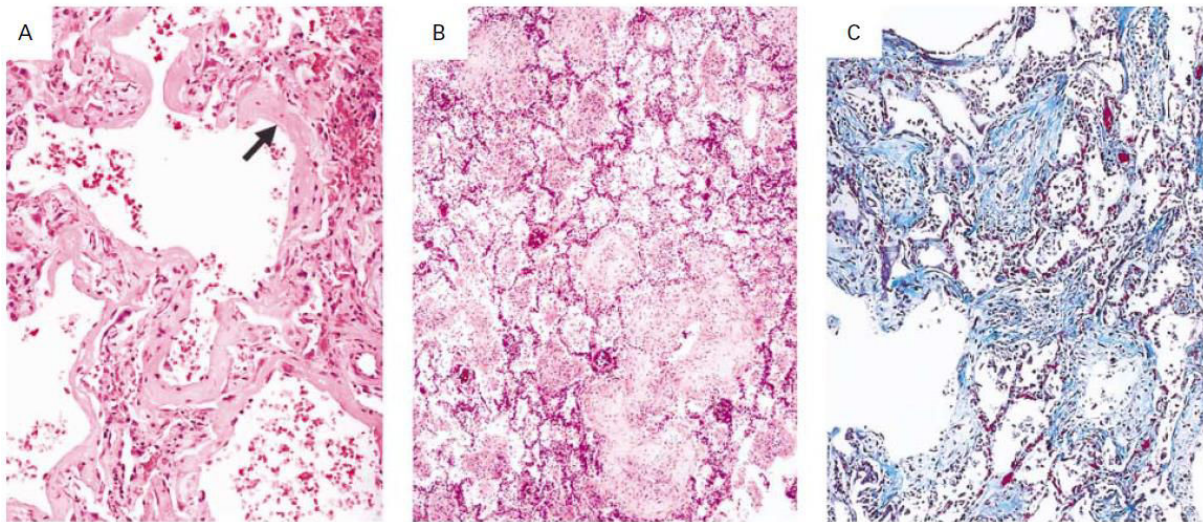


Figure 10 : Histologie pulmonaire montrant un aspect de dommage alvéolaire diffus au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë (Images issues de (Ware and Matthay 2000)).

A. coupe histologique de poumon à la phase précoce du SDRA (coloration hématoxyline éosine x90) ; la flèche montre la présence de membranes hyalines caractéristiques à la phase aiguë. **B :** coupe histologique pulmonaire à la phase de résorption montrant un tissu de granulation comblant les espaces aériens distaux (coloration hématoxyline éosine x60) ; **C** coupe histologique à la phase tardive montrant les dépôts de collagène en bleu nuit (coloration trichrome x60)

L'hypothèse pathogénique actuelle du SDRA repose sur une réponse inflammatoire incontrôlée à une accumulation et à une activation de leucocytes et de plaquettes associés à des désordres du système de la coagulation aboutissant à une altération des barrières endothéliale et épithéliale alvéolaires (Ware and Matthay 2000; Matthay, Ware et al. 2012). Les lésions endothéliales et alvéolaires peuvent être en partie liées aux produits des cellules

immunitaires innées comme les traps des polynucléaires neutrophiles, filets de chromatine et de facteurs anti-microbiens capturant les pathogènes, ou encore à la libération de protéases, de ROS ou de chemokines et de cytokines diverses. L'équilibre entre les effets protecteurs de la réponse inflammatoire et ses effets nocifs est garant de l'élimination du pathogène et de la réparation alvéolaire après lésion.

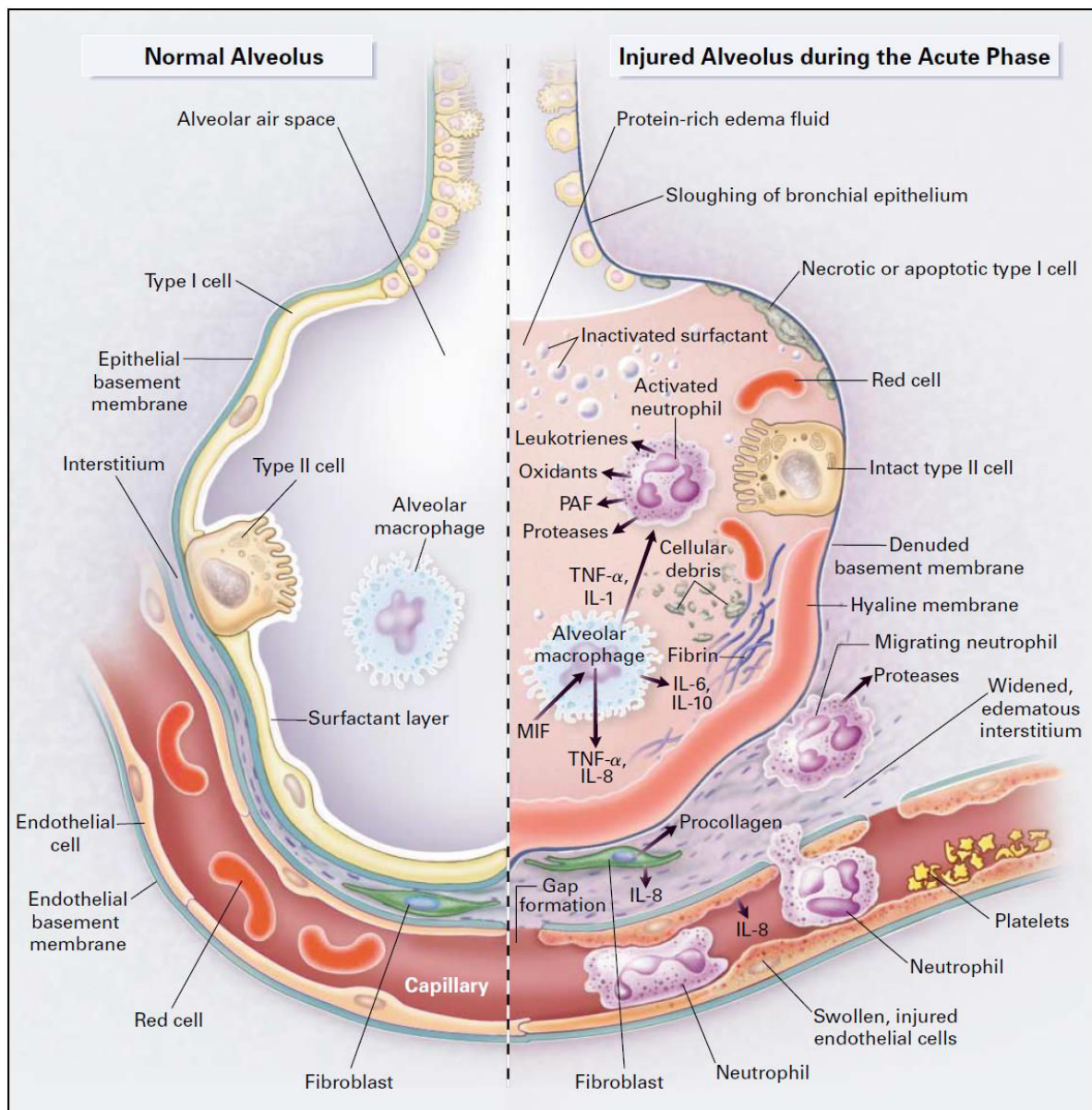


Figure 11 : Schéma de la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aiguë.
D'après (Ware and Matthay 2000).

L'augmentation de la perméabilité microvasculaire est à l'origine de la constitution d'un œdème alvéolaire riche en protéines, dont le défaut de clairance est une des principales caractéristiques du SDRA et de l'ALI. Cette perméabilité capillaire est également responsable du passage de leucocytes et d'hématies dans la lumière alvéolaire, ainsi que de nombreuses cytokines au cours du SDRA. La cadherine de l'endothélium vasculaire est une protéine de jonction impliquée dans la barrière endothéliale des micro-vaisseaux pulmonaires. Elle peut être la cible de nombreux facteurs comme le VEGF, le TNF, la thrombine et contribuer ainsi à l'installation de l'œdème pulmonaire. La stabilisation de ces protéines de jonction et notamment de la liaison cadherine-caténine permet de limiter l'œdème pulmonaire dans un modèle murin soumis au LPS. La préservation de l'intégrité endothéliale constitue en effet une approche thérapeutique nouvelle qui requiert une connaissance des mécanismes moléculaires impliqués (Bhattacharya and Matthay 2013). Selon l'hypothèse, certes controversée, de Palade (Stan, Roberts et al. 1997), les protéines traversent la barrière endothéliale du plasma vers l'interstitium par transcytose, à l'aide de microvésicules, les cavéoles (Stan, Roberts et al. 1997). Les souris déficientes en caveoline-1 ne font pas d'ALI après exposition au LPS ou à l'hyperoxie (Garrean, Gao et al. 2006). Cependant, ce déficit en caveoline-1 s'accompagne également d'un défaut d'activation des neutrophiles, éléments essentiels dans les lésions d'ALI (Hu, Ye et al. 2008). Dans les lésions d'origine infectieuse ou non, les neutrophiles s'accumulent dans la microvascularisation pulmonaire, deviennent activés, se dégranulent et libèrent ainsi des médiateurs toxiques comme les ROS, les protéases, des cytokines proinflammatoires (telles que le tumor necrosis factor (TNF)- α) et des molécules pro-coagulantes impliqués dans la perméabilité vasculaire (Matthay and Zimmerman 2005). Enfin, l'apoptose des cellules endothéliales participe à la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale (Bhattacharya and Matthay 2013).

LESIONS EPITHELIALES

L'augmentation de la perméabilité endothéliale est nécessaire mais pas suffisante pour provoquer un œdème pulmonaire. Comme pour les cellules endothéliales, les jonctions serrées entre les cellules épithéliales alvéolaires sont mises à mal par des médiateurs toxiques issus de neutrophiles activés (Zemans, Colgan et al. 2009) et de macrophages (Frank, Wray et al. 2006) mais également du stress mécanique (Davidovich, DiPaolo et al. 2013; Zhang, Pan et al. 2015) et des pathogènes impliqués (Short, Lancet Infect Dis 2014). La ventilation mécanique peut en effet induire une augmentation du stress oxydant et contribuer à la pathogénie des lésions fibreuses et participer à la morbidité du SDRA (Zhang, Pan et al. 2015).

ALTERATION DE LA CLAIRANCE ALVEOLAIRE

L'œdème pulmonaire lésionnel est une des caractéristiques du SDRA. La perte de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire conduit non seulement à la constitution d'un œdème alvéolaire riche en protéines mais empêche également la résorption de celui-ci (Geiser, Atabai et al. 2001), puisque l'efficacité d'un transport vectoriel d'ions et d'eau par l'épithélium alvéolaire suppose que la barrière épithéliale soit structurellement intacte. Elle suppose également que l'activité des principales protéines transportant le Na⁺ (Na-K-ATPase et ENaC notamment) soit préservée, ce qui n'est pas le cas dans les nombreux modèles animaux d'ALI/SDRA (Goolaerts, Lafargue et al. 2011; Folkesson, Kuzenko et al. 2012; Lecuona, Sun et al. 2013) (Meyer, Li et al. 2011) (Zeyed, Bastarache et al. 2012; Herold, Gabrielli et al. 2013). Chez l'Homme, et plus particulièrement chez les patients hospitalisés en réanimation pour œdème pulmonaire, il a été montré que la clairance du fluide alvéolaire était plus souvent altérée en cas d'œdème lésionnel qu'en cas d'œdème hydrostatique, et que le maintien de la capacité à réabsorber le fluide alvéolaire était associé à un meilleur pronostic vital (Ware 2001). De nombreux facteurs associés au SDRA ont été identifiés comme pouvant altérer

l'activité de la Na, K-ATPase ou d'ENaC [Figure 12]. On peut citer par exemple : l'hypoxie alvéolaire (voir plus loin), l'effet des protéases ou des oxydants libérés par les cellules inflammatoires, les lipopolysaccharides des parois bactériennes, certains virus, les lésions dues à la ventilation à haut volume, et certains médiateurs tels que le TGF β , l'IL-1 β , l'IL-8.

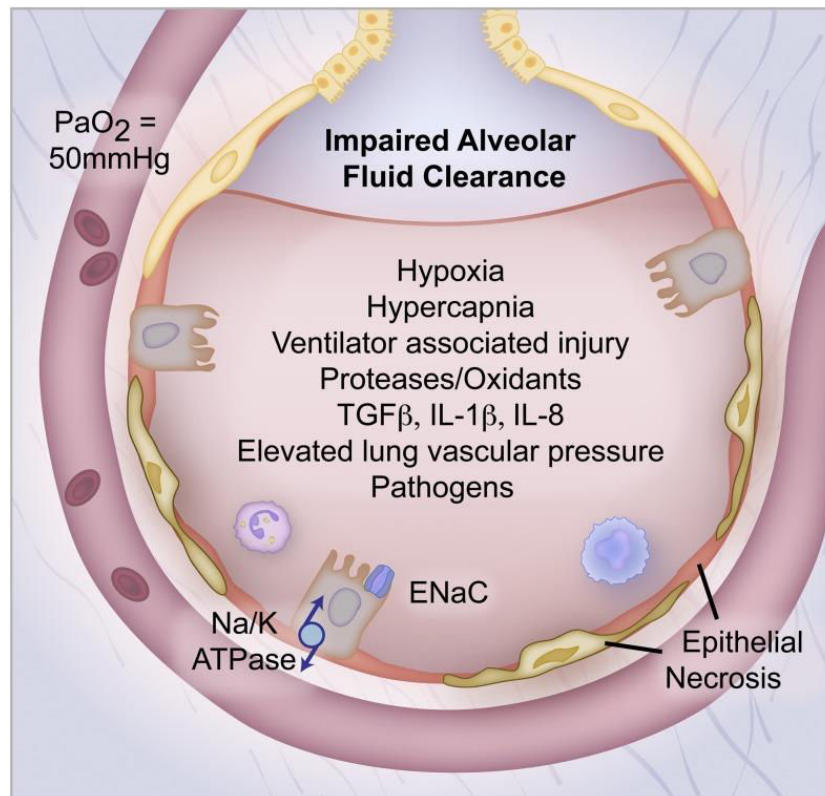


Figure 12: Mécanismes à l'origine de l'altération de la clairance du fluide alvéolaire au cours du SDRA (d'après (Matthay 2014)).

TRAITEMENT DU SDRA

Malgré de nombreux essais thérapeutiques réalisés dans ce domaine, le traitement du SDRA reste décevant avec une forte morbi-mortalité (Curley and McAuley 2014). Les principales limites rencontrées pour ces études sont (1) un nombre insuffisant de patients inclus pour permettre d'observer une différence en termes de mortalité, (2) une grande hétérogénéité de la population étudiée et (3) un défaut de standardisation des variables mesurées (Curley

and McAuley 2014). Sur les 159 essais cliniques randomisés et les 29 méta-analyses portant sur le traitement du SDRA, seuls 3 apportent une réponse favorable avec un impact sur la mortalité (2000; Papazian, Forel et al. 2010; Guerin, Reignier et al. 2013). Il s'agit d'essais cliniques multicentriques portant sur les techniques ventilatoires ayant permis l'inclusion d'un grand nombre de patients. Les tentatives de traitements médicamenteux ont été infructueuses (Annane, Seville et al. 2002; Steinberg, Hudson et al. 2006; Sprung, Annane et al. 2008; Hough 2014; Rubenfeld 2014; Truwit, Bernard et al. 2014).

TECHNIQUES VENTILATOIRES

La ventilation à faible volume courant (V_t), dont le bénéfice a été montré dans un essai multicentrique (2000), permettrait de limiter les agressions mécaniques et notamment les forces d'étirement et de cisaillement au niveau des structures alvéolaires avec une pression de plateau inspiratoire inférieure à 30 cm H₂O. Autre technique ventilatoires permettant d'augmenter le recrutement des alvéoles et de limiter les zones de tension focalisées dans certains territoires, la ventilation en décubitus ventral (DV) a prouvé son efficacité au cours du SDRA (Guerin, Reignier et al. 2013; Lee, Bae et al. 2014). Là encore le mécanisme physiopathologique avancé consiste en une limitation du stress mécanique pulmonaire avec une réduction de l'hyperinflation de certains territoires et un meilleur recrutement des structures alvéolaires postérieures assurant ainsi une certaine homogénéisation de la distribution des forces de tension au sein des poumons (Guerin, Reignier et al. 2013). La méta-analyse de Lee et al. suggère que les patients ayant un rapport PaO₂/FiO₂ <150 sous PEEP 5 cmH₂O et ceux ayant des phases de DV >10h sont plus à même de bénéficier de cette procédure (Lee, Bae et al. 2014). L'optimisation du recrutement alvéolaire par la curarisation ainsi que le maintien d'une PEEP permettrait également d'améliorer l'hématose en diminuant les forces de cisaillement au niveau des structures alvéolaires (Mercat, Richard et al. 2008; Papazian, Forel et al. 2010). Cependant les niveaux de PEEP restent difficiles à préciser, avec une balance étroite entre les effets délétères et les effets bénéfiques selon l'intensité de l'hypoxémie et les zones de poumon « recrutables » (Chiumello, Cressoni et al. 2014).

LES CORTICOÏDES

Le rationnel de l'administration de corticoïdes pour le traitement du SDRA repose entre autres sur le caractère inflammatoire des lésions histologiques observées dans cette affection avec relargage de cytokines pro-inflammatoire et recrutement de cellules inflammatoires dans le poumon. Les cas cliniques et les petites séries rétrospectives mettant en avant le rôle bénéfique des corticoïdes au cours du SDRA ont conduit à des essais cliniques randomisés qui n'ont pas montré de bénéfice de la corticothérapie (Bernard, Luce et al. 1987; Bone, Fisher et al. 1987; Meduri, Chinn et al. 1994; Meduri, Headley et al. 1998). Ces travaux ont, pour la plupart, été réalisés avant l'avènement de la ventilation à faibles volumes (Hough 2014). Néanmoins, les essais thérapeutiques récents évaluant notamment une faible dose de corticoïdes n'ont pas non plus été concluants ainsi que la corticothérapie à la phase tardive du SDRA (Annane, Sebille et al. 2002; Steinberg, Hudson et al. 2006; Sprung, Annane et al. 2008; Hough 2014). Bien que le Collège Américain de Réanimation et de Soins Intensifs recommande de discuter la corticothérapie dans les 14 premiers jours du SDRA, la posologie, la durée et les modalités de décroissance méritent d'être précisées par des études bien conduites prenant en compte les effets délétères à moyen terme et surtout les modalités ventilatoires protectrices (Marik, Pastores et al. 2008; Hough 2014).

LES AUTRES MOLECULES

Les inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-coA)-reductase (les statines) ont été testés au cours du SDRA, compte tenu des effets de ces molécules sur l'inflammation et le stress oxydant (Truwit, Bernard et al. 2014). Aucun bénéfice n'a été observé en termes de survie à 60 jours (Truwit, Bernard et al. 2014). L'interféron β (FP -1201), qui induit une enzyme CD73, qui elle-même a des propriétés anti-inflammatoires et vasculo-protectrices sur l'endothélium vient de faire l'objet d'une étude de phase 1 favorable (Bellingan, Montgomery et al. 2014). Quant au surfactant exogène, son efficacité n'est prouvée qu'en instillations répétées dans les voies aériennes en réanimation pédiatrique voire néonatale (Willson, Thomas et al. 2005).

Enfin, le KGF, principal médiateur mis en avant dans les effets bénéfiques paracrines observés dans les études précliniques concernant les CSM, a fait l'objet d'une étude clinique randomisée sur volontaires sains (Shyamsundar, McAuley et al. 2014), mais n'a pas encore été évalué dans le traitement du SDRA. Le KGF, diminué dans le LBA au cours du SDRA (Chandel, Budinger et al. 2009), est un facteur de croissance épithélial favorisant la prolifération, la survie des CEA et leur production de surfactant. Ce médiateur a également un rôle notable dans la clairance du liquide alvéolaire (Ulich, Yi et al. 1994; Wang, Folkesson et al. 1999; Waters and Savla 1999; Ware and Matthay 2002). Néanmoins, bien que la palifermine soit commercialisée dans le traitement des mucites du patient neutropénique d'hématologie, son administration au cours du SDRA reste anecdotique et mérite une étude bien menée (Morty and Walley 2014).

Très attendue dans ce contexte, la principale innovation dans le traitement du SDRA est la perfusion de CSMh allogéniques (Rubinfeld 2014; Walter, Ware et al. 2014; Masterson, Jerkic et al. 2015; Millar, Fraser et al. 2015; Weiss 2015). Cette approche thérapeutique, développée plus loin, repose sur des données précliniques séduisantes (Walter, Ware et al. 2014). L'étude de phase 1 récemment publiée donne des résultats très encourageants ; l'étude de phase 2 est en cours (Wilson, Liu et al. 2015).

III. HYPOXIE ET CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES

L'hypoxie est définie comme la baisse de la disponibilité en oxygène d'une cellule, d'un tissu voire d'un organisme entier. Directement exposées au gaz alvéolaire, les CEA sont normalement bien oxygénées. Cependant, de nombreuses pathologies pulmonaires peuvent provoquer une hypoxie alvéolaire (Clerici and Planes 2009), que ce soit au cours des agressions alvéolaires aiguës du fait de la présence d'un œdème alvéolaire, ou lors de pathologies parenchymateuses chroniques du fait du remaniement tissulaire comme en témoigne l'expression du facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF-1 α dans les CEA de patients atteints de FPI (Tzouvelekis, Harokopos et al. 2007).

LES REPONSES CELLULAIRES A L'HYPOXIE –ROLE DE HIF

DEFINITIONS

Le contrôle de l'homéostasie de l'oxygène requiert un système complexe pouvant répondre à des situations aiguës et permettre une adaptation de l'organisme à un état d'hypoxie plus prolongée. Toutes les cellules nucléées de l'organisme ont la capacité de détecter une hypoxie et de s'y adapter. Cette adaptation à l'hypoxie exige la coordination de nombreux gènes de réponse et les facteurs HIF ont été identifiés comme les médiateurs clés de cette adaptation. Une base de données des protéines régulées par l'hypoxie a été constituée et compte plus de 3500 protéines affectées de façon variable selon le site et la durée de l'hypoxie (Khurana, Sugadev et al. 2013).

Au niveau moléculaire l'hypoxie aiguë (quelques fractions de secondes à quelques minutes) peut induire des réponses immédiates avec modifications des protéines préexistantes alors que l'hypoxie chronique (plusieurs heures à plusieurs jours) conduit à des réponses plus durables faisant intervenir la synthèse protéique elle-même.

L'exposition à l'hypoxie peut être continue ou intermittente. Les épisodes d'hypoxie-ré oxygénation créent un contexte physiopathologique particulier. Par exemple, alors que l'hypoxie chronique peut favoriser la survenue d'une hypertension pulmonaire, l'exposition

à des épisodes d'hypoxie-reoxygénation conduit plus souvent à l'apparition d'une hypertension artérielle systémique (Prabhakar and Semenza 2012).

Les conditions physiologiques d'oxygénation des tissus diffèrent des conditions de culture cellulaire dites en normoxie, c'est-à-dire 95% d'air et 5% de CO₂. L'air est composé de 21% d'O₂ (ce qui correspond à une P_{O₂} of 147 mm Hg) et 95% d'air représente donc 20% d'O₂ (140 mm Hg), ce qui est nettement plus élevé que la P_{O₂} dans n'importe quel tissu. En effet les P_{O₂} artérielle et veineuse sont respectivement de ~100 mm Hg (~14% d'O₂) et 40 mm Hg (~6% O₂). La P_{O₂} est par ailleurs variable selon les organes ainsi qu'au sein même d'un organe donné selon la distance séparant la cellule et le capillaire. C'est pourquoi, la notion d'hypoxie a une valeur relative à comparer aux conditions usuelles de culture qu'on dénomme peut-être abusivement « normoxie » (Prabhakar and Semenza 2012).

LA SIGNALISATION HYPOXIQUE

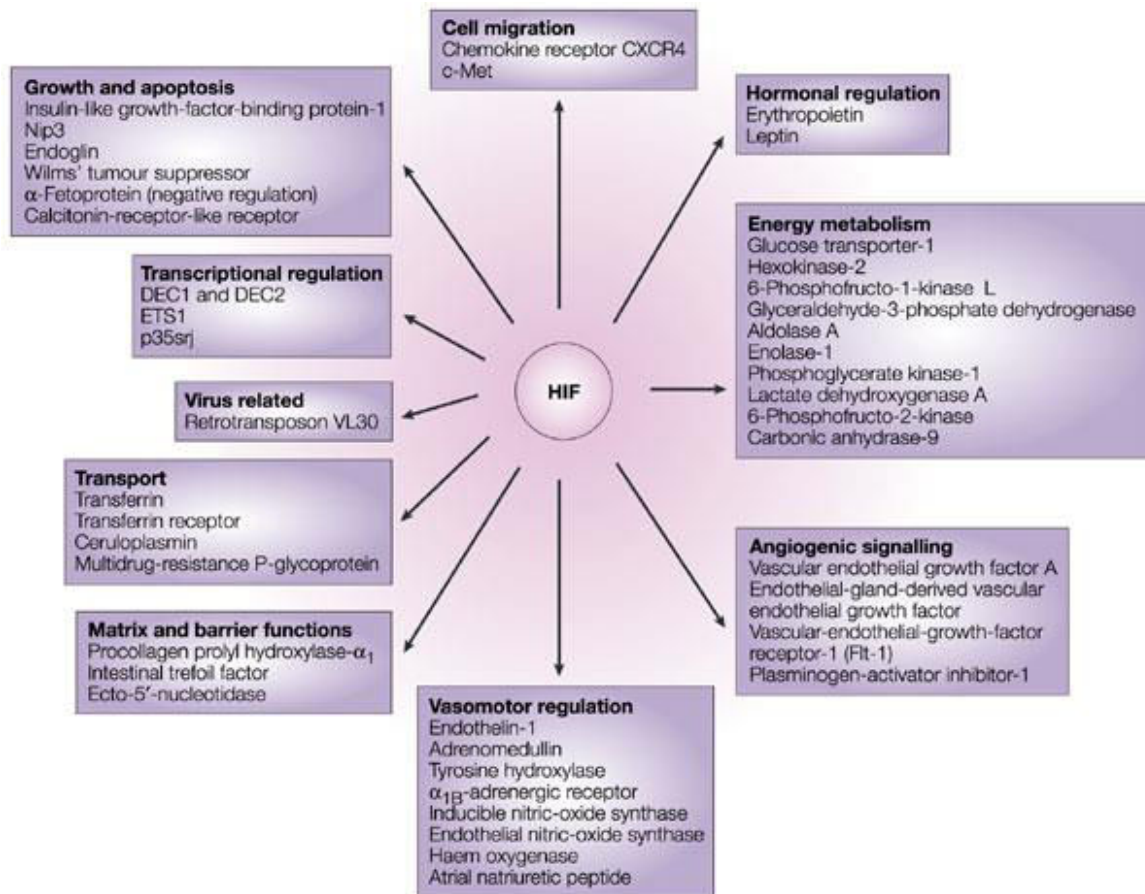
LES FACTEURS HIF

La signalisation hypoxique repose essentiellement sur les facteurs de transcription HIF. Hétérodimères composés de deux sous unités en hélice HIF α et HIF β , ils se lient à un motif ADN, le motif HRE (hypoxia response element), et permettent la transactivation d'une centaine de gènes impliqués dans des réponses systémiques à l'hypoxie comme l'angiogenèse et l'érythropoïèse, mais aussi dans des réponses cellulaires comme le métabolisme énergétique avec la glycolyse anaérobie ou encore la prolifération ou l'apoptose [Figure 13] (d'après (Schofield and Ratcliffe 2004)). HIF β est une protéine nucléaire constitutive alors que les sous-unités cytoplasmiques HIF α (HIF1, HIF2 ou HIF3- α) sont induites (stabilisées) par l'hypoxie. Contrairement à HIF1- α , HIF2- α n'est pas présent dans tous les types cellulaires (Wiesener, Jurgensen et al. 2003). Il est présent essentiellement dans certains vaisseaux et dans le poumon. Aussi, les gènes cibles de HIF1 et HIF2 sont partiellement différents (Elvidge, Glenny et al. 2006) (Hu, Wang et al. 2003). HIF3-

α est quant à lui un inhibiteur de HIF1- α , assurant ainsi un rétrocontrôle négatif notamment en cas d'hypoxie prolongée (Makino, Cao et al. 2001) (Makino, Uenishi et al. 2007).

En permanence synthétisées par la cellule, les sous-unités HIF- α sont immédiatement hydroxylées en condition normoxique, par les prolyl-hydroxylases (PHD, pour Prolyl Hydroxylase Domain proteins), puis ubiquitinylées après interaction avec la protéine de von-Hippel-Lindau (pVHL) et enfin dégradées dans le protéasome (Berra, Benizri et al. 2003). On compte 3 PHD désignés PHD1, PHD2, et PHD3, qui sont codés par les gènes *EGLN2* (Hs.515417), *EGLN1* (Hs.444450), et *EGLN3* (Hs.135507) respectivement (Prabhakar and Semenza 2012). Membres de la superfamille des dioxygénases qui contiennent l'ion Fe^{2+} dans leur centre catalytique, les PHDs utilisent l'oxygène et l' α -ketoglutarate (2-oxoglutarate) comme substrats (Prabhakar and Semenza 2012). La réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} par l'acide ascorbique est donc nécessaire à l'activité catalytique des PHDs. La régulation de HIF [Figure 14] fait aussi intervenir une asparaginyl-hydroxylase, le facteur FIH-1 (facteur inhibiteur de HIF-1), qui bloque l'interaction HIF-1 α avec son co-activateur, la protéine p300 (Kaelin and Ratcliffe 2008; Semenza 2011), ce qui empêche la transactivation des gènes cibles. Néanmoins, le contrôle négatif imposé par FIH est variable selon les gènes cibles (Prabhakar and Semenza 2012).

Le rôle de HIF est essentiel au cours du développement, non seulement pour la morphogenèse du système circulatoire mais aussi pour celle du poumon comme en témoigne sa surexpression dans le poumon fœtal (Groenman, Rutter et al. 2007). Les délétions homozygotes des gènes de HIF-1 α et de HIF-1 β conduisent au décès de l'embryon à J10 avec des malformations cardio-vasculaires (Iyer, Kotch et al. 1998; Shimoda and Semenza 2011). L'absence de HIF-2 α conduit à la mort de la moitié des fœtus avec des anomalies de développement des poumons et des anomalies du surfactant responsables du décès par détresse respiratoire à la naissance (Compernelle, Brusselmans et al. 2003).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 13 : Les cibles transcriptionnelles directes de HIF (d'après (Schofield and Ratcliffe 2004)).

En condition d'hypoxie, HIF- α n'est plus hydroxylé par les PHD et son induction est *in vitro* exponentielle avec les concentrations décroissantes d'oxygène comprises entre 10 et 0,6% (Jiang, Semenza et al. 1996). Le fonctionnement des PHD est inhibé d'une part par la diminution de la concentration d'O₂ et d'autre part par les espèces réactives de l'O₂ (ROS) produites par les mitochondries hypoxiques (Chandel, Maltepe et al. 1998; Chandel and Sznajder 2000) et responsables de l'oxydation du Fe²⁺ (Brunelle, Bell et al. 2005). HIF peut alors être stabilisé et orchestrer la transactivation de ses gènes cibles permettant une adaptation à l'hypoxie essentielle pour la survie cellulaire (Semenza 2004) (Clerici and Planes 2009; Semenza 2011).

Les sous-unités HIF- α sont stabilisées en condition d'hypoxie aiguë. Cependant, quand l'hypoxie se prolonge, on observe une baisse de HIF-1 α et non de HIF-2 α , sans que cela soit bien compris (Uchida, Rossignol et al. 2004). La dégradation de HIF-1 α dans le protéasome requiert une ubiquitination préalable par HSP70 et une ubiquitine ligase (CHIP), qui ne fixe pas HIF-2 α , ce qui pourrait expliquer sa stabilisation (Luo, Zhong et al. 2010).

Puisque les prolyhydroxylases comportent un ion Fe²⁺ dans leurs centres catalytiques, ils sont une cible du cobalt (Co²⁺), du cuivre (Cu²⁺), du zinc (Zn²⁺) ou encore du manganèse (Mn²⁺) qui peuvent entrer en compétition avec le Fer. Ainsi, le cobalt est utilisé pour activer HIF en condition de normoxie. Les chélateurs du fer comme la desferrioxamine agissent également en inhibant les PHDs, ce qui entraîne la stabilisation de HIF. A l'inverse, la supplémentation en fer et en vitamine C peuvent entraîner une diminution de HIF par activation des PHDs (Schofield and Ratcliffe 2004).

D'autres situations d'expression de HIF en condition non hypoxique sont décrites principalement dans des travaux relatifs au cancer. L'exposition aiguë à certaines cytokines et certains facteurs de croissance comme l'épidermal growth factor (EGF), le fibroblast growth factor 2, l'insulin-like growth factor (IGF)-I, et IGF-II, peuvent augmenter le niveau d'expression de HIF selon le type cellulaire. Le monoxyde d'azote (NO) et la prostaglandine E2 ou encore les métabolites tels que le lactate, le fumarate, et le succinate peuvent également augmenter le niveau d'expression de HIF-1 α en condition non hypoxique. La

PGE2 se fixe à des récepteurs de surface couplés à une protéine G et activent les voies PI3Kinase et MAP kinase (Kimura, Weisz et al. 2000; Lu, Forbes et al. 2002; Fukuda, Kelly et al. 2003; Isaacs, Jung et al. 2005; Selak, Armour et al. 2005).

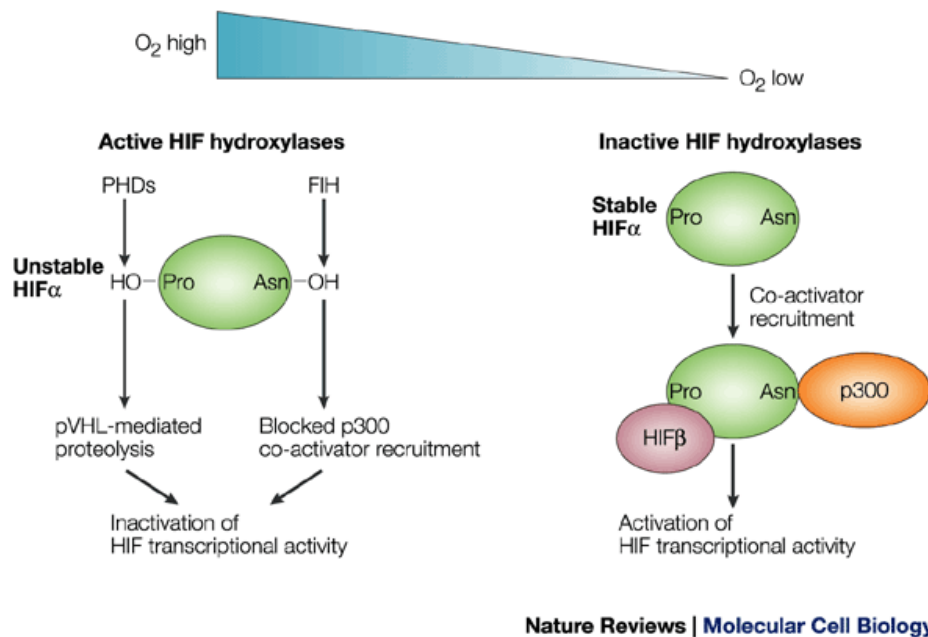


Figure 14: Régulation de la sous-unité α du facteur HIF par prolyl et asparaginyl hydroxylation (d'après (Schofield and Ratcliffe 2004)).

En présence d'oxygène, les prolyl hydroxylases (PHD) et le facteur inhibiteur (FIH) réprime et inactive HIF α . Les PHDs hydroxylent un résidu hydroxyl dans le domaine carboxy-terminal, ce qui entraîne la protéolyse la protéine de von-Hippel-Lindau-tumour-suppressor (pVHL) conduisant à la destruction de la sous-unité HIF α . FIH, hydroxyle un résidu asparaginyl dans un domaine activateur carboxy-terminal, qui bloque le recrutement du co-activateur p300 et conduit à l'inactivation de l'activité transcriptionnelle de la sous-unité HIF α . Au cours de l'hypoxie, les hydroxylases de HIF sont inactives et ces phénomènes sont inhibés, permettant ainsi la formation d'un complexe transcriptionnel actif.

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) sont des produits issus du métabolisme aérobie. Elles comprennent l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyls ($\cdot OH$). Leur production peut se faire au niveau mitochondrial ou au niveau de la NADPH oxydase membranaire. Site de production des ROS, la chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de transporteurs d'électrons organisés en complexes respiratoires de I à IV et permettant la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) par l'ATP synthase. Lors du métabolisme normal, la réduction tétravalente de l'oxygène en eau se fait en plusieurs étapes successives. En condition de normoxie, environ 2 % de l'oxygène consommé est transformé en radical superoxyde au niveau mitochondrial. L'hypoxie augmente la production de ROS et la libération de l'anion superoxyde O_2^- par le complexe III mitochondrial (Chandel 2002) pour une raison encore mal comprise, peut être liée à des modifications du potentiel redox. L'anion superoxyde est rapidement transformé en H_2O_2 par la superoxyde dismutase. Le lieu de production initial des ROS en hypoxie semble être l'espace inter membranaire mitochondrial, puis les ROS diffusent dans le cytoplasme cellulaire (Waypa, Marks et al. 2013). Les effets de l'hypoxie sont néanmoins débattus avec notamment une augmentation des ROS décrite dans les premières minutes de l'hypoxie (Bell, Klimova et al. 2007) et une baisse observée au cours de l'hypoxie chronique (Kim, Tchernyshyov et al. 2006).

La dégradation de ces radicaux est contrôlée par des systèmes de défense, les antioxydants, comme les radicaux superoxydes, eux-mêmes régulés par les métallo-enzymes, les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent leur dismutation, en H_2O_2 (Nordberg and Arner 2001). On décrit 3 types de SOD, une forme cytoplasmique (SOD1), une forme mitochondriale (SOD2) et une forme extracellulaire (SOD3).

Le H_2O_2 , lui-même toxique, est capable de donner par une réaction de Fenton, le radical hydroxyle $\cdot OH$, la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant. La quantité de peroxyde d'hydrogène est régulée par l'enzyme héminique catalase (CAT) qui accélère sa dismutation et par la glutathion peroxydase (GPx) qui catalyse sa réduction par le glutathion.

Il possède un fort pouvoir réducteur et peut également chélater les ions Cu^{2+} et ainsi limiter leur participation à la génération d' $\cdot\text{OH}$ par les réactions de type Fenton.

Les ROS peuvent induire des lésions des lipides, des protéines et du DNA. Ils peuvent par ailleurs promouvoir HIF1- α . L'anion superoxide est en effet un chélateur du fer entraînant l'inhibition des PHD2 permettant ainsi la stabilisation de HIF α . Ainsi, l'inhibition du complexe III mitochondrial par la Terpestacine en hypoxie induit une inhibition de l'expression d'HIF1- α (Budinger, Mutlu et al. 2011). Les dommages de l'ADN et HIF1- α activent d'autres FT comme p53 et p21 qui entraînent une apoptose notamment en modulant l'expression de certains gènes.

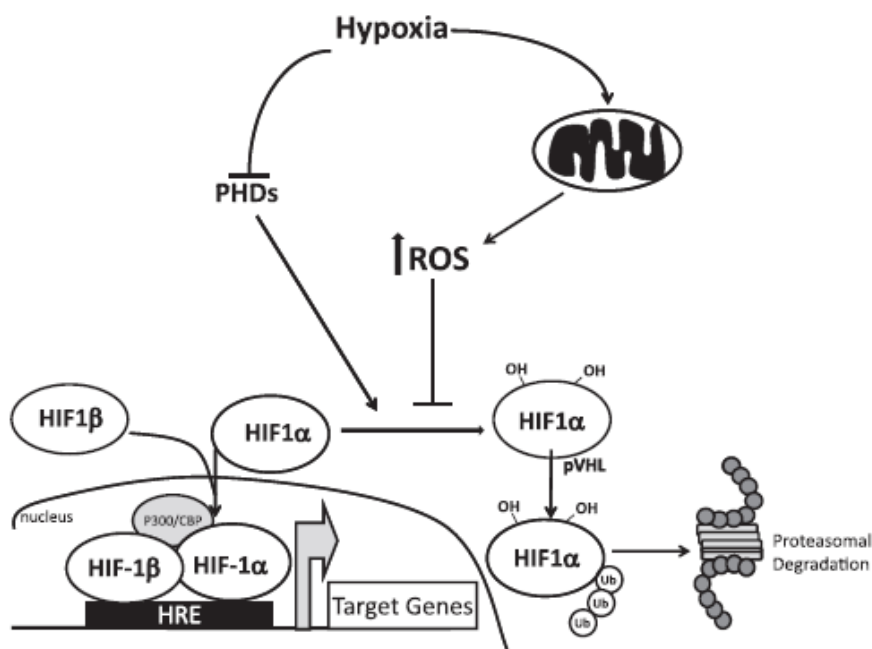


Figure 15 : Interactions entre les ROS et le facteur HIF (d'après (Wheaton and Chandel 2011)). L'hypoxie induit le facteur HIF-1 dont la sous-unité α est hydroxylée par une pyruvate déshydrogénase 2 (PHD2) sur différents résidus proline conduisant à l'activation de la protéine for von Hippel-Lindau protein (pVHL) et à sa dégradation par le protéasome. L'hypoxie diminue l'activité PHD2 et induit la production de ROS mitochondriaux par le complexe III aboutissant ainsi à l'inhibition de l'hydroxylation de la sous-unité HIF-1 α . Une fois stabilisée, la sous-unité HIF- α se lie à HIF- β et au co-activateur p300 pour activer le promoteur des éléments de réponse à l'hypoxie (complexe HRE).

HYPOXIE ET CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES

Les cellules du poumon supportent relativement bien l'hypoxie sans modification de leurs caractéristiques ultra structurales, leur viabilité ou encore la disponibilité en ATP selon des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* (Ouiddir, Planes et al. 1999). De façon générale, les deux principes garants du maintien du niveau d'ATP au sein d'une cellule soumise à l'hypoxie sont d'une part l'augmentation de la glycolyse anaérobie requérant une augmentation des enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose d'autre part, la baisse d'activité des protéines consommatrices d'ATP comme la Na-K-ATPase. Cependant, la tolérance à l'hypoxie est variable d'un type cellulaire à l'autre (Signorelli, Jennings et al. 2010). Les CEA disposent des 3 isoformes de HIF α avec une expression différentielle dans le temps des 3 isoformes (Clerici and Planes 2009). Comme dans les autres cellules, l'induction du niveau d'expression protéique de HIF ne s'accompagne que d'une discrète élévation du niveau d'ARNm, témoignant de son activation transcriptionnelle et de sa stabilisation protéique (Wenger, Rolfs et al. 1998). Le rôle des ROS mitochondriaux dans l'augmentation du niveau de HIF est également vérifié dans la CEA (Schroedl, McClintock et al. 2002; Uchida, Rossignol et al. 2004).

HYPOXIE ET HOMEOSTASIE LIQUIDIENNE DES ALVEOLES

Le transport actif de Na peut être perturbé par l'hypoxie, qui inhibe la formation des dômes en culture cellulaire du fait de l'inhibition du transport de Na trans-épithélial (Planes, Friedlander et al. 1996). En effet, la baisse de l'influx de Na amiloride-sensible et la baisse de l'activité de la Na-K-ATPase contribuent à la baisse du transport trans-épithélial de sodium. Les mécanismes sont différents selon l'intensité et la durée de l'hypoxie. Ainsi, au cours d'une hypoxie prolongée (>12h), une baisse de la synthèse protéique de ces canaux est corrélée à la baisse des ARNm des sous-unités correspondantes (Planes, Escoubet et al. 1997). En revanche, lorsque l'hypoxie est courte (<3h) ou moins sévère, le taux d'ARN est stable mais l'activité des canaux est diminuée, du fait d'une diminution de l'expression de surface des canaux ENaC à la membrane apicale des CEA (Planes, Blot-Chabaud et al. 2002),

liée au moins en partie à une augmentation de l'ubiquitination d'ENaC en hypoxie et de sa dégradation dans le protéasome (Gille, Randrianarison-Pellan et al. 2014). Ce phénomène peut être restauré par les β 2-agonistes qui augmentent l'adressage d'ENaC à la membrane (Planes, Blot-Chabaud et al. 2002), ou prévenu par les antioxydants (Gille, Randrianarison-Pellan et al. 2014). Les ROS mitochondriaux pourraient également être impliqués en diminuant l'activité de la pompe Na-K-ATPase par phosphorylation puis dégradation par une pVHL E3 ligase (Comellas, Dada et al. 2006; Zhou, Dada et al. 2008).

Au cours d'une agression pulmonaire aigüe (acute lung injury), l'augmentation de la perméabilité vasculaire peut être liée en partie à l'hypoxie, en dehors des lésions propres à l'ischémie et de celles liées à des stimuli inflammatoires (Shimoda and Semenza 2011). Le rôle de la voie de signalisation HIF reste néanmoins mal compris. L'augmentation du VEGF, la baisse de l'adénosine kinase induits par HIF contribuent à la perméabilité capillaire et donc à l'œdème lésionnel (Morote-Garcia, Rosenberger et al. 2008). HIF-1 α est impliquée dans l'apoptose des CEA au cours de ces agressions aiguës (Krick, Eul et al. 2005). La stabilisation de HIF-1 α par les ROS mitochondriaux semble participer à ce phénomène (Schroedl, McClintock et al. 2002). Les modèles animaux d'ALI montrent une augmentation prolongée de la protéine nucléaire HIF-1 α dans le poumon (Koury, Deitch et al. 2004). Cette expression de HIF permet de confirmer l'existence d'une hypoxie tissulaire, qui peut également être vérifiée par le pimonidazole (Samoszuk, Walter et al. 2004). Les lésions pulmonaires induites dans ces modèles sont atténuées en cas de délétion partielle de HIF-1 α (Feinman, Deitch et al. 2010). Sakamoto et coll. ont montré par un modèle d'expression ciblée de HIF α l'effet différentiel de la durée d'exposition à l'hypoxie sur la synthèse de protéine D du surfactant (SPD) (Sakamoto, Hashimoto et al. 2012). Initialement augmentée sous l'effet de l'hypoxie, la synthèse de SPD diminue avec l'hypoxie prolongée, qui entraîne des modifications phénotypiques des CEA (Sakamoto, Hashimoto et al. 2012).

HYPOXIE ET FIBROSE PULMONAIRE

Le rôle de l'hypoxie dans la pathogénie et la progression des processus fibrosants a été initialement explorée dans le rein, le foie ou encore la peau (Higgins, Kimura et al. 2008). En effet, plusieurs études sur des souris transgéniques ont montré que l'expression ciblée d'HIF- α dans les cellules épithéliales rénales ou hépatiques constituait *in vivo* un facteur majeur de progression de la fibrose, en favorisant notamment la TEM ou la production locale de médiateurs profibrosants (Higgins, Kimura et al. 2007; Haase 2009). HIF1- α ainsi qu'un groupe de gènes régulés par lui sont spécifiquement exprimés dans les CEA de patients atteints FPI ou de souris exposées à la bléomycine (Tzouveleakis, Harokopos et al. 2007). Le rôle de HIF peut donc être évoqué dans la pathogénie et la progression de la fibrose pulmonaire. L'influence de HIF dans les propriétés pro-fibrosantes des CEA intègre trois aspects : l'apoptose des CEA, la formation de médiateurs profibrosants participant à l'activation des fibroblastes en myofibroblastes et le recrutement de fibrocytes et enfin, la TEM.

HYPOXIE ET APOPTOSE DES CEA

A la phase précoce de l'hypoxie, des lésions mutilantes peuvent s'observer sur l'épithélium alvéolaire avec une apoptose des CEA et un œdème pulmonaire, suivis dans une phase plus tardive, d'une hyperplasie des pneumocytes 2. L'intensité de l'apoptose des CEA varie avec la sévérité et de la durée de l'hypoxie avec un effet maximal mesuré à 0,5% d'O₂ pendant 48h (Krick, Eul et al. 2005; Bouvry, Planes et al. 2006). Le rôle de HIF dans la survenue de cette apoptose est suggéré par de nombreux travaux. Ainsi la transfection d'un ARN interférant pour HIF1a sur des CEA primaires permet de bloquer l'apoptose induite par l'hypoxie et la surexpression de HIF- α augmente l'apoptose des CEA en condition normoxique (Hanze, Eul et al. 2003; Krick, Eul et al. 2005). L'apoptose induite par l'hypoxie implique différents mécanismes comme la protéine Bnip3L, facteur pro-apoptotique et la voie de la glycolyse (Luo, Liu et al. 2006). Outre l'apoptose des CEA, l'hypoxie provoque également un arrêt de la prolifération des cellules (Hanze, Eul et al. 2003; Bouvry, Planes et

al. 2006). Enfin, l'augmentation de l'expression de HIF semble contribuer au défaut de réparation épithéliale après lésion et conduirait à des phénomènes de TEM (Bove, Hristova et al. 2008; Zhou, Dada et al. 2009).

HYPOXIE ET LIBERATION DE MEDIATEURS PROFIBROSANTS

L'hypoxie induit une augmentation de l'expression de CXCL12, SDF-1 par les cellules endothéliales et les CEA ainsi qu'une augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface des fibrocytes, des cellules musculaires et des progéniteurs des cellules endothéliales contribuant au recrutement de ces trois derniers types cellulaires sur le site lésionnel, en l'occurrence le poumon. De même, l'expression du VEGF et de son récepteur VEGFR est augmentée par l'hypoxie conduisant à favoriser l'angiogenèse (Ceradini and Gurtner 2005).

L'hypoxie induit une augmentation transcriptionnelle de l'expression du collagène I, du facteur activateur du plasminogène-1, du CTGF ou encore du TIMP-1 (tissu inhibitor of metalloproteinase-1) couplée à une baisse de MMP2, phénomènes impliqués dans le renouvellement de la MEC (Higgins, Kimura et al. 2007). L'influence de l'activation de HIF sur l'expression de LOX et LOXL2, enzymes permettant entre autres de catalyser les interactions du collagène avec les fibres d'élastine, va dans ce sens. HIF semble avoir une coopération fonctionnelle avec le TGF- β 1, facteur profibrosant majeur aboutissant à une co-régulation du VEGF et de l'érythropoïétine ou la production de certaines fibres de collagène au sein du fibroblaste ainsi que de nombreuses protéines comme les BMP, les activines et les inhibines.

HYPOXIE ET TEM

HIF semble intervenir au cours de la fibrogénèse à travers la promotion de la TEM, soit par hausse du niveau d'expression des inducteurs de la TEM ou des facteurs de transcription impliqués dans ce phénomène comme la voie des β -caténines ou de Notch soit par baisse du niveau d'expression des répresseurs de la TEM. Là encore, l'activation des LOX induite par HIF semble être impliquée avec un rôle dans la migration et la plasticité cellulaire en rapport avec le facteur de transcription SNAI (Peinado, Del Carmen Iglesias-de la Cruz et al. 2005).

Initialement rapporté dans le rein, le rôle de l'hypoxie dans la survenue d'une TEM a été montré dans le poumon (Higgins, Kimura et al. 2007; Zhou, Dada et al. 2009). Bien qu'elles aient été essentiellement réalisées sur des lignées cellulaires, ce travail a montré que l'hypoxie pouvait induire une perte du phénotype épithélial avec transformation mésenchymateuse et que ce phénomène impliquait la synthèse de TGF- β .

IV. INTERET POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES EXOGENES DANS LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES DU POU MON PROFOND

LES CELLULES SOUCHES- GENERALITES

Les cellules souches sont définies essentiellement par leur capacité d’auto-renou vèlement et leur potentiel de différenciation en divers types cellulaires. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes provenant de la couche interne du blastocyste, capables d’auto-renou vèlement, pouvant donner toutes les lignées cellulaires embryonnaires et se différencier en cellules adultes [Annexe 3]. Elles ne peuvent cependant pas former le tissu extra-embryonnaire : le trophectoderme. Les cellules souches adultes sont isolées de tissus adultes tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, le tissu nerveux, la peau, le sang de cordon et le placenta. Capables par définition d’autorenou vèlement, elles sont caractérisées de cellules multipotentes. Dans la moelle, on distingue les cellules souches mésenchymateuses adhérentes sur plastique des cellules hématopoïétiques, garantes du maintien de l’homéostasie du tissu sanguin, qui sont depuis longtemps utilisées en thérapie cellulaire dans le cadre d’auto- ou d’allogreffes pour le traitement de certaines hémopathies. Moins bien connues et distinctes des cellules progénitrices, des cellules souches adultes résidentes, participant à la réparation des différents types cellulaires qui constituent le tissu pulmonaire, ont plus récemment été décrites [Annexe 3].

LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

DEFINITION-PROPRIETES

Caractérisées depuis 1968 (Friedenstein, Rapoport et al. 1968), les CSM sont des cellules souches adultes multipotentes isolées essentiellement de la moelle osseuse, mais aussi du placenta, du sang de cordon ou encore du tissu adipeux. Il a été également décrit des CSM résidentes et spécifiques d’organes en particulier dans le poumon (Lama, Smith et al. 2007; Badri, Murray et al.). En l’absence de marqueur spécifique de surface, la définition des CSM

repose sur des critères établis par la société internationale de thérapie cellulaire en 2006 (Dominici, Le Blanc et al. 2006): 1) cellules adhérentes sur plastique en condition usuelle de culture, 2) expression de molécules de surface : CD105, CD90, CD73 et négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, CD79a et HLA-DR et 3) les CSM doivent avoir la capacité de se différencier en cellules de la lignée mésenchymateuse incluant les ostéoblastes, les chondroblastes, les adipocytes dans les conditions adéquates de culture (Chamberlain, Fox et al. 2007). Les CSM d'origine médullaire sont plus aisément disponibles. Elles constituent moins de 0,1% des cellules de la moelle, mais leur expansion *in vitro* est rapide. Elles ont par ailleurs l'avantage de ne pas soulever les considérations éthiques des cellules souches embryonnaires. Enfin, elles peuvent être administrées de façon allogénique. La tolérance par l'hôte est expliquée par la faible expression de molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II à leur surface et par l'absence d'expression de molécules co-stimulation des lymphocytes T (CD40, CD80 et CD86) (Le Blanc 2003). L'autre avantage des CSM comparativement aux cellules souches embryonnaires consiste en la faible durée de vie *in vivo* et le faible risque de tumorigénèse (Prockop, Gregory et al. 2003). Nombreux travaux ont souligné les propriétés immuno-modulatrices, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et angiogéniques des CSM, faisant d'elles des cellules candidates idéales pour la réparation tissulaire (Nauta and Fibbe 2007) (Picard, Eladari et al. 2008). Les CSM d'origine médullaire ont été employées dans des essais cliniques pour le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte (Le Blanc, Frassoni et al. 2008), des affections neurologiques aiguës (Hu, Luo et al. 2010), de la bronchopneumopathie chronique obstructive (Weiss, Casaburi et al. 2013) ou encore de l'infarctus du myocarde (Heldman, DiFede et al. 2014) avec une excellente tolérance.

CSM ET PATHOLOGIES PULMONAIRES

L'œdème lésionnel aigu ou « acute lung injury » constitue un challenge thérapeutique majeur compte tenu de l'absence de traitement spécifique et de la mortalité élevée du syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) (Ware 2005), qui en est l'étape ultérieure. Au cours de la FPI, les exacerbations aiguës constituent des épisodes particulièrement graves de

l'histoire naturelle de la maladie, qui pourraient être l'objet de thérapies innovantes telles que la thérapie cellulaire à un stade précoce de l'apparition des symptômes voire en cas de facteur prédictif d'un tel événement si le développement des biomarqueurs le permet.

THÉRAPIE CELLULAIRE AU COURS DU SDRA

Les objectifs à atteindre pour permettre une résolution du SDRA sont en dehors du traitement de la cause, de favoriser la résorption de l'œdème, d'éliminer les cellules inflammatoires et de leurs débris et de réparer l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'épithélium alvéolaire et de l'endothélium.

Les thérapies cellulaires avec des cellules exogènes au cours du SDRA ont impliqué différents types de cellules, y compris des progéniteurs endothéliaux. Le rationnel repose sur la corrélation du taux circulant de progéniteurs endothéliaux avec la survie, suggérant que la restauration d'un taux de progéniteurs endothéliaux circulants élevé pourrait améliorer le pronostic des patients (Yamada, Kubo et al. 2005). Les études précliniques réalisées chez l'animal ont montré un bénéfice de survie lié à une amélioration lésionnelle sans pour autant de greffe endothéliale (Lam, Liu et al. 2008) (Voswinckel, Ziegelhoeffer et al. 2003). Ces travaux ont par ailleurs conduit à des essais cliniques évaluant les progéniteurs endothéliaux autologues dans certains domaines cliniques tels que la cirrhose (NCT01333228), l'accident vasculaire cérébral (NCT01468064) ou l'ischémie périphérique (NCT 01595776). Les résultats de ces essais ne sont pas encore publiés.

Les cellules souches mésenchymateuses ont été plus largement étudiées dans le contexte des pathologies inflammatoires aiguës comme les modèles de SDRA ou de sepsis (Ortiz, Gambelli et al. 2003; Gupta, Su et al. 2007; Mei, McCarter et al. 2007; Aslam, Baveja et al. 2009; Gupta, Krasnodembskaya et al. 2012) (Islam, Das et al. 2012). L'administration de cellules souches mésenchymateuses médullaires humaines permet une amélioration de la survie des animaux à 48h et 72h ($p < 0.01$) dans un modèle d'agression alvéolaire par l'endotoxine bactérienne d'*E. coli* (Gupta, Su et al. 2007). Cette amélioration de survie a

également été observée dans des modèles murins de sepsis digestif (Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009; Mei, Haitsma et al. 2010). Une diminution de l'œdème alvéolaire induit par l'E. coli est observée dans un modèle de poumon humain *ex-vivo* (Lee, Krasnodembskaya et al. 2013). Différents modes d'action des CSM sont rapportés dans ce contexte, en partie médiés par les microvésicules produites, avec: 1) une réduction de la perméabilité alvéolo-capillaire (par la production entre autres d'angiopoïétine 1 (Fang, Neyrinck et al. 2010), 2) une augmentation de la clairance du fluide alvéolaire (en partie liée à la sécrétion de KGF) (Lee, Fang et al. 2009), 3) le passage d'un phénotype cytokinique et macrophagique pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire (Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009; Krasnodembskaya, Samarani et al. 2012); 4) une amélioration de la clairance bactérienne par augmentation de la phagocytose et de la synthèse de peptides antibactériens (Krasnodembskaya, Song et al. 2010) (Gupta, Krasnodembskaya et al. 2012) et enfin 5) un transfert de mitochondries aux CEA permettant de préserver la production d'ATP (Islam, Das et al. 2012; Gotts and Matthay 2014; Walter, Ware et al. 2014). En effet, en plus des médiateurs solubles, une communication entre les cellules de l'hôte et les CSM pourrait se faire par contact cellulaire direct à travers des gap junctions (Badri, Walker et al.) ou *via* des exosomes, appelés encore microvésicules. Ces éléments seraient transmis d'une cellule à l'autre par contact cellulaire de proximité ou bien à distance grâce à une interaction spécifique récepteur-ligand permettant leur internalisation dans des cellules cibles. L'avantage de ces structures serait de permettre le transfert de protéines hydrophobes ainsi que d'un large nombre de molécules ayant des effets synergiques dans un faible volume (diamètre entre 30 et 100 nm). Décrits il y a une vingtaine d'années, les exosomes suscitent un regain d'intérêt notamment avec la mise en évidence récente de la transmission dite « horizontale » de matériel génétique (microARN et ARN messenger) à travers ces structures (Ratajczak, Miekus et al. 2006; Collino, Deregibus et al. 2010; Collino, Bruno et al. 2015). Ces petits ARN non codants de 17 à 25 nucléotides pourraient être impliqués dans les phénomènes de survie et de différenciation des cellules cibles (Deiuliis, Shah et al. 2011). Ils pourraient ainsi constituer un des mécanismes d'action des CSM. Enfin,

ces structures semblent permettre le transfert de mitochondries. Le rôle des microvésicules a également été exploré entre autres au cours de l'ALI (Zhu, Feng et al. 2014).

Les nombreuses et séduisantes études précliniques réalisées dans ce domaine ont naturellement conduit à la mise en place d'essais cliniques évaluant la tolérance de l'administration de CSM au cours du SDRA chez l'homme.

Zheng et al. ont mené une étude randomisée en double aveugle évaluant l'administration de CSM allogéniques issues d'adipocytes (une dose unique de 1 millions/kg) contre placebo (sérum physiologique) chez 12 patients. Aucun effet délétère n'a été observé. Concernant les objectifs secondaires, à savoir les durées de ventilation mécanique et de séjour en réanimation, ainsi que les dosages de biomarqueurs (protéine SP-D, interleukine 6, et interleukin 8) étaient comparables (Zheng, Huang et al. 2014).

L'essai clinique intitulé START (Stem cells for ARDS treatment), étude de phase 1 et 2 a évalué la tolérance de l'administration intra-veineuse de CSMh allogéniques d'origine médullaire au cours du SDRA (NCT01775774/NCT0202097641). L'objectif principal était certes la tolérance mais parmi les objectifs secondaires figuraient le score d'ALI, le rapport PaO₂/FiO₂, les scores de sévérité de défaillance d'organe à J3, la durée sans ventilation mécanique, la mortalité à 60 jours ainsi que des paramètres biologiques d'inflammation et d'agression épithéliale et endothéliale (Wilson, Liu et al. 2015). Les résultats de cet essai multicentrique (San Francisco, Stanford, Boston) ouvert viennent d'être publiés (Wilson, Liu et al. 2015). Ils mettent en exergue la faisabilité de l'instillation des CSM par voie veineuse. Neuf patients ont été inclus. Les trois premiers patients ont reçu des faibles doses (1 million cellules/kg de poids prédit), les 3 suivants (5 million cellules/kg), et les 3 derniers (10 million cellules/kg). La tolérance des perfusions était satisfaisante. Aucun effet secondaire n'a été observé en lien avec ces perfusions. Des complications sont survenues chez 3 patients dans les semaines suivant la perfusion initiale : un patient est décédé à 9 jours, un autre à 31 jours et le troisième avait des infarctus spléniques, rénaux et cérébraux d'âge indéterminé préexistants a priori à la perfusion de CSM (Wilson, Liu et al. 2015).

Les approches thérapeutiques dans le domaine de la fibrose sont axées sur la recherche d'agents permettant la protection voire la régénération épithéliale. La première utilisation des cellules souches dans un modèle expérimental murin de fibrose a été proposée par Ortiz et coll. (Ortiz, Gambelli et al. 2003). L'administration de CSM par voie veineuse immédiatement après une instillation intra-trachéale de bléomycine (réalisée à J0) permettait une réduction des lésions histologiques de fibrose observées à J14. Le recrutement de CSM était 3 fois plus important dans le poumon des animaux subissant cette agression en comparaison aux témoins (Ortiz, Gambelli et al. 2003). Comme le soulignaient les auteurs l'effet bénéfique des CSM n'était pas reproduit quand l'injection était faite à J7 de l'agression. D'autres travaux ont défendu le rôle bénéfique de CSM dans les modèles de fibrose (Moodley, Atienza et al. 2009). Au-delà d'une éventuelle différenciation épithéliale de ces cellules (Kotton, Ma et al. 2001; Yamada, Kubo et al. 2004; Sueblinvong, Loi et al. 2008; Ma, Gai et al. 2011), qui est controversée, les effets paracrines ont là aussi été mis en avant. Ils feraient intervenir la sécrétion de l'antagoniste du récepteur de l'IL1, ainsi qu'un équilibre des métalloprotéinases de la matrice (Ortiz, Dutreil et al. 2007) (Moodley, Atienza et al. 2009). Cependant, les effets anti-fibrosants des CSM ne sont pas bien élucidés. Il s'agirait plus vraisemblablement d'un effet immuno-modulateur et anti-inflammatoire à la phase inflammatoire de la maladie dans le modèle murin (Rojas, Xu et al. 2005; Ortiz, Dutreil et al. 2007). L'effet des CSM dans les modèles de fibrose semble être lié à un recrutement tissulaire pulmonaire avec possible constitution de niches créant d'une part les conditions d'un échange physique à travers des gaps jonctions de mitochondries et de matériel génétique et pouvant contribuer à la régénération épithéliale (Islam, Das et al. 2012; Li, Zhang et al. 2014). D'autre part, et c'est possiblement une composante majeure de l'effet des CSM, la libération de médiateurs paracrines contribue aux phénomènes de réparation épithéliale. Enfin, l'âge des animaux semble avoir un impact sur le secretome, le recrutement et l'efficacité *in vivo* des CSM, suggérant un rôle de la senescence de ces cellules dans la pathogénie de la fibrose pulmonaire (McNulty and Janes 2012; Bustos, Huleihel et al. 2014); (Kapetanaki, Mora et al. 2013). L'« épuisement des cellules souches »

participerait ainsi au défaut de réparation, qui s'accentuerait avec l'âge et qui conduirait au processus fibrosant dans le poumon (McNulty and Janes 2012; Kapetanaki, Mora et al. 2013; Bustos, Huleihel et al. 2014; Alvarez, Levine et al. 2015).

Les différentes approches précliniques concernant l'administration de CSM au cours des modèles de fibrose constituent un prérequis pour envisager les CSM dans le contexte de la FPI, dont le traitement reste décevant malgré les nombreux essais cliniques menés ces dernières années (Toonkel, Hare et al. 2013); (du Bois 2010); (Spagnolo, Maher et al. 2015; Tzouvelekis, Bonella et al. 2015). Après l'échec démontré des traitements anti-inflammatoires, les efforts se sont axés sur les traitements anti-fibrosants et la perspective des cellules souches ouvre une nouvelle dimension, qui est celle de la régénération épithéliale.

Le recrutement pulmonaire des CSM est observé au cours de divers modèles d'agressions alvéolaires expérimentales, essentiellement la fibrose induite par la bléomycine (Ortiz, Gambelli et al. 2003; Spees, Pociask et al. 2007; Cargnoni, Gibelli et al. 2009; Moodley, Atienza et al. 2009; Lee, Jang et al. 2010); (Rojas, Xu et al. 2005) permettant d'envisager l'administration intraveineuse des CSM. Ce recrutement semble être médié par l'axe SDF-1 – CXCR4 (Xu, Mora et al. 2007) et semble s'opérer au cours du premier passage des cellules dans la circulation pulmonaire (Gao, Dennis et al. 2001). Bien que l'effet bénéfique des CSM soit encore difficile à affirmer en clinique, c'est avant toute chose sa tolérance et son innocuité qui est explorée (McNulty and Janes 2012; Toonkel, Hare et al. 2013). Certes, l'utilisation des CSM dans d'autres domaines cliniques a pu être menée sans effet délétère et avec une très bonne tolérance (Le Blanc, Frassoni et al. 2008) (Hare and Chaparro 2008; Xiong, Zhang et al. 2011; Hare, Fishman et al. 2012; Weiss, Casaburi et al. 2013), mais le contexte de la FPI et le microenvironnement qui la caractérise amène à des interrogations particulières. Outre le risque de transformation néoplasique, la principale crainte formulée dans ce contexte est celle de la transformation fibroblastique voire myofibroblastique des CSM, contribuant ainsi à la majoration des lésions de fibrose (Phillips, Burdick et al. 2004; Lama and Phan 2006; Cuiffo and Karnoub 2012; von Bahr, Batsis et al. 2012). Les interactions

des CSM avec les fibroblastes font craindre également un risque de prolifération fibroblastique (Hashimoto, Jin et al. 2004; Salazar, Lankford et al. 2009). Néanmoins, les études précliniques chez l'animal et les premières études cliniques utilisant les CSM au cours de différentes affections chroniques, certaines fibrosantes, plaide plutôt pour des propriétés anti-fibrosantes favorisant la réparation tissulaire voire sa régénération (Le Blanc, Frassoni et al. 2008) (Hare and Chaparro 2008; Xiong, Zhang et al. 2011; Hare, Fishman et al. 2012; Weiss, Casaburi et al. 2013). La question de la faisabilité et de la tolérance des perfusions de CSM est résolue par ces études cliniques. Une étude de phase 1 a été débutée en Espagne testant l'administration de CSM allogéniques au cours de la FPI (NCT01919827). Un essai monocentrique évaluant la tolérance de la perfusion intra-veineuse de CSM dérivées de placenta a été publiée (Chambers, Enever et al. 2014). Quatre patients ont ainsi reçu 10^6 cellules/Kg à 2 reprises et aucun effet secondaire n'a été rapporté (Chambers, Enever et al. 2014). Comme le soulignent les auteurs, aucun stigmatisme d'embolie artérielle pulmonaire n'a été observé au décours de la perfusion (Chambers, Enever et al. 2014). Tzouvelikis et coll. ont rapporté une série de 14 patients ayant une FPI et chez lesquels une instillation endobronchique de cellules souches autologues dérivées des adipocytes était pratiquée (Tzouvelekis, Paspaliaris et al. 2013). Bien qu'elle évite en effet les risques vasculaires emboliques potentiels, cette approche pose le problème d'un autre abord invasif, qui est celui de l'endoscopie bronchique et de la diffusion au sein du parenchyme pulmonaire des cellules souches. Aussi, la principale critique concerne ici le caractère autologue de cette thérapie cellulaire, quand la question même du rôle de cellules souches est formulée dans la pathogénie des processus fibrosants (Kapetanaki, Mora et al. 2013; Bustos, Huleihel et al. 2014; Alvarez, Levine et al. 2015).

L'essentiel consiste maintenant à déterminer à quel moment et à quelle posologie un tel traitement pourrait être proposé (Toonkel, Hare et al. 2013).

La thérapie cellulaire avec des CSM constitue une approche thérapeutique innovante et séduisante au cours des pathologies du poumon que sont la fibrose pulmonaire et le SDRA, mais les mécanismes d'action de ces cellules restent mal compris. Au cœur de ces processus pathologiques, les CEA sont des cellules cibles majeures. Le rôle de l'hypoxie dans la pathogénie de la fibrose pulmonaire est une hypothèse intéressante que nous avons voulu étayer au regard en particulier des propriétés fonctionnelles et morphologiques des CEA. Ainsi, dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action potentiels des CSM sur les CEA soumises à l'hypoxie.

Dans une première partie de ce travail, nous avons évalué l'influence des CSM sur l'homéostasie liquidienne des CEA en situation aiguë mimant le microenvironnement du SDRA à l'aide des principales cytokines pro-inflammatoires décrites au cours du SDRA.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés aux effets cytoprotecteurs des CSM sur le phénotype des CEA soumises à l'hypoxie en nous focalisant notamment sur les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse.

I. EFFET DES CSM SUR LES ALTERATIONS DU TRANSPORT TRANSEPITHELIAL ALVEOLAIRE D'IONS INDUITES PAR L'HYPOXIE ET L'INFLAMMATION

A. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë représente une situation clinique grave, réfractaire aux différentes approches pharmacologiques avec un pronostic qui reste très sombre (Villar, Sulemanji et al. 2014) (Matthay, Ware et al. 2012). Les taux de mortalité de 25 à 40% et la morbidité élevée de cette pathologie respiratoire en fait une préoccupation importante en pratique clinique. L'administration de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) représente une approche thérapeutique innovante, particulièrement attendue au cours du SDRA (Beers and Morrissey 2011; Matthay, Ware et al. 2012; Gotts and Matthay 2014; Walter, Ware et al. 2014; Weiss 2015). Les modèles *in vivo* d'agression alvéolaire inflammatoire aiguë chez les rongeurs, qu'ils soient septiques ou non, ont mis en évidence le rôle paracrine bénéfique des CSMh allogéniques (Gupta, Su et al. 2007; Aslam, Baveja et al. 2009; Lee, Fang et al. 2009; Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009; Gotts and Matthay 2011; Lee, Krasnodembskaya et al. 2013). En effet, la participation propre de ces cellules dans le renouvellement et la régénération tissulaire est, si elle existe, marginale (Kotton, Ma et al. 2001; Krause, Theise et al. 2001; Kotton, Fabian et al. 2005; Abreu, Antunes et al. 2011). Les mécanismes de ces effets paracrines commencent à être élucidés (Abreu, Antunes et al. 2011; Lee, Fang et al. 2011; Walter, Ware et al. 2014), soulignant le rôle en particulier du keratinocyte growth factor (KGF) (Ionescu, Byrne et al. 2012; Lee, Fang et al. 2009), de la prostaglandine (PG)-E2 (Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009) et de l'antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 (IL1ra), éléments favorisant la régénération cellulaire et la réparation tissulaire (Ortiz, Dutreil et al. 2007; Schinkothe, Bloch et al. 2008). L'effet paracrine bien démontré des CSM suggère que l'utilisation du milieu conditionné des CSM et non pas des CSM elles-mêmes pourrait avoir un effet bénéfique au cours des agressions alvéolaires aiguës. L'administration du milieu conditionné des CSM aurait par

ailleurs l'avantage de la simplicité et de l'innocuité, en évitant les risques potentiels liés à l'administration de cellules souches exogènes.

L'hypoxie, qui accompagne ces situations cliniques, participe aux troubles de l'homéostasie liquidienne des alvéoles, qui représentent une composante essentielle de la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aiguë ou de façon plus large des phénomènes d'agression pulmonaire aiguë (Matthay, Ware et al. 2012; Matthay 2014). La réabsorption de l'œdème alvéolaire est lié en grande partie au rôle de la protéine de transport ENaC, exprimée à la surface apicale des pneumocytes, qui constitue véritablement l'étape limitante de ce processus (Clerici and Planes 2009; Matthay, Ware et al. 2012; Matthay 2014). Les effets délétères de l'hypoxie aiguë sur l'activité et l'expression des protéines de transport de Na⁺ (ENaC et Na, K-ATPase) ont été précédemment décrits dans des modèles *in vivo*, mais aussi *in vitro* sur des cultures primaires de pneumocytes de rat ou des lignées cellulaires d'origine humaine (Planes, Friedlander et al. 1996; Planes, Escoubet et al. 1997; Planes, Blot-Chabaud et al. 2002; Mairbaurl, Wodopia et al. 1997; Dada and Sznajder 2003). Il existe cependant encore peu de données sur les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des CSM sur les transports ioniques et notamment sur l'expression de ces différentes protéines de transport. Par ailleurs, l'effet d'un microenvironnement inflammatoire et/ou hypoxique sur le métabolisme et le sécrétome des CSM n'est pas précisément connu.

Le premier objectif de ce travail a été de documenter *in vitro* l'effet d'un microenvironnement inflammatoire et hypoxique sur les CSM en termes de phénotype, d'apoptose et de sécrétome. Le second objectif a été d'évaluer les effets du milieu conditionné des CSM sur les propriétés de transports ioniques des CEA dans un modèle *in vitro* mimant les conditions inflammatoires et hypoxiques retrouvées au cours des agressions alvéolaires aiguës, et de déterminer les mécanismes impliqués.

CALL FOR PAPERS | *Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis*

Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury

Arnaud Goolaerts,¹ Nadia Pellán-Randrianarison,^{1,2} Jérôme Larghero,^{2,3} Valérie Vanneaux,^{2,3} Yurdagül Uzunhan,^{4,5} Thomas Gille,^{4,5} Nicolas Dard,⁴ Carole Planès,^{4,5} Michael A. Matthay,^{1,2} and Christine Clerici^{1,2,6}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U773, Paris, France; ²Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité Mixte de Recherche 773 and Unité Mixte de Recherche 940, Paris, France; ³AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France; University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁴Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA2363, Bobigny, France; ⁵AP-HP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; and ⁶AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France

Submitted 4 September 2013; accepted in final form 27 March 2014

Goolaerts A, Pellán-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthay MA, Clerici C. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306: L975–L985, 2014. First published March 28, 2014; doi:10.1152/ajplung.00242.2013.—Mesenchymal stromal cells (MSCs) or their media (MSC-M) were reported to reverse acute lung injury (ALI)-induced decrease of alveolar fluid clearance. To determine the mechanisms by which MSC-M exert their beneficial effects, an in vitro model of alveolar epithelial injury was created by exposing primary rat alveolar epithelial cells (AECs) to hypoxia (3% O₂) plus cytomix, a combination of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ . MSC-M were collected from human MSCs exposed for 12 h to either normoxia (MSC-M) or to hypoxia plus cytomix (HCYT-MSC-M). This latter condition was used to model the effect of alveolar inflammation and hypoxia on paracrine secretion of MSCs in the injured lung. Comparison of paracrine soluble factors in MSC media showed that the IL-1 receptor antagonist and prostaglandin E₂ were markedly increased while keratinocyte growth factor (KGF) was twofold lower in HCYT-MSC-M compared with MSC-M. In AECs, hypoxia plus cytomix increased protein permeability, reduced amiloride-sensitive short-circuit current (AS-I_{sc}), and also decreased the number of α -epithelial sodium channel (α -ENaC) subunits in the apical membrane. To test the effects of MSC media, MSC-M and HCYT-MSC-M were added for an additional 12 h to AECs exposed to hypoxia plus cytomix. MSC-M and HCYT-MSC-M completely restored epithelial permeability to normal. MSC-M, but not HCYT-MSC-M, significantly prevented the hypoxia plus cytomix-induced decrease of ENaC activity and restored apical α -ENaC channels. Interestingly, KGF-depleted MSC-M were unable to restore amiloride-sensitive sodium transport, indicating a possible role for KGF in the beneficial effect of MSC-M. These results indicate that MSC-M may be a preferable therapeutic option for ALI.

growth factors; membrane transport; hypoxia; inflammation; mesenchymal stem cells; sodium channels

ACUTE LUNG INJURY (ALI) IS a major clinical syndrome manifested by an inflammatory response with injury to the lung endothe-

lium and the alveolar epithelium that leads to acute respiratory failure (53). Although mortality has declined with improved supportive care, especially lung protective ventilation and a conservative fluid strategy, the overall mortality of ALI remains high, ~25–40% (51). No pharmacological therapies have yet been found to improve clinical outcomes in ALI (8), thus underscoring the need for novel therapeutic strategies (40).

There has been a rapidly growing interest in the potential value of stem cell therapies as therapeutic approaches in multiple clinical disorders, including myocardial infarction, diabetes, and hepatic and acute renal failure (34). Moreover, recent studies indicate that bone marrow-derived, multipotent mesenchymal (stem) stromal cells (MSCs) have therapeutic efficacy in experimental models of ALI in adult animals. Intravenous or intra-alveolar administration of MSCs attenuates the severity of lung damage, reduces lung inflammation and fibrosis, and increases survival of rats after bleomycin, endotoxin-induced lung injury, and live bacteria or ventilator-induced injury (34, 41, 44). The potential mechanisms through which MSC therapy improves lung function include lung engraftment, anti-inflammatory, or immunomodulatory functions, and antiapoptotic effects (1, 19, 27, 28). However, although MSCs delivered by the intravenous route engraft in mice lungs after bleomycin injury (44), other reports have shown that engraftment of MSCs in the lung is very low (<5%) (9, 21). Interestingly, most studies reported striking protective effects of MSC therapy despite low engraftment rates, supporting the concept that the protective effects may be largely mediated through production of paracrine mediators that constitute the MSC secretome (29, 33, 43). This assumption has been confirmed by another recent study reporting that the cultured medium of MSC themselves can reverse hypoxia-induced lung injury in a perinatal mouse model (4).

The direct delivery of MSCs for treating acute respiratory distress syndrome (ARDS) is reasonable to test for safety and efficacy in the clinical setting, but if the cultured media of MSCs were as effective as the MSCs themselves, it would be a simpler treatment that might have fewer potential side effects that

Address for reprint requests and other correspondence: C. Clerici, UMR 700 and Dept. of Physiology, 46 Rue Henri Huchard, 75722 Paris Cedex 18, France (e-mail: christine.clerici@bch.aphp.fr).

may be associated with cell-based therapy. Moreover, in the context of ALI, these cells are exposed to acute inflammation and hypoxic conditions with unknown consequences on their secretome. Under resting conditions, MSCs secrete several soluble factors that may reduce ALI (11, 23, 33). Based on previous studies, we and others identified potential soluble factors that could be responsible for the observed beneficial effects, keratinocyte growth factor (KGF) (23, 32), IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) (43), and prostaglandin E₂ (PGE₂) (42). These three paracrine products of MSCs modulate alveolar ion and fluid transport and lung barrier permeability or acute lung inflammation, important pathways of lung injury (17, 34, 42). The two objectives of this study were 1) to test the impact of the alveolar environment of acute inflammation and hypoxia on the phenotype of MSCs in terms of apoptosis and secretion of three mediators, IL-1ra, PGE₂, and KGF; and 2) to assess the therapeutic efficacy of MSC-conditioned media on the injured cultured alveolar epithelial cells (AECs) and determine the mechanisms that explain how the conditioned media restored the vectorial sodium transport in an *in vitro* model of acute alveolar injury.

METHODS

Extraction, Culture, and Conditioning of Human MSCs

Bone marrow samples were harvested from washed filters used during bone marrow graft processing for allogeneic transplantation after healthy donor informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France). MSCs were cultured as previously described (3). Briefly, healthy donors bone marrow cells obtained after Ficoll (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were cultured at an initial density of 5×10^4 cells/cm² in minimum essential medium- α (Invitrogen), supplemented with 10% defined fetal calf serum (DFBS; HyClone, Logan, UT), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D Systems, Lille, France), and antibiotic/antimycotic (Invitrogen). After 24–48 h, nonadherent cells were removed and the medium was changed. The media were changed every 2 or 3 days until confluence. Adherent cells were then trypsinized, harvested, and cultured by seeding 0.5×10^3 cells/cm².

At confluence, the MSC medium was changed and replaced by DMEM medium containing 10% fetal bovine serum. To test the effect of inflammation on MSC secretion, MSCs were exposed to hypoxia (3% O₂) plus 20 ng/ml of cytomix. Cytomix is a mixture of IL-1 β , TNF- α , and INF- γ (R&D Systems), which are the major proinflammatory cytokines in the pulmonary edema fluid from patients with ARDS (31). After 12 h, the media of MSCs exposed to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M) or the media of control MSC (MSC-M) were harvested and rapidly centrifuged (10×10^3 rpm). The aliquots were stored at -80°C.

Measurements of Soluble Mediator Concentrations in MSC Supernatants

MSCs between passages 2 and 5 were cultured on sixwell plates until 85–90% confluence was achieved. After exposure to experimental conditions, the supernatants were harvested and immediately centrifuged. The concentrations of soluble mediators, IL-1ra, PGE₂, and KGF were measured by ELISA (R&D Systems). KGF (FGF-7) was measured with a twofold sample dilution factor, PGE₂ was measured with a threefold sample dilution factor, and IL-1ra was measured without sample dilution as indicated by manufacturer's instructions.

Determination of MSC Phenotype

Monoclonal antibodies conjugated with either fluorescein isothiocyanate or phycoerythrin (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and directed to CD29, CD95, CD105, and CD105a to CD105e, or matched isotype control were used for immunophenotyping, according to the manufacturer's protocol. Data were acquired and analyzed on a five parameters flow cytometer (FACS Calibur; Becton Dickinson) with Cell Quest software.

Detection of MSC Apoptosis and Necrosis

MSC apoptosis and viability were determined at passage 4 in cells exposed to normoxia or to cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂) for 12 h using the annexin V (FITC)-7AAD kit (Beckman Coulter, Roissy Charles de Gaulle, France). Briefly, cells were collected and resuspended in binding buffer. Annexin V-FITC and propidium iodide were added, and the reaction was incubated in the dark for 15 min. Cells were analyzed by flow cytometry using FACScan flow cytometer.

Isolation and Culture of Rat AECs

The procedure of alveolar type II cell isolation from pathogen-free male Sprague-Dawley rats accorded with legislation currently in force in France and animal welfare guidelines (Ministère de la Pêche et de l'Agriculture, Agreement 5669). Alveolar type II cells were isolated from adult rats (200–250 g) by elastase digestion of lung tissue followed by sequential filtration and differential adherence on bacteriological dishes as previously described (46). Cells (purity >90%; viability >95%) were seeded either onto Transwell/Snapwell (polycarbonate membrane with a pore size of 0.4 μ m; Costar, Cambridge, MA) filters or onto 6- or 12-well plastic culture dishes and cultured in a 5% CO₂, 95% air atmosphere in DMEM containing 25 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 10 μ g/ml gentamycin. Transepithelial resistance (R_{te}) and transepithelial potential difference were measured on day 4 using a microvoltmeter (World Precision Instruments, Astonbury, UK). Snapwell filters with R_{te} <300 Ω /cm² were discarded.

Experimental Protocols

Freshly isolated AECs were seeded on polycarbonate Transwells (Costar, Cambridge, UK) and grown for 4 days at 37°C (5% CO₂) in a liquid-liquid interface. When the AECs reached confluence, one of four conditions were applied.

Protocol 1. The media were replaced by fresh media only, and the AECs were incubated in normoxia (21% O₂-5% CO₂-74% N₂). After 6 h, the media were replaced by fresh media and AECs were incubated for an additional 12 h in normoxia.

Protocol 2. The medium was replaced by media containing 20 ng/ml cytomix, and the AECs were placed in a box flushed with a hypoxic gas (3% O₂-5% CO₂-92% N₂). After 6 h, the media of the AECs were removed and replaced by DMEM plus 20 ng/ml cytomix and AECs were incubated in hypoxia for an additional 12 h.

Protocol 3. The media were replaced by media containing 20 ng/ml cytomix, and AECs were placed in a box flushed with a hypoxic gas (3% O₂-5% CO₂-92% N₂). After 6 h, the media of the AECs were removed and replaced by MSC-M plus 20 ng/ml cytomix and cells were incubated in hypoxia for an additional 12 h.

Protocol 4. The media were replaced by media containing 20 ng/ml cytomix, and the AECs were placed in a box flushed with a hypoxic gas (3% O₂-5% CO₂-92% N₂). After 6 h, the media of the AECs were removed and replaced by HCYT-MSC-M (cytomix was not added in this protocol since HCYT-MSC-M already contained cytomix) and cells were incubated in hypoxia for additional 12 h.

Measurement of epithelial permeability to protein across AECs

Measurements of protein epithelial permeability from apical to basolateral side of AECs were done 4 days after seeding, as previously described (16). AECs were exposed to normoxia or to 20 ng/ml cytomix plus hypoxia (3% O₂) for 6 h and then the media were removed and replaced by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia; 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and AECs were exposed to hypoxia (3% O₂); 3) media of nonexposed MSC (MSC-M) plus cytomix (20 ng/ml) and AECs were exposed to hypoxia (3% O₂); and 4) medium of MSC exposed to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M) and AECs were exposed to hypoxia (3% O₂). Epithelial protein permeability was then assessed by adding labeled 0.3 μCi/ml ¹²⁵I-albumin only to the upper compartment, at the time of replacement of the media, and the unidirectional flux to the lower compartment was measured over 12 h. There is no hydrostatic pressure gradient between the two compartments. Aliquots of media containing ¹²⁵I-albumin were retained as references for initial radioactivity (R₀). Twelve hours later, apical and basolateral media were collected and medium samples were placed into assay tubes for γ counting. The radioactivity expressed as counts per minute was normalized by the weight of the samples. The epithelial permeability was then calculated as follows: $(R_{\text{basal}}/R_0) \times 100 = \text{epithelial permeability to albumin over 12 h (\%)}$. AEC monolayers with baseline permeability >2% were not used for experiments.

Measurement of bioelectrical properties of AECs. Spontaneous potential difference (PD) and transepithelial resistance (R_{te}) across AECs monolayers were measured using an epithelial voltohmmeter equipped with chopstick-style electrodes (World Precision Instruments, Astonbury, UK). Equivalent short-circuit current (I_{sc}) was calculated by Ohm's law ($I_{\text{sc}} = \text{PD}/R_{\text{te}}$).

Measurement of short circuit current (I_{sc}), transepithelial potential difference, and transepithelial resistance were performed in AECs grown 5 days after seeding, as previously described (46). Snapwell inserts were mounted in vertical diffusion chambers and were bathed with Ringer solution (pH 7.4) continuously bubbled in 5% CO₂-95% air at 37°C. The apical and basolateral chambers were filled with 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, and 15 mM glucose, pH 7.4 adjusted with NaOH. The hemi-chambers were connected to a VCC MC6 voltage clamp (Physiologic Instruments, San Diego, CA) via Ag/AgCl electrodes and 3 M KCl agar bridges. I_{sc} data were acquired by PowerLab (AD Instruments, Colorado Springs, CO) and recorded in Chart software (AD Instruments). Snapwell filters with unstable I_{sc} or with R_{te} <300 Ω/cm² were discarded (discarded filters represented <10% of filters mounted in Ussing chamber and were equally distributed in all experimental conditions). I_{sc} was measured every 5 min by clamping the potential difference to 0 mV for 1 s, and R_{te} was calculated from I_{sc} and potential difference using Ohm's law. Amiloride-sensitive I_{sc} was determined as the difference in current with and without amiloride (10⁻⁵ M).

Experiments were also undertaken to measure sodium influx through apical amiloride-sensitive channels in basolaterally permeabilized cells as previously described (46). AECs were bathed in an apical compartment containing 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, and 15 mM glucose, pH 7.4 adjusted with NaOH, and a basolateral solution containing 10 mM NaCl, 130 mM N-methyl-D-glucamine, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, and 15 mM glucose, pH 7.4 adjusted with HCl for 15 min before the basolateral membrane was permeabilized by the basolateral addition of nystatin (60 mg/ml) a monovalent ionophore. This induced a rapid increase in I_{sc}. Once the I_{sc} reached a new steady state, amiloride (10⁻⁵M) was added in the apical bathing solution and the difference current representing the amiloride-sensitive component of the sodium current across the apical membrane (apical amiloride-sensitive current) was calculated. The voltage was clamped at 0 V for all the I_{sc} measurements.

Other experiments were done to measure Na-K-ATPase activity in apically permeabilized AECs. Cells were bathed in an apical and basolateral compartments containing 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, and 15 mM glucose, pH 7.4 adjusted with NaOH. After the steady-state condition was reached, the apical membrane was permeabilized by apical addition of 60 mg/ml nystatin. Ouabain (1 mM) was added to the basolateral bathing solution, and the basolateral ouabain-sensitive current (representing the fall in I_{sc} evoked by ouabain) was measured to estimate the extrusion capacity of the basolateral Na⁺ pump.

Western blotting of epithelial sodium channel subunits in AECs

Biotinylation and recovery of apical membrane proteins from cultured AECs were performed as previously described (46, 48). In brief, AECs grown on Transwell filters were placed on ice and washed three times with ice-cold PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ (PBS with 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂). Apical membrane proteins were then biotinylated by a 15-min incubation at 4°C with NHS-ss-biotin 1.25 mg/ml (Pierce, Rockford, IL) freshly diluted into biotinylation buffer (10 mM triethanolamine, 2 mM CaCl₂, and 150 mM NaCl, pH 7.5) with gentle agitation. Alveolar type II cells were rinsed with PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ glycine (100 mM) and washed in this buffer for 20 min at 4°C to quench unreacted biotin. Cells were then rinsed twice with PBS-Ca²⁺-Mg²⁺, scraped in cold PBS, and pelleted at 2,000 rpm at 4°C. Pellets were solubilized for 45 min in 20 μl of lysis buffer [1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), pH 7.5] containing protease inhibitors. The lysates were clarified by centrifugation at 14,000 g for 10 min at 4°C, and supernatants were incubated overnight with packed streptavidin-agarose beads (Pierce) to recover biotinylated proteins. The beads were then pelleted by centrifugation, and aliquots of supernatants were taken to represent the unbound, intracellular pool of proteins. Biotinylated proteins were eluted from the beads by heating to 100°C for 5 min in SDS-PAGE sample buffer [containing 10% glycerol, 12.5% 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% of 20% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, and 2.5% of 0.05% (wt/vol) bromophenol blue]. Samples of biotinylated and nonbiotinylated proteins were resolved through 10% acrylamide gels, electroblotted, electrically transferred to nitrocellulose paper, and subsequently probed for the α- or β-rat epithelial sodium channel (ENaC) subunits. To ensure the absence of leakage of biotin into the cells, we systematically verified the absence of the intracellular protein β-actin in biotinylated extracts. Rabbit polyclonal anti-α-rat ENaC subunit and anti-β-rat ENaC subunit antibodies (14, 46) were used at the dilution 1:2,000, and mouse monoclonal anti-β-actin at the dilution 1:5,000. Quantification of rat ENaC and actin levels was obtained using National Institutes of Health Image software. The expression of γ-ENaC at the cell surface could not be investigated in this study, due to the very faint signal of biotinylated γ-ENaC in native rat AECs.

MSC media with and without KGF neutralization

To determine whether the observed effects of MSC-M were due to the presence of KGF, KGF depletion was performed using protein G/agarose beads coated with anti-KGF monoclonal antibody (R&D Systems) or with anti-IgG antibodies (as a control). MSC-conditioned media were incubated at 4°C overnight on wheel with antibodies-conjugated beads. KGF concentrations in MSC medium were measured by ELISA. AECs cultured for 96 h were exposed or not to hypoxia plus cytomix as previously described and incubated with MSC-M depleted or not from KGF. Cultures were maintained for an additional 12 h, at which point AEC monolayers were used for measurement of I_{sc}. In another set of experiments, the preventive effect of recombinant human KGF (rhKGF) on hypoxia plus cytomix-induced injury was tested. AECs exposed or not to hypoxia plus cytomix were incubated for 12 h with rhKGF (200 and 400 pg/ml) before I_{sc} measurements were performed.

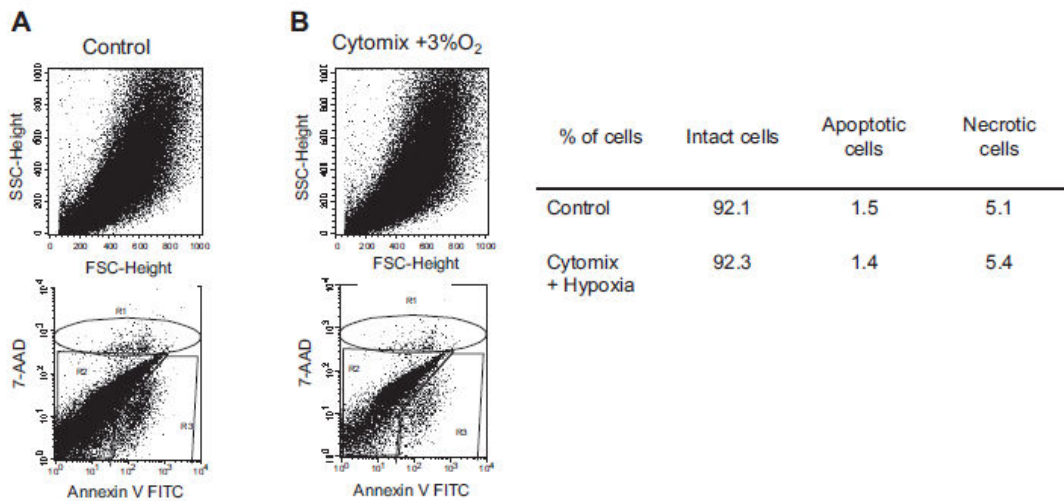


Fig. 1. Effects of cytomix and hypoxia on apoptosis and necrosis of human mesenchymal stromal cells (MSCs). The MSCs were exposed to either normoxia (21% O₂) or to cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂) for 12 h. Apoptosis and necrosis were determined using annexin-V7AAD kit and expressed as the percentage of total cells. Experiments were repeated 3 times. SSC, side-scatter angle.

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD ($n = 3-5$ for flow cytometry experiments, ELISA, transepithelial permeability to albumin determination, and Western blot experiments; $n = 4-17$ for electrophysiological measurements). Statistical analyses were done by unpaired Student's *t*-test for comparison of concentrations of paracrine factors in conditioned media. One-way ANOVAs were performed for all other experiments and, when allowed by the *F* value, results were compared by the modified least significant difference (Fisher's protected least significant difference). $P < 0.05$ was considered significant. The following software was used: StatView (SAS Institute, Cary, NC) and Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

Exposure to Inflammatory and Hypoxic Environment Did Not Alter MSC Viability and Specific MSC Marker Expression

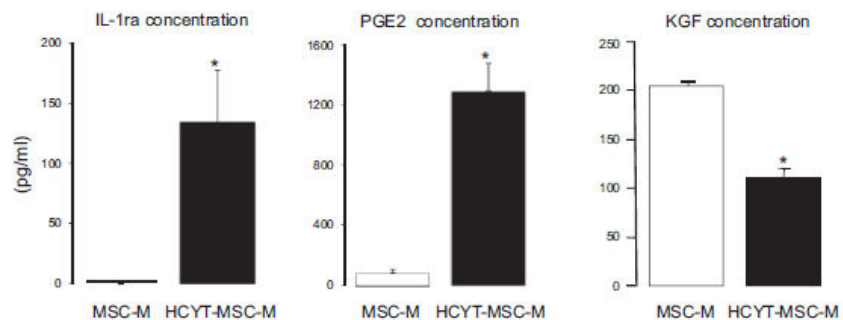
MSCs were exposed to cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂) that is similar to the inflammatory and hypoxic environment during ALI, and they were compared with MSCs exposed to normoxia. Control MSCs as well as MSCs

exposed to cytomix plus hypoxia did not express HLA-DR. The expression of the specific MSC markers CD29, CD95, CD105, CD105a, CD105b, CD105c, CD105e, and CD105f was similar in MSC exposed to cytomix plus hypoxia and in those exposed to normoxia (data not shown). Interestingly, exposure to cytomix plus hypoxia did not change the percentage of intact, apoptotic, or necrotic MSCs compared with control cells (Fig. 1). Cell morphology was also similar in both culture conditions.

Proinflammatory and Hypoxic Environment Altered Paracrine Secretion by MSCs

Previous studies have identified several potential soluble factors that could be responsible in part for the beneficial effects of MSCs on reabsorption of alveolar edema fluid in ALI, such as IL-1ra, PGE-2, and KGF (32, 42, 43). Therefore, we focused on the release of these three mediators by MSCs. The secretion was evaluated in control condition (MSC-M) or after exposure of MSCs to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M). As shown in Fig. 2, conditioned media from MSCs exposed to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M) for 12 h altered their paracrine secretion

Fig. 2. Effect of cytomix plus hypoxia on the release of soluble mediators by MSCs. The MSCs were cultured in DMEM in the absence or presence of cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂). After 12 h, the media of non-exposed cells (MSC-M) or the media of cells exposed to cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂; HCYT-MSC-M) were used for the determination of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), PGE₂, and keratinocyte growth factor (KGF) concentrations. The values represent the means \pm SD of 4-6 experiments in each group. * $P < 0.01$ by unpaired Student's *t*-test.



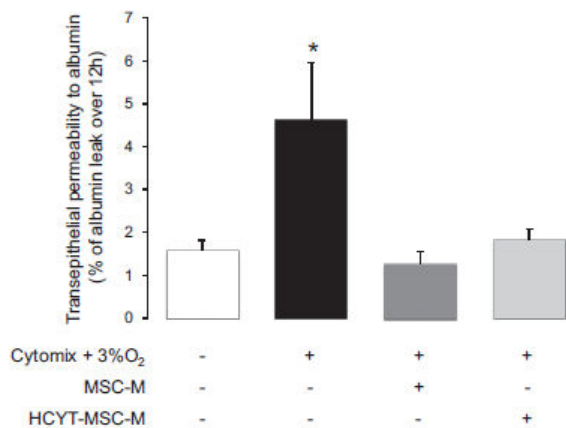


Fig. 3. Effect of MSC medium on cytomix-hypoxia-induced decrease of epithelial permeability to albumin in cultured alveolar epithelial cells. Alveolar epithelial cells (AECs) were seeded on Transwell filters. AECs were exposed or not to cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂) for 6 h. Then, the media were replaced for additional 12 h by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia (21% O₂); 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); 3) media of nonexposed MSC (MSC-M) plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); and 4) medium of MSC exposed to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂). Epithelial protein permeability was then assessed by adding labeled ¹²⁵I-albumin only to the upper compartment, at the time of replacement of the media, and the unidirectional flux to the lower compartment was measured over 12 h. The values are the means \pm SD of 3 experiments in each group. **P* < 0.01, compared with control conditions [one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD)].

compared with MSC-M. Cytomix plus hypoxia induced the release of IL-1ra from 0 to 134 \pm 43 pg/ml and markedly increased the release of PGE₂ from 77 \pm 25 to 1,295 \pm 184 pg/ml. By contrast, cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M) induced a decrease of KGF secretion from 205 \pm 4 to 109 \pm 10 pg/ml compared with MSC-M. These results indicated that acute inflammation in a hypoxic environment modified the MSC secretion of soluble mediators. We were unable to detect IL-10 in the conditioned medium of MSC either in MSC-M or HCYT-MSC-M.

MSC-conditioned Media Prevented the Increase in Albumin Permeability Induced by Cytomix Plus Hypoxia in AEC Monolayers

During ALI, epithelial permeability to protein is increased and favors alveolar flooding (39). To evaluate whether media of MSCs exposed or not to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M or MSC-M) could prevent the increase in epithelial permeability (16), AECs pretreated by cytomix plus hypoxia were exposed to MSC-M or HCYT-MSC-M for 12 h before measurement of epithelial permeability to radiolabeled albumin. Exposure of AECs to hypoxia plus cytomix increased by threefold epithelial permeability compared with the control condition. Treatment with MSC media for 12 h completely prevented the increase in transepithelial permeability to ¹²⁵I-albumin (Fig. 3). MSC-M and HCYT-MSC-M had a similar protective effect on AEC permeability to protein.

MSC-Conditioned Media Prevented the Cytomix Plus Hypoxia-Induced Decrease in Total and Amiloride-Sensitive Transepithelial Na Transport in AECs

The transepithelial Na transport across AECs was evaluated by the amiloride-sensitive component of *I*_{sc} (AS-*I*_{sc}). In control conditions, AS-*I*_{sc} represented 80% of the total *I*_{sc} (Fig. 4A). Hypoxia plus cytomix decreased total *I*_{sc} without change in amiloride-insensitive *I*_{sc}, so that AS-*I*_{sc} was reduced by 60% compared with control (Fig. 4B). Addition of MSC-M completely prevented the cytomix plus hypoxia-induced decrease in total *I*_{sc} and in AS-*I*_{sc} (Fig. 4, A and B) and also increased the amiloride-insensitive component of Na current. By contrast,

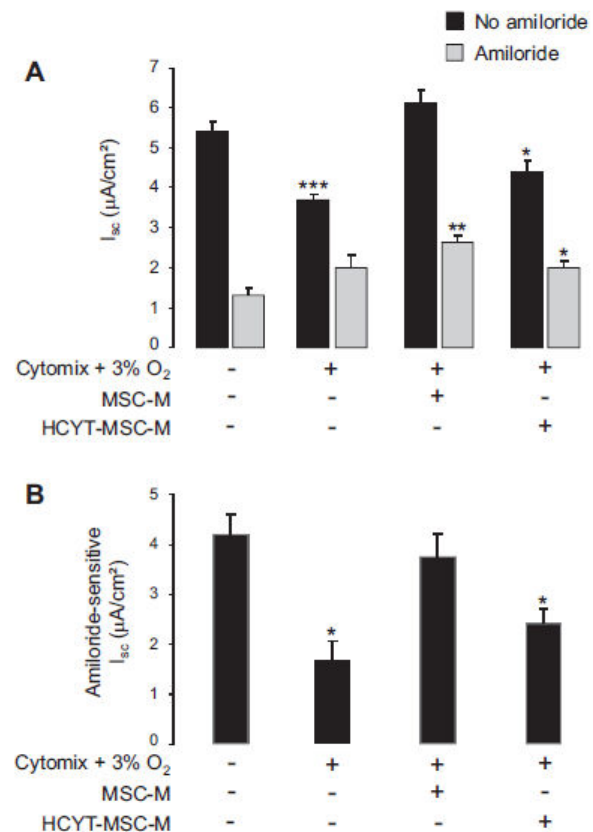


Fig. 4. Effect of MSC-conditioned media on cytomix plus hypoxia-induced decrease of Na transport in alveolar epithelial cells. AECs grown on Snapwell filters were exposed to either normoxia or cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂) for 6 h. Then, the media were replaced for additional 12 h by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia (21% O₂); 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); 3) media of nonexposed MSC (MSC-M) plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); and 4) medium of MSC exposed to cytomix plus hypoxia (HCYT-MSC-M) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂). AECs were mounted into a voltage-clamp system, and short-circuit current (*I*_{sc}) was measured at baseline (black bars) and after addition of amiloride (10⁻⁵ M) into the apical bath (A; gray bars). Amiloride-sensitive *I*_{sc} (B) represents the difference of *I*_{sc} before and after addition of amiloride. The values are the means \pm SD of 4–6 filters for each condition. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001, significantly different from corresponding control value (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD).

HCYT-MSC-M had no significant protective effect on total I_{sc} or $AS-I_{sc}$.

To further test the mechanisms, we evaluated both apical and basolateral Na^+ conductance by measuring I_{sc} on permeabilized monolayers. In the first series of experiments, permeabilization of the basolateral membrane was done in the presence of an asymmetrical Na^+ gradient (140 mM apical vs. 10 mM basolateral). The results showed that hypoxia plus cytomix induced a 60% fall of apical $AS-I_{sc}$ and that MSC-M completely restored the apical $AS-I_{sc}$ current (Fig. 5A). In the second series of experiments, we tested the contribution of the Na^+-K^+ ATPase after permeabilization of the apical membrane. Figure 5B shows that neither hypoxia plus cytomix nor MSC-M did significantly alter the basolateral ouabain-sensitive current reflecting Na^+-K^+ -ATPase activity.

MSC-Conditioned Media Restored the Membrane Expression of α -ENaC But Did Not Modify β -ENaC Expression After Exposure to Inflammatory and Hypoxic Conditions

The effects of hypoxia plus cytomix in the presence or absence of MSC-M on ENaC subunit expression were evaluated (Fig. 6). First, the total protein levels of α - and β -ENaC subunits were determined in AECs exposed to hypoxia plus cytomix in the presence or absence of MSC-M. Figure 6 shows that hypoxia plus cytomix induced no significant changes in the total protein expression of the α -ENaC (major band at 85 kDa and minor band at 65 kDa) and β -ENaC (95 kDa band) subunits and that MSC-M had no effect on the total protein expression of α - and β -ENaC subunits. Second, apical surface biotinylation experiments were performed to evaluate cell surface expression of α - or β -ENaC in AECs exposed to the above experimental conditions. Exposure to hypoxia plus cytomix significantly decreased α -ENaC protein expression in apical cell surface and had no effect on β -ENaC expression

(Fig. 7). This result indicates that the decrease in apical $AS-I_{sc}$ was partly related to a decrease of α -ENaC protein in apical membrane. Incubation with MSC-M completely prevented the decrease of α -ENaC membrane expression in AECs exposed to hypoxia plus cytomix.

KGF-Depleted MSC-M Had No Protective Effect on Hypoxia Plus Cytomix-Induced Decrease in Na Transport in AECs

To define whether the beneficial effects of MSC-M were related in part to KGF, the MSC-M medium was depleted of KGF using an anti-KGF antibody (IgG were used as control). The concentration of KGF declined from 190 ± 63 to 0 pg/ml in control conditions and after depletion of KGF. KGF-depleted MSC-M had no protective effect on hypoxia plus cytomix-induced decrease in Na transport (Fig. 8A). To test whether KGF was sufficient per se to prevent the hypoxia plus cytomix-induced decrease in Na transport, we finally evaluated the potential effect of rhKGF. As shown in Fig. 8B, incubation of AECs with rhKGF (200 or 400 pg/ml) had no protective effect on hypoxia plus cytomix-induced decrease in Na transport.

DISCUSSION

The major findings of this study can be summarized as follows: 1) MSC exposure to an inflammatory and hypoxic environment induced substantial changes in the secretion of paracrine factors known to upregulate Na and fluid transport in ALI: IL-1ra, PGE₂, and KGF. 2) The inflammatory and hypoxic insult to AECs induced a threefold increase in transepithelial permeability to albumin and a 60% decrease in the transepithelial sodium transport due to a decreased apical amiloride-sensitive Na uptake without a change in Na^+-K^+ -ATPase activity. This decreased vectorial Na transport was

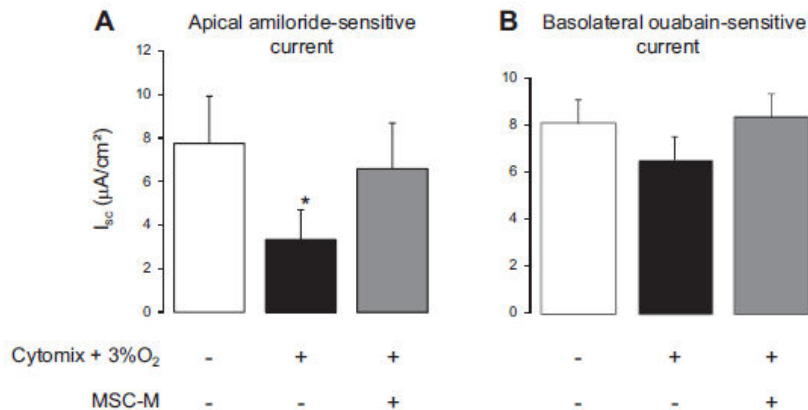


Fig. 5. AECs grown on Snapwell filters were exposed to either normoxia or cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂) for 6 h. Then, the media were replaced for additional 12 h by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia (21% O₂); 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); and 3) media of nonexposed MSC (MSC-M) plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂). A: AECs were mounted into a voltage-clamp system in the presence of a Na^+ concentration gradient (mucosal to serosal, 140:10 mM). Addition of nystatin into the basolateral bath increased the I_{sc} to a peak value before amiloride (10 μM) was added into the apical bath. Apical amiloride-sensitive current is the difference between I_{sc} peak value and I_{sc} value after amiloride addition and reflects epithelial sodium channel (ENaC) activity; B: AECs were then immediately mounted into a voltage-clamp system. After stabilization, nystatin into the apical bath evoked a slowly developing rise in I_{sc} and ouabain (1 mM) was added to the basolateral solution once this response had reached its peak value. Basolateral ouabain-sensitive current representing the fall in I_{sc} evoked by this application of ouabain was measured to estimate the extrusion capacity of the basolateral Na^+ pump. The values are the means \pm SD of 5–8 filters for each condition. * $P < 0.01$, compared with control conditions (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD).

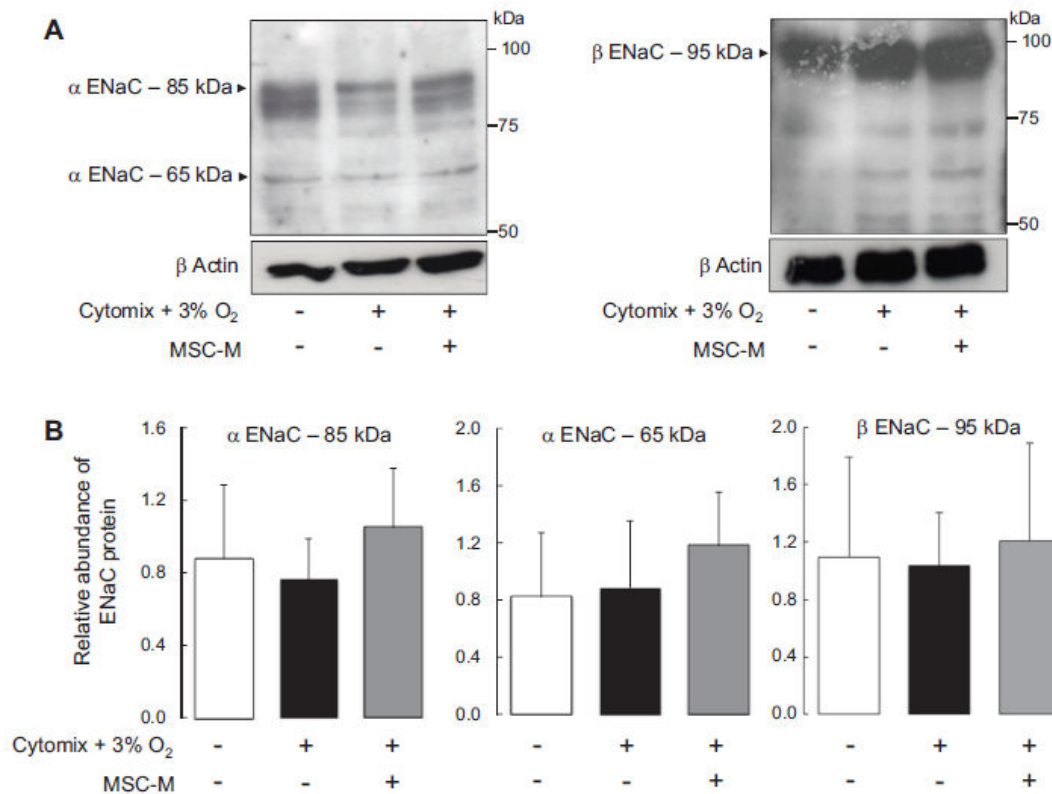


Fig. 6. Effect of cytomix plus hypoxia in the presence or absence of MSC-conditioned media on total protein levels of the α - and β -subunits of ENaC in alveolar epithelial cells. AECs grown on Transwell filters were exposed to either normoxia or cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂). After 6 h, the media were replaced for additional 12 h by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia (21% O₂); and 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and presence of cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂). Western blot experiments were performed on whole cells extracts using rabbit polyclonal antibodies raised against rat α -ENaC (A, left) and rat β -ENaC (A, right). Quantification of α -ENaC (85 and 65 kDa) and β -ENaC levels was obtained using Scion Image software, and the data were normalized for the corresponding actin signal in each lane (B). Results are expressed as the ratios of α - and β -ENaC/actin. The values are the means \pm SD of 5 separate experiments (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD).

associated with a decline in α -ENaC subunit expression at the apical membrane. 3) Conditioned media of MSCs exposed or not to hypoxia plus cytomix (HCYT-MSC-M and MSC-M) completely prevented the increase in transepithelial permeability to albumin. 4) MSC-M prevented cytomix-hypoxia-induced decrease of Na transport in AECs, restored amiloride-sensitive apical Na transport, and maintained α -ENaC cell surface expression. In contrast, HCYT-MSC-M had no significant effect on cytomix-hypoxia-induced decrease in Na transport. 5) secretion of KGF by MSCs was required for the protective effect of MSC-M on alveolar epithelial Na transport. This study provides the proof of concept that paracrine factors produced by MSCs in the damaged lung may have beneficial effects in vivo by preventing alveolar flooding.

In recent years, MSCs have emerged as a potential therapeutic modality for several inflammatory states, including ALI. Some studies have demonstrated benefits from intratracheal or intravenous administration of MSCs (4, 21, 41). MSCs attenuate the inflammatory response to LPS and reduce the severity of lung injury. In most ALI models, the engraftment rates of MSCs were low (26, 27, 50) and a therapeutic effect occurred within 24–48 h, suggesting that beyond cell replacement,

MSCs may be releasing factors responsible for beneficial effect of cell therapy. Because the use of MSCs may carry some risks to the patient (2, 38), the administration of MSC-conditioned medium might provide an alternative therapeutic option for ALI/ARDS. In ALI models, MSCs delivered by either intratracheal or intravenous routes were primarily located in the lung microcirculation and alveoli and therefore are directly exposed to alveolar hypoxia and high levels of proinflammatory cytokines from existing and evolving inflammatory reactions. Therefore, we hypothesized that this inflammatory environment may induce changes in MSCs phenotype that could modify the paracrine secretion profile of MSCs and modulate their capacity to repair damaged epithelium. To evaluate the role of the inflammatory and hypoxic environment on MSCs and their conditioned medium, we exposed MSCs to hypoxia plus a mixture of the major biologically cytokines present in ALI pulmonary edema, IL-1 β , TNF- α , and IFN γ (referred to as cytomix), as in prior studies (31). The results showed that MSCs exposed to hypoxia plus cytomix do not exhibit changes in their cell surface markers, cell survival, or the degree of apoptosis. In a mice model of endotoxin induced ALI, MSC instillation improved survival through the secretion several

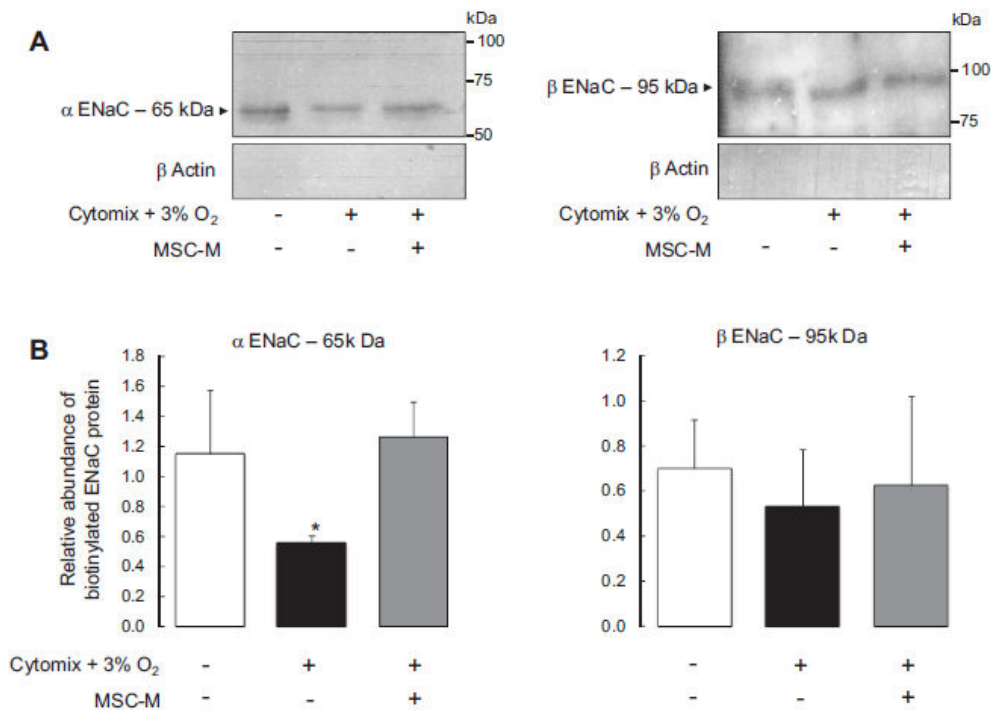


Fig. 7. Effect of cytomix plus hypoxia on apical cell surface expression of α - and β -ENaC subunits in alveolar epithelial cells in the presence or absence of MSC-conditioned media. AEC grown on Transwell filters were exposed to either normoxia or cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂). After 6 h, the media were replaced for additional 12 h by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia (21% O₂); 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); and 3) the medium of nonexposed MSC (MSC-M) in the presence of cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂). Then, AECs were immediately processed for apical biotinylation experiments as described in *Experimental Protocols* before immunoblotting. A: representative immunoblots of α -ENaC (left) and β -ENaC (right) cell surface, and of intracellular protein expression of β -actin. The validity of surface biotinylation approach in control and treated cells is attested by the cell surface expression of α - and β -ENaC but not of the intracellular protein β -actin. The quantification of biotinylated surface proteins for α -ENaC (65 kDa) (left) and β -ENaC (right) is shown in B. Quantification of biotinylated α - and β -ENaC signals was obtained using Scion Image software, and the data were normalized for the actin signal in corresponding intracellular extracts. The values are the means \pm SD of 4 separate experiments. * $P < 0.01$, compared with control conditions (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD).

factors including IL-1ra (43), PGE₂ (42), IL-10, and KGF (23, 34). Therefore, the present study tested the influence of inflammatory and hypoxic conditions on the secretion of these key candidates in the MSC-conditioned medium. In MSCs exposed to the hypoxic and inflammatory stimuli, the conditioned medium contained higher IL-1ra and PGE₂ concentrations (10- and 4-fold, respectively) and lower KGF concentrations compared with MSCs cultured in control conditions. Hypoxia plus cytomix probably increased IL-1ra and PGE₂ secretion because of the presence of IL-1 β in the cytomix (43). Interestingly, IL-1 β is one of the major inflammatory cytokines in pulmonary edema fluid from patients with ALI/ARDS (18, 22) and IL-1ra competes with IL-1 β for IL-1 receptor binding. In the present study IL-10 was undetectable in control condition as well as after hypoxic and inflammatory insults. This result was in agreement with a prior observation that in ALI, the increase of IL-10 in the alveolar space after MSC treatment did not result from direct MSC secretion but rather as the result of PGE₂ release from alveolar macrophages reprogrammed by MSCs (43). The present study is the first report showing that the combination of an hypoxic and proinflammatory insult decreases KGF secretion by MSCs. This result is unexpected since a prior study reported an increased release of growth

factors such as VEGF, IGF-1, and HGF in MSCs exposed to LPS, TNF- α , or hypoxia (11).

The alteration of alveolar ion transport, lung inflammation, or/and increased endothelial permeability are well-known features of the ALI pathophysiology (17, 34, 42). Previous studies reported a beneficial effect of MSCs in a model of ALI induced by intratracheal instillation of *Escherichia coli* endotoxin with reduced mortality and less pulmonary edema (21, 23). Similar results were published in an ex vivo perfused human lung model, in which MSCs reversed endotoxin-induced lung injury by restoring alveolar fluid clearance and reducing pulmonary edema (34). Interestingly, in a model of ventilator-induced lung injury, a similar beneficial effect was obtained by using either MSCs or MSC-conditioned medium (23).

In this study, we tested the efficacy of MSC-conditioned media on the epithelial permeability and the vectorial sodium transport in an in vitro model of ALI (16). In this in vitro model of ALI, AECs were exposed to cytomix plus hypoxia for 6 h before treatment with MSC-conditioned media, harvested either from MSCs cultured in normal conditions (MSC-M) or from MSCs exposed to inflammatory and hypoxic insults (HCYT-MSC-M). Exposure of AECs to cytomix plus hypoxia increased paracellular permeability by threefold as previously

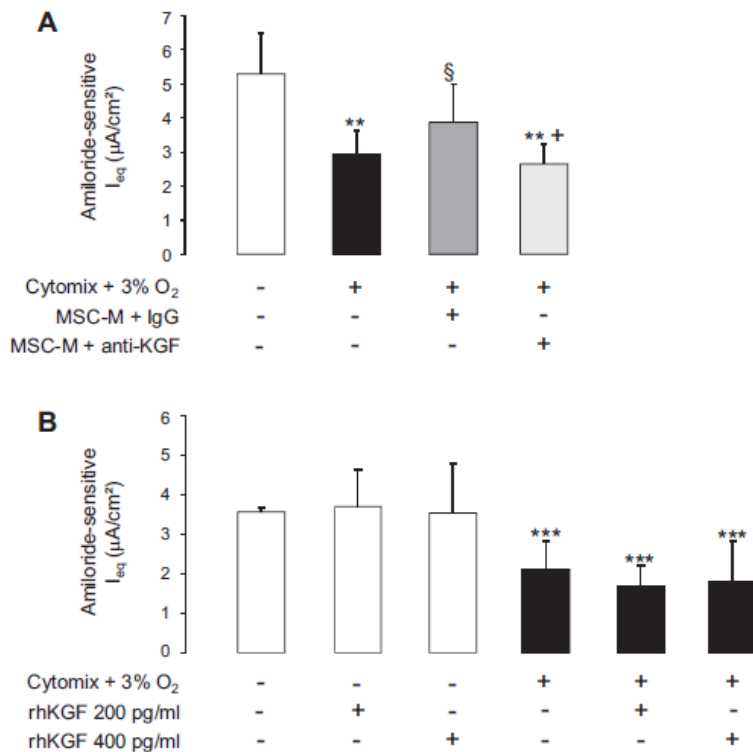


Fig. 8. Effect of MSC-conditioned media depleted of KGF and of recombinant human KGF (rhKGF) on the cytomix plus hypoxia-induced decrease in Na transport. *A*: AECs grown on Transwell filters were exposed to either normoxia or cytomix (20 ng/ml) plus hypoxia (3% O₂). After 6 h, the media were replaced for additional 12 h by 1) DMEM alone and AECs were exposed to normoxia (21% O₂); 2) DMEM plus cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); 3) the media of nonexposed MSC (MSC-M) in the presence of cytomix (20 ng/ml) plus IgG and cells were exposed to hypoxia (3% O₂); and 4) the media of nonexposed MSC (MSC-M) depleted of KGF as described in *Experimental Procedures* in the presence of cytomix (20 ng/ml) and cells were exposed to hypoxia (3% O₂). I_{eq} was measured before and after addition of amiloride (10 μM) was added into the apical bath. Amiloride-sensitive I_{eq} represents the difference of I_{sc} before and after addition of amiloride. The values are the means ± SD of 8–14 filters for each condition. ***P* < 0.01, compared with control conditions; §*P* < 0.05, compared with cytomix plus hypoxia; +*P* < 0.05, compared with cytomix plus hypoxia in presence of MSC-M plus IgG (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD). *B*: after a 6 h exposure to normoxia (white bars) or cytomix plus hypoxia (black bars), AECs were treated with rhKGF (200 or 400 pg/ml) or vehicle for additional 12 h and amiloride-sensitive I_{eq} was calculated. Values are means ± SD of 8–17 filters for each condition. ****P* < 0.001, compared with normoxic corresponding value (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD).

reported (31) and a 60% decrease in apical to basolateral vectorial Na transport. To determine whether cytomix and hypoxia altered Na entry and/or extrusion, we studied Na transport after permeabilization of AEC basolateral or apical membrane. Exposure of AECs to cytomix plus hypoxia induced a decrease in Na transport that was related to a diminished apical expression of amiloride-sensitive Na channels whereas ouabain-sensitive basolateral Na transport, reflecting Na-K-ATPase activity, remained unchanged. The cytomix plus hypoxia-induced reduction of Na current was related to a reduction of the number of Na channels in the apical membrane as demonstrated by the biotinylation experiments that showed a decrease of α-ENaC apical cell surface expression while total protein content of α-ENaC was unchanged. We and other investigators have reported that short-term exposure to moderate hypoxia decrease Na transport by internalization of ENaC subunits without a change in the total protein content (10, 12, 46). Lee et al. (32) previously showed that 50 ng/ml cytomix for 24 h decreased α-ENaC protein levels in the apical membrane of human AECs in parallel with reduced α-ENaC protein content. The discrepancy concerning the effect of cytomix on ENaC protein total cell content may be explained by the fact that we used a lower concentration of cytomix than Lee et al. In the present study, the decrease in α-ENaC subunits in the apical membrane likely results from additive effects of hypoxia plus cytomix on ENaC subunit trafficking.

The most significant finding of this study is that MSC-conditioned medium restored normal epithelial permeability to protein and prevented the decrease in transepithelial Na transport. Interestingly, HCYT-MSC-M was as potent as MSC-M

for preventing the decrease in transepithelial albumin permeability, suggesting that paracrine factors released by MSC exposed to the inflammatory milieu of ALI/ARDS could protect in vivo the lungs from flooding. MSC-M (but not HCYT-MSC-M) also restored cytomix plus hypoxia-induced decrease of transepithelial Na transport. From a biochemical standpoint, MSC-M restored the cell surface expression of α-ENaC, suggesting that the beneficial effect of MSC-M on vectorial Na transport was due, at least in part, to an effect on ENaC trafficking. Another explanation would be that MSC-M somehow favored the activation of ENaC channels at the cell surface by membrane-bound serine proteases (such as channel activating proteases) (47). For instance, MSC-M may prevent the inactivation of these proteases by reactive intermediates known to be present in bronchoalveolar lavage during ALI/ARDS (30). In addition, it is possible that MSC-M also stimulated apical Na transporters distinct from ENaC [such as the cyclic nucleotide gated (CNG) cationic channels (25)], inasmuch as it increased the amiloride-insensitive component of Na transport in injured AECs. However, the increase in amiloride-insensitive currents could also be due to a decrease in the sensitivity of Na channels to amiloride, as previously reported (24, 49).

Since PGE₂ and IL-1ra concentrations were low in MSC-M compared with HCYT-MSC-M, the higher potency of MSC-M to restore the Na transport under hypoxia plus cytomix seemed likely to be mediated by KGF. This result is remarkable because PGE₂ is known to increase the intracellular cAMP, a key nucleotide for the stimulation of Na transport (13, 15, 46). In line with our results, prior studies in rats and sheep showed that PGE₂ had no influence on alveolar liquid clearance (5).

The very limited effect of HCYT-MSC-M despite increased levels of IL-1ra was also surprising since cytomix contained IL-1 β , which has been reported to inhibit Na transport in AECs (22). Thus it seemed possible that the higher concentration of KGF in MSC-M compared with HCYT-MSC-M accounted for most of the beneficial effect of MSC-M. Indeed, several arguments favor this hypothesis. First, KGF has been reported to increase alveolar fluid transport in rat lung and to stimulate active Na ion transport in AECs by upregulating α -ENaC protein expression and Na-K-ATPase activity (6, 20, 52). Second, Lee et al. (32) reported that in an ex vivo perfused human lung, the instillation of human MSC following endotoxin-induced lung injury restored alveolar fluid clearance and increased vectorial Na transport, in part, due to KGF release, an observation recently confirmed in a live bacterial model of lung injury in ex vivo perfused human lungs (35). Third, these authors also reported that in MSC treated with siRNA KGF the medium was unable to restore cytomix-induced decreased transepithelial fluid transport over 24 h in AECs. Consistent with these observations, the current study shows that MSC-M completely depleted of KGF lost its beneficial effect on AEC amiloride-sensitive Na transport. However, incubation of AECs with rhKGF at concentrations similar to what was observed in MSC-M was unable to prevent the hypoxia plus cytomix-induced inhibition of Na transport. All together, our data indicate that secreted KGF probably plays a role in the therapeutic effect of the MSC media, although it is not sufficient per se to induce this effect.

One limitation of the present study is that our in vitro model combined cells originating from two different species, i.e., rat AECs and human MSCs. Unfortunately, human AEC lines are not really suitable for electrophysiological experiments in Ussing chamber, namely because of low endogenous expression of ENaC subunits and low transepithelial resistance. Primary rat AECs are usually considered as good surrogates for human AECs, which are very difficult to isolate. It is relevant to emphasize that previous studies have shown that human MSCs were effective in vivo in several rodent models of injury (7, 36, 37). One reason for that may be that most paracrine factors secreted by MSCs (such as KGF, IL-1-ra, and PGE₂) show considerable homology across species. Indeed, it is well recognized that recombinant human proteins (rhKGF and rhIL-1-ra) have a biological effect on rodent AECs (17, 45). The fact that we observed a clear beneficial effect of human MSC media on rat AECs indicates that our model, despite the species difference, still represents a valuable tool for studying in vitro the crosstalk between AECs and MSCs.

In conclusion, the conditioned media of MSCs restored epithelial permeability to normal and completely prevented the decrease in amiloride-sensitive apical Na transport and α -ENaC cell surface expression induced by inflammatory and hypoxic insults, suggesting that the use of MSC-conditioned media may be relevant as a therapeutic in ALI. Secretion of the paracrine factor KGF by MSCs was required for the protective effect on alveolar epithelial Na transport.

GRANTS

This work was supported by Legs Poix from Chancellerie des Universités de Paris. A. Goolaeerts is the recipient of a European Respiratory Society/Marie Curie Joint Research Fellowship-Number MC 1219-2009. The research leading to these results has received funding from the European Respiratory Society and the European Community's Seventh Framework Program FP7/

2007–2013–Marie Curie Actions under Grant Agreement RESPIRE, PCO-FUND-GA-2008-229571. The work was also supported by National Heart, Lung, and Blood Institute Grant HL-51854 (to M. A. Matthay).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: A.G., N.P.-R., V.V., Y.U., T.G., and N.D. performed experiments; A.G., N.P.-R., V.V., Y.U., T.G., N.D., C.I.P., and C.C. analyzed data; A.G., J.L., T.G., and C.I.P. prepared figures; A.G., N.P.-R., J.L., V.V., Y.U., N.D., C.I.P., and M.A.M. approved final version of manuscript; J.L., C.I.P., M.A.M., and C.C. conception and design of research; J.L., C.I.P., and C.C. drafted manuscript; T.G., C.I.P., M.A.M., and C.C. interpreted results of experiments; C.I.P., M.A.M., and C.C. edited and revised manuscript.

REFERENCES

1. Abreu SC, Antunes MA, Pelosi P, Morales MM, Rocco PR. Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases. *Intensive Care Med* 37: 1421–1431, 2011.
2. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S, Rechavi G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6: e1000029, 2009.
3. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, Larghero J. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21: 158–163, 2007.
4. Aslam M, Baveja R, Liang OD, Fernandez-Gonzalez A, Lee C, Mitsialis SA, Kourembanas S. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1122–1130, 2009.
5. Berthiaume Y, Folkesson HG, Matthay MA. Indomethacin does not influence alveolar liquid clearance in anesthetized sheep or rats. *Exp Lung Res* 25: 517–530, 1999.
6. Borok Z, Danto SI, Dimen LL, Zhang XL, Lubman RL. Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar epithelial cells: upregulation of active ion transport by KGF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L149–L158, 1998.
7. Bruno S, Grange C, Deregis MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 20: 1053–1067, 2009.
8. Cepkova M, Brady S, Sapru A, Matthay MA, Church G. Biological markers of lung injury before and after the institution of positive pressure ventilation in patients with acute lung injury. *Crit Care* 10: R126, 2006.
9. Chen L, Tredget EE, Liu C, Wu Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One* 4: e7119, 2009.
10. Clerici C, Matthay MA. Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins. *J Appl Physiol* 88: 1890–1896, 2000.
11. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF- κ B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C675–C682, 2008.
12. Dada IA, Sznajder JI. Hypoxic inhibition of alveolar fluid reabsorption. *Adv Exp Med Biol* 618: 159–168, 2007.
13. Downs CA, Kriener LH, Yu L, Eaton DC, Jain L, Helms MN. β -Adrenergic agonists differentially regulate highly selective and nonselective epithelial sodium channels to promote alveolar fluid clearance in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302: L1167–L1178, 2012.
14. Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC. Cell-specific expression of epithelial sodium channel α , β and γ subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 127: 1907–1921, 1994.
15. Factor P, Adir Y, Mutlu GM, Burhop J, Dumasius V. Effects of beta2-adrenergic receptor overexpression on alveolar epithelial active transport. *J Allergy Clin Immunol* 110: S242–246, 2002.
16. Fang X, Neyrinck AP, Matthay MA, Lee JW. Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured

- human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1. *J Biol Chem* 285: 26211–26222, 2010.
17. Frank JA, Pittet JF, Wray C, Matthay MA. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax* 63: 147–153, 2008.
 18. Geiser T, Atabai K, Jarreau PH, Ware LB, Pugin J, Matthay MA. Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments in vitro alveolar epithelial repair by an IL-1beta-dependent mechanism. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1384–1388, 2001.
 19. Gotts JE, Matthay MA. Mesenchymal stem cells and acute lung injury. *Crit Care Clin* 27: 719–733, 2011.
 20. Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, Nelson S. Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1777–1784, 1997.
 21. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 179: 1855–1863, 2007.
 22. Howard M, Roux J, Iles KE, Miyazawa B, Christiaans S, Anjum N, Dickinson DA, Goolaerts A, Matthay MA, Pittet JF. Activation of the heat shock response attenuates the interleukin 1beta-mediated inhibition of the amiloride-sensitive alveolar epithelial ion transport. *Shock* 39: 189–196, 2013.
 23. Ionescu L, Byrne RN, van Haften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, Weissmann G, Hall A, Eaton F, Thebaud B. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L967–L977, 2012.
 24. Ji HL, Zhao RZ, Chen ZX, Shetty S, Idell S, Matalon S. δ ENaC: a novel divergent amiloride-inhibitable sodium channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L1013–L1026, 2012.
 25. Kemp PJ, Kim KJ, Borok Z, Crandall ED. Re-evaluating the Na^+ conductance of adult rat alveolar type II pneumocytes: evidence for the involvement of cGMP-activated cation channels. *J Physiol* 536: 693–701, 2001.
 26. Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 328–334, 2005.
 27. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128: 5181–5188, 2001.
 28. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369–377, 2001.
 29. Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 126: 2601–2611, 2012.
 30. Lazrak A, Nita I, Subramaniam D, Wei S, Song W, Ji HL, Jancauskiene S, Matalon S. Alpha(1)-antitrypsin inhibits epithelial Na^+ transport in vitro and in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 261–270, 2009.
 31. Lee JW, Fang X, Dolganov G, Fremont RD, Bastarache JA, Ware LB, Matthay MA. Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells. *J Biol Chem* 282: 24109–24119, 2007.
 32. Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16357–16362, 2009.
 33. Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Concise review: mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* 29: 913–919, 2011.
 34. Lee JW, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1259–1270, 2009.
 35. Lee JW, Krasnodembskaya A, McKenna DH, Song Y, Abbott J, Matthay MA. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in vivo human lungs injured with live bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 751–760, 2013.
 36. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5: 54–63, 2009.
 37. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17438–17443, 2006.
 38. Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol* 43: 1018–1023, 2008.
 39. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 122: 2731–2740, 2012.
 40. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 319–327, 2005.
 41. Mei SH, McCarter SD, Deng Y, Parker CH, Liles WC, Stewart DJ. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med* 4: e269, 2007.
 42. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15: 42–49, 2009.
 43. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11002–11007, 2007.
 44. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8407–8411, 2003.
 45. Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, Mason RJ. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 92: 969–977, 1993.
 46. Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, Clerici C. Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 47318–47324, 2002.
 47. Planès C, Leyvraz C, Uchida T, Angelova MA, Vuagniaux G, Hummler E, Matthay MA, Clerici C, Rossier B. In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L1099–L1109, 2005.
 48. Prulière-Escabasse V, Planès C, Escudier E, Fanen P, Coste A, Clerici C. Modulation of epithelial sodium channel trafficking and function by sodium 4-phenylbutyrate in human nasal epithelial cells. *J Biol Chem* 282: 34048–34057, 2007.
 49. Randrianarison N, Clerici C, Ferreira C, Fontayne A, Pradervand S, Fowler-Jaeger N, Hummler E, Rossier BC, Planès C. Low expression of the β -ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L409–L416, 2008.
 50. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 145–152, 2005.
 51. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353: 1685–1693, 2005.
 52. Wang Y, Folkesson HG, Jayr C, Ware LB, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy. *J Appl Physiol* 87: 1852–1860, 1999.
 53. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1376–1383, 2001.

SCHÉMA DE L'ÉTUDE

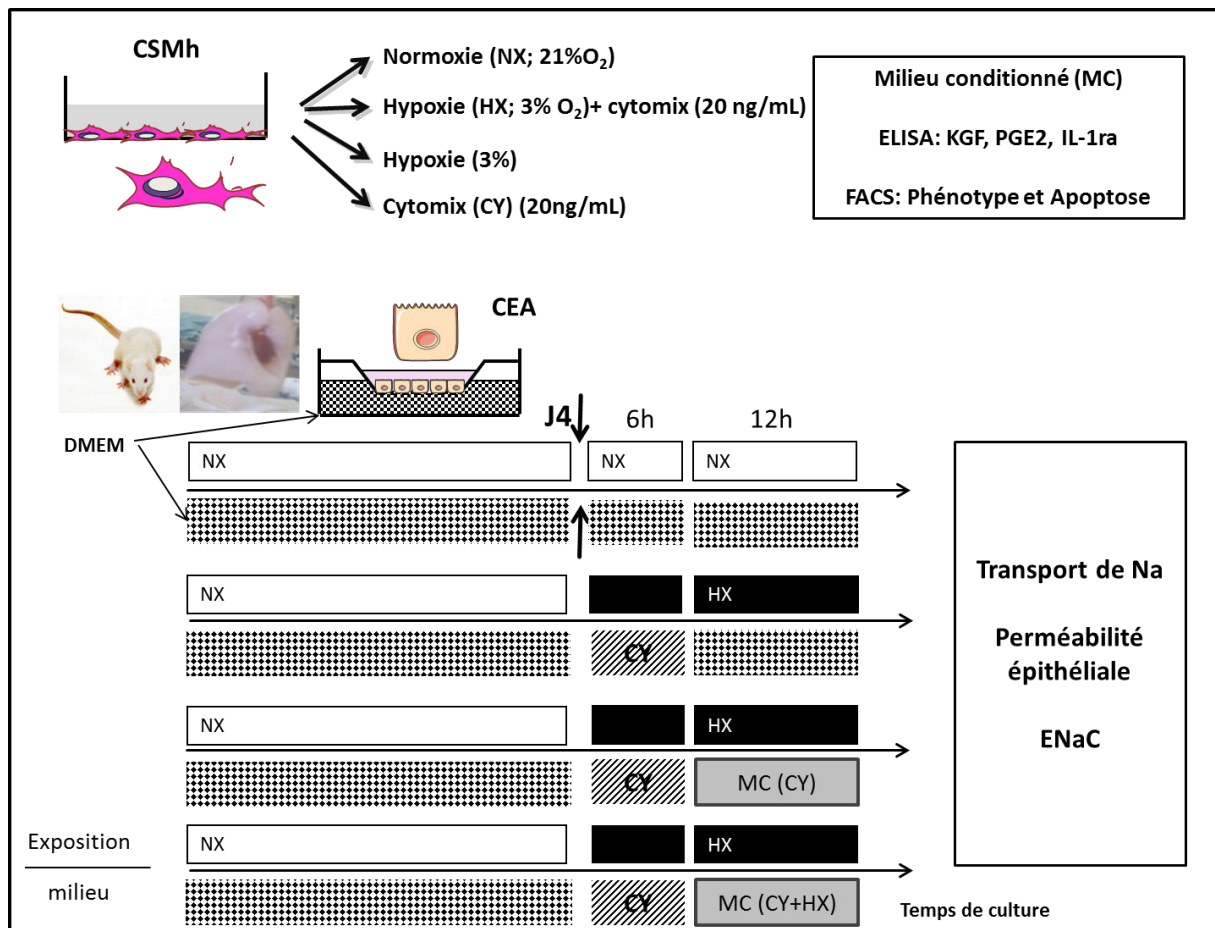


Figure 16: Schéma du protocole d'étude.

Le modèle d'agression a consisté en une hypoxie aiguë à 3% d'oxygène en présence de « *cytomix* » à 20 ng/mL, mélange associant TNF- α , IL1- β et IFN- γ , principales cytokines pro-inflammatoires décrites au cours du SDRA (Lee, Fang et al. 2007).

Abréviations : CSMh cellules souches mésenchymateuses humaines ; CY, cytomix. KGF keratinocyte growth factor, PGE2 prostaglandine E2, IL-1ra Interleukine-1 receptor antagonist. DMEM Dulbecco's medium. FACS : cytométrie en flux

RESUME DES RESULTATS

Ce travail montre que l'exposition des CSMh à un environnement hypoxique et inflammatoire induit des modifications de leur secretome et notamment des médiateurs pouvant être impliqués dans la réabsorption de l'œdème alvéolaire : IL1- α , PGE2 et KGF. L'hypoxie et le *cytomix* ne semblent en revanche pas modifier le phénotype des CSMh selon les marquages usuels, à savoir l'expression des marqueurs spécifiques CD29, CD95, CD105, CD105a, CD105b, CD105c, CD105e, CD105f et l'absence d'expression de HLA-DR. Cette exposition n'a pas non plus d'incidence notable sur la viabilité des cellules avec un taux de nécrose et un taux d'apoptose comparables à la condition témoin en normoxie.

Les altérations épithéliales induites par l'hypoxie et le *cytomix* sur les CEA de rats en culture primaire comprennent une augmentation de la perméabilité épithéliale. L'exposition à cet environnement inflammatoire et hypoxique induit une modification du transport de Na apical lié à la baisse de l'activité amiloride-sensible du canal ENaC, tandis que l'activité ouabaine-sensible de la Na, K-ATPase baso-latérale reste inchangée. La diminution d'activité d'ENaC est associée à une diminution d'expression à la membrane de la sous-unité α -ENaC comme le montrent les résultats des biotinylation de surface, alors que l'expression totale de la protéine α -ENaC est inchangée.

Qu'il soit obtenu en normoxie ou en hypoxie-cytomix, le milieu de culture de CSM prévient l'augmentation de la perméabilité épithéliale. Le milieu de culture conditionné en normoxie des CSMh prévient l'inhibition du transport de Na en restaurant l'expression à la surface de la sous-unité α -ENaC, tandis que le milieu de culture obtenu sous hypoxie-cytomix n'a pas d'effet protecteur.

Enfin, ce travail souligne que la sécrétion de KGF est indispensable au maintien des propriétés protectrices des CSM. En effet, le milieu conditionné de CSMh perd ses propriétés protectrices sur la perméabilité épithéliale et sur l'adressage à la membrane de la sous-unité α -ENaC.

Ces résultats *in vitro* viennent donc confirmer l'importance de la production de médiateurs paracrines dans les effets bénéfiques observés *in vivo* dans la lutte contre l'œdème alvéolaire au cours des modèles d'agression pulmonaire aiguë.

C. DISCUSSION

CRITIQUE DU MODELE UTILISE

Parmi les limites de ce travail, on peut citer avant tout la combinaison de cellules issues de deux espèces différentes, à savoir des cultures primaires de pneumocytes de rat et des CSM humaines. Le choix d'étudier des CSM d'origine humaine issues de moelle osseuse est justifié dans la perspective de futures thérapies cellulaires chez les patients atteints de SDRA, qui utiliseraient des CSM humaines. Outre le fait que ce modèle a été appliqué par différentes équipes (Lee, Fang et al. 2009) (Moodley, Atienza et al. 2009), plusieurs arguments peuvent être avancés. Le choix des CSM humaines d'origine médullaire repose sur le fait que ces cellules sont régulièrement recueillies à partir de dons de moelle et que leur culture permet d'obtenir des cellules assez aisément disponibles au sein bien sûr des structures spécialisées et habilitées. Les CSM humaines d'origine médullaire utilisées dans ce travail sont obtenues dans un laboratoire de thérapie cellulaire qui a une grande expertise de ces cellules et dont la caractérisation répond bien aux critères de définition des CSM tout au long de leur culture (Dominici, Le Blanc et al. 2006; Keating 2012). Parmi les principales propriétés des CSM, figurent la faible expression de molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II à leur surface et l'absence d'expression de molécules co-stimulation des lymphocytes T (CD40, CD80 et CD86) (Le Blanc 2003) permettant leur administration allogénique, faisant d'elles des candidates idéales pour des thérapies innovantes en thérapie cellulaire (Walter, Ware et al. 2014) (Wilson, Liu et al. 2015) (Weiss, Casaburi et al. 2013; Weiss 2015). Enfin, au sein du secretome des CSMh, de nombreux médiateurs gardent une grande homologie inter-espèce. L'administration en effet de produits dérivés de l'homme (rhKGF), peut être bénéfique sur des CEA provenant de rats.

L'idéal aurait été de travailler avec des cellules alvéolaires humaines. Nous avons tenté à plusieurs reprises de faire des extractions de CEA humaines à partir de poumons de donneurs non retenus pour la transplantation dans le respect des études réalisées sur matériel humain selon les recommandations de l'agence de la biomédecine. Cependant, malgré un respect scrupuleux du protocole fourni par l'équipe de M. Matthay (UCSF, San

Francisco), les cellules obtenues n'ont pas pu être maintenues en culture et le tapis cellulaire n'était pas suffisamment jointif pour permettre des tests électrophysiologiques en chambre de Ussing. Les lignées de CEA humaines posent les mêmes difficultés en termes de mesures électrophysiologiques. L'utilisation de cultures primaires de rats offre un bon substitut aux cellules humaines. De plus, les médiateurs étudiés (KGF, IL1ra, PGE2) présentent une homologie structurelle entre les espèces, permettant leur utilisation entre des espèces différentes. D'ailleurs, le fait que le MC de CSM permette de restaurer les propriétés de transport de Na des CEA de rats illustre bien ce raisonnement et justifie l'utilisation de ce modèle.

Une autre limite de notre étude concerne l'absence de milieu de culture « témoin » en dehors du DMEM. En effet, le milieu conditionné de CSM aurait pu être comparé au milieu conditionné de fibroblastes pour tester la particularité de ces cellules. Néanmoins, plusieurs travaux ont souligné le bénéfice des CSM en comparaison aux fibroblastes et la question posée ici était plutôt d'évaluer l'influence du microenvironnement hypoxique et inflammatoire sur la sécrétion des CSM dont le rôle bénéfique n'est plus vraiment à démontrer.

INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT HYPOXIQUE ET INFLAMMATOIRE SUR LES CSM

Plusieurs travaux rapportent le rôle bénéfique des CSM dans des modèles d'agression aiguë (Gupta, Su et al. 2007; Mei, McCarter et al. 2007; Aslam, Baveja et al. 2009). Longtemps considérées comme possibles progénitrices des cellules des structures alvéolo-capillaires, les effets paracrines des CSM sont maintenant bien reconnus et laissent à penser que leur secretome pourrait être administré seul afin d'éviter les risques potentiels que représente l'instillation de cellules allogéniques (Lepperdinger, Brunauer et al. 2008; Amariglio, Hirshberg et al. 2009). Sachant que les cellules injectées passent dans la microcirculation pulmonaire et qu'elles peuvent ainsi être soumises à un environnement hypoxique et inflammatoire pouvant induire des modifications des propriétés des CSMh, le phénotype des CSM dans ces conditions est testé *in vitro*. L'exposition des CSMh à l'hypoxie et au cytomix ne semble pas modifier le phénotype des CSMh selon les marquages usuels, à savoir

l'absence d'expression de HLA-DR et l'expression des marqueurs spécifiques CD29, CD95, CD105, CD105a, CD105b, CD105c, CD105e, CD105f. Cette exposition n'a pas non plus d'incidence notable sur la viabilité des cellules avec un taux de nécrose et un taux d'apoptose comparables à la condition témoin en normoxie. Ces résultats, qui témoignent des propriétés de résistance de ces cellules, sont assez cohérents avec le fait que les CSM sont en condition physiologique en hypoxie dans le tissu médullaire (Fehrer, Brunauer et al. 2007).

En revanche, la sécrétion des médiateurs solubles impliqués dans les effets bénéfiques des CSM (Ortiz, Dutreil et al. 2007; Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009; Lee, Fang et al. 2011; Ionescu, Byrne et al. 2012) peut être modulée par l'exposition à un environnement hypoxique et inflammatoire. En effet, les conditions de culture modulent la sécrétion des médiateurs clés que représentent IL-1ra, PGE2 et KGF. L'exposition à l'hypoxie et au cytomix stimule la sécrétion d'IL-1ra et celle de la PGE2. En revanche, la sécrétion de KGF est quant à elle diminuée. La sécrétion d'IL-1ra et de PGE2 est probablement stimulée par l'IL1 β , cytokine inflammatoire majeure présente notamment dans le liquide d'œdème alvéolaire au cours du SDRA (Geiser, Atabai et al. 2001; Frank, Pittet et al. 2008). L'IL1- β agit d'ailleurs en compétition avec IL1-ra pour se fixer au récepteur de l'IL-1, dont le blocage peut à lui seul être bénéfique au cours des agressions épithéliales alvéolaires (Ortiz, Dutreil et al. 2007; Frank, Pittet et al. 2008). De façon intéressante, l'IL-10 n'a pas été détectée dans le milieu de culture des CSMh quelle que soit la condition de culture. Ce résultat est assez cohérent avec la thèse séduisante fournie par Nemeth et coll. qui dans un modèle intégré explique que l'IL-10 est produite par les macrophages alvéolaires activés sous l'effet de la PGE2 issue des CSM (Nemeth, Leelahavanichkul et al. 2009). La baisse en revanche du KGF dans notre modèle est un résultat assez inattendu dans la mesure où d'une part ce facteur de croissance est particulièrement précieux pour la préservation du phénotype épithélial mais aussi compte tenu des résultats rapportés par d'autres équipes (Crisostomo, Wang et al. 2008; Lee, Fang et al. 2009). Cependant la sécrétion de KGF demeure à un seuil qui permet des effets bénéfiques en culture du moins.

Les modifications épithéliales et endothéliales décrites au cours du SDRA et notamment les altérations du transport ionique alvéolaire avec l'augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire font partie intégrante de la pathogénie de cette affection particulièrement sévère et dont le pronostic reste sombre (Rubenfeld, Caldwell et al. 2005; Matthay, Ware et al. 2012). L'amélioration des propriétés de transport du fluide alvéolaire conférée par l'administration de CSM voire du milieu de culture de CSM a été observée dans différents modèles *in vivo* ou *ex vivo* (Gupta, Su et al. 2007; Lee, Fang et al. 2009; Ionescu, Byrne et al. 2012). Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans ce phénomène et notamment aux cibles des CSMh. Le modèle *in vitro* d'agression alvéolaire aiguë choisi ici consiste en une exposition à une hypoxie normobare à 3% d'oxygène avec adjonction de cytomix (TNF- α , IL-1 β et IFN- γ) à 20 ng/mL (Fang, Neyrinck et al. 2010) pendant 6 heures avant l'administration du milieu conditionné de CSM. Les résultats montrent une augmentation de la perméabilité paracellulaire avec une multiplication par trois (Fang, Neyrinck et al. 2010). Afin de déterminer le rôle des protéines de transport apicales ou baso-latérales, le transport de Na est examiné après perméabilisation de la membrane apicale ou basolatérale. L'exposition à l'hypoxie et *cytomix* induit une modification du transport de Na apical lié à la baisse de l'expression d'un canal amiloride-sensible tandis que l'activité de la Na, K-ATPase basolatérale sensible à l'ouabaïne reste inchangée. Il s'agit ici d'une baisse d'expression à la membrane de la sous-unité α -ENaC comme le montrent les résultats des biotinylation, alors que l'expression totale de la protéine α -ENaC est inchangée. La diminution de l'expression de surface d'ENaC au cours de l'hypoxie est déjà été décrite (Planes, Blot-Chabaud et al. 2002; Gille, Randrianarison-Pellan et al. 2014), et semble due à une augmentation de l'internalisation d'ENaC et de sa dégradation dans le protéasome (Gille, Randrianarison-Pellan et al. 2014). Quant à l'effet du cytomix, son administration à plus forte concentration (50 ng/mL) pendant 24h semble induire une baisse d'expression totale de la protéine, selon Lee et coll. (Lee, Fang et al. 2009). Quoi qu'il en soit, le milieu de culture des CSM obtenu en normoxie prévient

l'inhibition du transport trans-épithélial du Na et normalise la perméabilité épithéliale à l'albumine. Ce milieu permet de restaurer l'expression apicale de la protéine α -ENaC, particulièrement importante sur le plan fonctionnel (Canessa, Horisberger et al. 1993; Canessa, Schild et al. 1994).

Puisque l'effet du milieu conditionné est avéré uniquement quand celui-ci est obtenu en normoxie, le principal médiateur qui semble être incriminé est le KGF dont la sécrétion est abaissée en hypoxie et cytomix. L'effet bénéfique du KGF sur le transport de fluide alvéolaire est décrit, notamment sur l'amélioration de l'expression de l' α -ENaC et de l'activité de la Na-K ATPase (Guery, Mason et al. 1997; Borok, Danto et al. 1998; Wang, Folkesson et al. 1999). Le rôle du KGF a également été montré dans un modèle *ex vivo* d'agression pulmonaire aigue par une endotoxine bactérienne ainsi que par une infection à *E. coli* (Lee, Fang et al. 2009; Lee, Krasnodembskaya et al. 2013). Dans notre travail, la déplétion en KGF du milieu conditionné montre une perte de l'effet bénéfique du milieu sur le transport de Na amiloride-sensible, indiquant que le KGF est nécessaire à ce processus. Néanmoins, il n'est apparemment pas suffisant *per se* puisque l'administration de KGF recombinant humain à des concentrations comparables à celles obtenues en normoxie ne permet pas de corriger la baisse du transport de Na induite par le cytomix et l'hypoxie. La participation de facteurs solubles autres que le KGF paraît donc indispensable à l'effet bénéfique du milieu de culture des CSM. Il est aussi possible que l'effet du milieu de culture des CSM soit en partie dû à la libération par les CSM de microvésicules (exosomes) contenant des ARN messagers (par exemple l'ARN messager du KGF) qui peuvent être traduits dans les cellules hôtes, comme cela a été récemment décrit (Zhu, Feng et al. 2014).

Nous n'avons pas étudié dans ce travail le mode d'action du KGF vis-à-vis du trafic intracellulaire d'ENaC. Une possible explication serait l'implication d'un effet anti-oxydant du KGF. En effet, dans certains types cellulaires comme par exemple les hépatocytes, il a été rapporté que le KGF pouvait avoir un rôle anti-oxydant, en modulant l'activité des enzymes anti-oxydantes (Kovacs, Raffa et al. 2009). Or, dans un travail du laboratoire auquel j'ai participé, Olivier Bernard a montré que l'hypoxie induisait une accumulation de ROS (vraisemblablement d'origine mitochondriale) dans les pneumocytes en culture, et que

l'incubation de pneumocytes hypoxiques avec du milieu de culture des CSM prévenait cette accumulation de ROS en augmentant l'activité des enzymes anti-oxydantes (Bernard et al, communication orale J2R octobre 2013 et communication orale ERS, septembre 2015) [Annexe 4]. De plus, Gille et al. ont également montré que la N-acétyl-cystéine, un puissant anti-oxydant, pouvait prévenir complètement la diminution du transport de Na⁺ sensible à l'amiloride induite par une l'hypoxie liée à une diminution de l'expression de surface d'ENaC (Gille, Randrianarison-Pellan et al. 2014). On peut donc émettre l'hypothèse que le KGF (en association avec d'autres molécules sécrétées par les CSM) pourrait limiter l'accumulation de ROS dans les pneumocytes hypoxiques, et préserver ainsi l'activité d'ENaC.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce premier travail montrent que le milieu conditionné des CSM a un effet bénéfique à la fois sur la perméabilité épithéliale et sur le transport transépithélial alvéolaire d'ions Na⁺ dans un modèle *in vitro* d'agression alvéolaire aiguë. Ceci suggère que le milieu conditionné des CSM pourrait peut-être avoir un intérêt thérapeutique dans le SDRA, sans présenter les risques potentiels liés à l'administration des CSM elles-mêmes. Il est cependant vraisemblable que les effets bénéfiques des CSM rapportés chez le rongeur dans le cadre d'ALI/SDRA expérimentaux soit également liés à des effets juxtacrines, en plus des effets paracrines (Islam, Das et al. 2012). En effet, un transfert de mitochondries était observé entre les CSM et les cellules cibles (Islam, Das et al. 2012). Les microvesicules constituent par ailleurs un effet juxtacrine qui est mis en avant par différentes équipes (Bruno, Grange et al. 2009; Zhu, Feng et al. 2014). Le rôle de ces microvésicules dans les phénomènes observés dans ce travail pourrait constituer une approche intéressante pour renforcer l'approche basée sur l'utilisation du matériel issu des CSM afin d'éviter l'instillation des cellules mêmes. Il pourrait être intéressant pour poursuivre notre travail de tester dans un modèle *in vivo* d'agression alvéolaire chez le rongeur l'effet du milieu conditionné des CSM administré en intra-veineux ou en intra-trachéal, et de le comparer avec l'effet de l'administration directe de CSM. Enfin, le préconditionnement des CSM

semble constituer une procédure intéressante comme le soulignent Lan et coll. qui ont montré récemment une meilleure efficacité des CSM après conditionnement hypoxique dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine (Lan, Choo et al. 2015). Il convient ici de préciser que les CSM étant en condition physiologique dans la moelle en hypoxie (Fehrer, Brunauer et al. 2007), ce conditionnement permet en fait à ces cellules de retrouver leurs conditions physiologiques.

II. EFFET DES CSM SUR LES ALTERATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR L'HYPOXIE CHRONIQUE

A. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La fibrose pulmonaire idiopathique, qui constitue la plus fréquente et la plus grave des pneumopathies interstitielles diffuses chroniques, pose un véritable problème thérapeutique, malgré les nombreux essais thérapeutiques réalisés dans ce domaine. Récemment, deux nouvelles molécules ont certes obtenu une autorisation de mise sur le marché dans cette indication, mais les effets cliniques restent modérés avec essentiellement un ralentissement du déclin fonctionnel (Noble, Albera et al. 2011; Richeldi, du Bois et al. 2014). Surtout, aucune thérapeutique ne permet de prévenir ni même de traiter une exacerbation aiguë de la maladie, qui constitue un véritable tournant évolutif de la maladie avec un taux de mortalité entre 40 et 90% selon les séries (Collard, Moore et al. 2007; Song, Hong et al. 2011; Simon-Blancal, Freynet et al. 2012). Les CSMh pourraient représenter dans ce contexte une approche thérapeutique particulièrement intéressante, notamment lors des phases d'exacerbation aiguës de la maladie qui présentent certaines analogies avec le SDRA. Un effet antifibrosant des cellules souches mésenchymateuses a en effet été décrit dans différents modèles animaux de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou les radiations ionisantes. Les mécanismes impliqués dans cet effet anti-fibrosant restent cependant mal compris.

Au cours de la fibrose, l'hypoxie alvéolaire induite par le remodelage pulmonaire et particulièrement marquée lors des phases d'exacerbation aiguë pourrait contribuer à la progression du processus fibrosant, comme cela a été décrit dans d'autres organes tels que la peau, le rein ou le foie (Higgins, Kimura et al. 2007; Haase 2009; Zhou, Dada et al. 2009). L'expression du facteur de transcription HIF dans le poumon témoigne de cette hypoxie au cours des modèles murins de fibrose induite à la bléomycine mais également au cours de la fibrose pulmonaire chez l'homme (Tzouveleakis, Harokopos et al. 2007). Les CEA jouent un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire du poumon profond et leur implication au cours des processus fibrosants est bien reconnue. Bien que sa contribution à la fibrogénèse

pulmonaire soit débattue (Duffield, Lupper et al. 2013), la transition épithélio-mésenchymateuse constitue un phénomène qui implique directement la CEA, qui perd progressivement ses caractéristiques épithéliales et qui gagne un phénotype mésenchymateux, fibroblastique voire myofibroblastique (Lamouille, Xu et al. 2014). Phénomène physiologique au cours du développement, la TEM est décrite au cours de différents processus pathologiques comme la formation de métastases et l'invasion tumorale mais aussi au cours de la fibrose de différents organes comme le rein, le foie ou la peau. Parmi les facteurs favorisant la TEM, on compte notamment le TGF β , principal facteur profibrosant (Willis, Liebler et al. 2005).

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet de l'hypoxie chronique sur le phénotype des CEA en culture. Les objectifs de cette étude ont été 1) de caractériser les modifications phénotypiques induites par l'hypoxie prolongée dans les CEA de rat en culture primaire, 2) d'évaluer l'effet des CSM sur ces modifications phénotypiques dans un modèle de co-culture ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués.

**Mesenchymal stem cells protect from
hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition**

Yurdagül Uzunhan^{1,2}, Olivier Bernard¹, Dominique Marchant¹, Nicolas Dard¹,
Valérie Vanneaux³, Jérôme Larghero³, Thomas Gille^{1,2}, Christine Clerici^{4,5},
Dominique Valeyre^{1,2}, Hilario Nunes^{1,2}, Emilie Boncoeur^{1*} and Carole Planès^{1,2*}

* Emilie Boncoeur and Carole Planès equally contributed to this work.

¹ : Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Hypoxie & Poumon (EA 2363), F-93017 Bobigny, France ;

² : AP-HP, Hôpital Avicenne, F-93009, Bobigny, France ;

³ : AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France ;
Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475 Paris, France ;

⁴ : Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Inserm U1152, F-75018 Paris, France ;

⁵ : AP-HP, Hôpital Bichat, F-75018, Paris, France.

Running head: Mesenchymal stem cells and alveolar EMT

Corresponding author:

Pr Carole Planès

EA 2363, UFR SMBH

74 rue Marcel Cachin

F-93017 Bobigny, France

carole.planes@avc.aphp.fr

Phone: (33) 1 48 95 56 38 – Fax: (33) 1 48 95 56 32

Abstract

Administration of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (hMSC) reduces lung inflammation, fibrosis and mortality in animal models of lung injury, by a mechanism not completely understood. We investigated whether hMSC would prevent epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by hypoxia in primary rat alveolar epithelial cell (AEC). In AEC cultured on semi-permeable filters, prolonged hypoxic exposure (1.5% O₂ for up to 12 days) induced phenotypic changes consistent with EMT, i.e. a change in cell morphology, a decrease in transepithelial resistance (R_{te}) and in the expression of epithelial markers (ZO-1, E-cadherin, AQP-5, TTF-1) together with an increase in mesenchymal markers (vimentin, α -SMA). Expression of transcription factors driving EMT such as SNAIL1, ZEB1 and TWIST1 increased after 2h, 24h and 48h of hypoxia, respectively. Hypoxia also induced TGF β -1 mRNA expression and the secretion of active TGF β -1 in apical medium, and the expression of CTGF, two inducers of EMT. Co-culture of AEC with hMSCs partially prevented the decrease in R_{te} and in ZO-1, E-cadherin and TTF-1 expression, and the increase in vimentin expression induced by hypoxia. It also abolished the increase in TGF β 1 expression and in TGF β 1-induced genes ZEB1, TWIST1 and CTGF. Finally, incubation with rhKGF at a concentration similar to what was measured in hMSC conditioned media restored the expression of TTF-1 and prevented the increase in TWIST1, TGF β 1 and CTGF in hypoxic AEC. Our results indicate that hMSCs prevent hypoxia-induced alveolar EMT through the paracrine modulation of EMT signalling pathways, and suggest that this effect is partly mediated by KGF.

Key words: epithelial-mesenchymal transition, alveolar epithelial cells, hypoxia, Transforming Growth Factor β -1, Keratinocyte Growth Factor.

Introduction

Recent studies have reported the beneficial effects of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem (stromal) cell (MSC) in experimental models of acute lung injury (ALI) and pulmonary fibrosis, suggesting the potential interest of MSCs in future cell therapies in clinical lung diseases (2, 12, 23-25, 30-32, 37). Intravenous or intra-alveolar administration of MSCs attenuates the severity of lung damage, reduces lung inflammation and fibrosis, and increases survival of rodents after bleomycin, endotoxin-induced lung injury, live bacteria or ventilator-induced injury. The efficacy of MSC therapy has been mostly attributed to paracrine anti-inflammatory, anti-infectious or immunomodulatory functions (12, 16, 21, 24, 30-31). Interestingly, recent studies reported that MSCs could also exert paracrine or juxtacrine protective effects on alveolar epithelial cells (AEC) by ameliorating cell energetic, reducing apoptosis or restoring vectorial alveolar sodium transport (10, 17, 23, 31). Based on previous studies, we and others identified potential soluble factors that could be responsible for the observed beneficial paracrine effects of MSCs, such as keratinocyte growth factor (KGF), IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and prostaglandin E2 (PGE2) (10, 23, 30-31).

The protective effect of MSCs (or MSC conditioned media) on stressed AEC is particularly important because AEC (namely alveolar type II cells) play a key-role in distal lung tissue homeostasis and repair, and because AEC are often altered or dysfunctional during lung injury. When submitted to acute injury like in ALI (29) or to discrete but recurrent microinjuries like in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (20), AEC may undergo abnormal activation with production of pro-inflammatory or pro-fibrotic mediators, massive apoptosis or epithelial-mesenchymal transition (EMT), which lead to inefficient or aberrant alveolar repair and contribute to pulmonary fibrosis. EMT is a cellular process during which epithelial cells transdifferentiate into motile mesenchymal cells while losing their epithelial characteristics (22, 44). This phenotypic switch is mediated by key transcription factors such as SNAIL, zinc-finger E-box binding (ZEB) and basic helix-loop-helix transcription factors including TWIST (22). EMT can be induced in AEC by Transforming growth Factor β 1 (TGF β 1) or Endothelin-1 and by oxidative stress (8, 18, 19, 47). Indeed, it has been suggested that exposure to hypoxia, a condition usually encountered in alveoli during ALI or chronic lung injury with lung remodelling (45), could promote phenotypic changes in alveolar epithelial cell lines consistent with EMT (51). Whether

MSC therapy would limit or prevent alveolar EMT in case of acute or chronic lung injury is currently unknown.

The objective of the present study was therefore to examine *in vitro* the effects of human MSCs (hMSC) on EMT induced in rat primary AEC by prolonged hypoxic exposure, and the mechanisms involved. To achieve this goal, we established a co-culture system without cell/cell contact, with AEC grown on semi-permeable inserts (upper compartment and hMSC grown on the bottom of the wells (lower compartment. Results reveal that co-culture with hMSCs markedly attenuated phenotypic changes evoking EMT in rat AEC monolayers exposed to hypoxia (1.5% O₂) for up to twelve days. Indeed, co-culture with hMSCs completely blunted the increase in expression and secretion of the EMT inducer TGFβ1 in hypoxic AEC, as well as the induction of pro-EMT transcription factors ZEB1 and TWIST1 and of Connective Tissue Growth Factor (CTGF). Finally, our data suggest that secretion of KGF by hMSCs could be partly responsible for this protective effect.

Methods

Isolation and culture of rat alveolar epithelial cells. The procedure of rat alveolar epithelial cell (AEC) isolation accorded with legislation currently in force in France, and animal welfare guidelines. Alveolar epithelial cells were isolated from adult male pathogen-free Sprague-Dawley rats by elastase digestion (Worthington, Lakewood, NJ, USA) as previously described (34). Cells (purity >92%, viability >95%) were seeded onto Transwell/Snapwell (polycarbonate membrane with a pore size of 0.4 μm , Corning Inc., Corning, NY, USA) filters, and cultured for up to 13 days in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) containing 25 mM D-glucose, 10 mM Hepes, 23.8 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine, 5% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B, and cis-OH-proline (for the first 2 days) (Sigma-Aldrich) to selectively eliminate fibroblasts from AEC culture (47). Media were changed every 2 or 3 days. Transepithelial resistance (R_{te}) was measured every 3 days using a microvolt-ohmmeter (World Precision Instruments, Astonbury, UK).

Extraction, culture and conditioning of human mesenchymal stem cells. Bone marrow samples were harvested from washed filters used during BM graft processing for allogeneic transplantation after healthy donor informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France). Human mesenchymal stem cells (hMSC) were cultured as previously described (1). Briefly, healthy donors BM cells obtained after Ficoll (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were cultured at an initial density of $5 \cdot 10^4$ cells/ cm^2 in minimum essential medium- α (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 10% defined fetal calf serum (DFBS, HyClone, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (FGFb) (Invitrogen, , France), antibiotic/antimycotic (Invitrogen , France). After 24–48 h, non-adherent cells were removed and the medium was changed. The media were changed every 2 or 3 days until confluence. Adherent cells were then trypsinized, harvested and cultured by seeding $0.5 \cdot 10^3$ cells/ cm^2 . Cells were used at passages 2 to 5. Immunophenotyping of hMSC was performed according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), using monoclonal antibodies conjugated with either fluorescein isothiocyanate or phycoerythrin and directed to CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49a to CD49f, CD 90 and CD105, or matched

isotype controls. Data were acquired and analyzed on a five parameters flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) with Cell Quest software. Detection of viable hMSC was performed by using the vital dye 7-AAD (Beckman Coulter) following the manufacturer's instruction. Cells were acquired by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson) and analyzed by CellQuest software (BD Bioscience). The expression of vimentin and α -smooth muscle actin (α -SMA) in hMSC under various experimental conditions was assessed by Western-blotting (see below) using anti-vimentin (1/3000) (Sigma-Aldrich) and anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (1/5000) (Sigma-Aldrich).

In some experiments, hMSC conditioned media (hMSC-CM) were used and prepared as follows. hMSCs at 80% confluence were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated in supplemented DMEM without FBS for 24h. Cell media were then collected and centrifuged at 13 000 rpm for 20 minutes. Supernatants representing hMSC-CM were immediately frozen and stored at -80°C. hMSC-CM were supplemented with 5% FBS before use. In some experiments, hMSC-CM were depleted in KGF using proteinG/agarose beads coated with anti-KGF monoclonal antibody (R&D systems, Lille, France) or with anti-IgG antibodies (as a control) as previously described (10). KGF concentrations in hMSC-CM were measured using specific Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) before and after KGF depletion to verify the efficacy of the procedure.

Co-cultures of rat alveolar epithelial cells and human mesenchymal stem cells. A co-culture system without cell/cell contact was used to test the paracrine effect of hMSCs on AEC phenotype. On day 1 after AEC isolation, Transwell inserts seeded with AEC (seeding density: $1.3 \cdot 10^6$ cells/cm²) were transferred into plastic dishes seeded with hMSCs (80 000 cells/cm²) at the bottom of the wells. Co-cultures of AEC (upper compartment) and hMSCs (lower compartment) were maintained in DMEM supplemented with 5% FBS and antibiotics/antifungal treatment for 6 or 12 days, with culture medium changed every 3 days. For 12 day-cocultures, hMSCs at the bottom of the wells were replaced at day 6 when confluence was reached by new hMSCs (seeding density: 80 000 cells/cm²).

Exposure of cells to hypoxia. At day 1 after isolation, AEC cultured alone or in co-cultures with hMSCs were placed in a humidified airtight incubator with inflow and outflow valves and exposed to a hypoxic gas mixture containing 1.5% O₂ - 5% CO₂ - 94.5 % N₂ (oxygen tension in culture media: 45

mmHg), and kept at 37°C for increasing periods of time (from 2 hours to 12 days). Control normoxic cells were maintained in a 21% O₂ - 5% CO₂ - 74% N₂ humidified incubator for the same periods of time (oxygen tension in culture media: 140 mmHg).

Immunofluorescence stainings. AEC monolayers cultured on Transwell filters were harvested on days 6 and 12 of Hypoxic/normoxic exposure. Filters were twice rinsed with ice-cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at 4°C, then rinsed with PBS and permeabilized with 0,1% Triton X-100 for 15 minutes. After rinsing with PBS, cells were incubated in PBS with 2% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes to block nonspecific binding sites. Monolayers were exposed to the primary antibodies (Ab) for 1 hour at room temperature (RT). The following antibodies for detection of epithelial markers were used with respective dilutions: mouse polyclonal anti-thyroid-transcriptor factor (TTF-1) (Invitrogen) (1/50), rabbit polyclonal anti-zonula-occludens-1 (ZO-1) (Sigma-Aldrich) (1/200), mouse polyclonal anti-Ecadherin (Sigma-Aldrich) (1/300). Antibodies used for detection of mesenchymal markers were mouse polyclonal anti-vimentin (Sigma-Aldrich) (1/300) and mouse polyclonal anti- α -smooth-muscle actin (α -SMA) (Sigma-Aldrich) (1/300). After extensive washing with PBS, cells were then exposed to the appropriate secondary Ab (1/200) conjugated with Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-568 (Invitrogen, France) protected from light for 30 minutes at RT. Filters were incubated with DAPI (300 nM) to stain nuclei for 30 sec and washed again. Filters were then mounted with mounting solution Immumount (Thermo-scientific) and viewed with a Zeiss microscope equipped with epifluorescence optics. Images were captured on an integrated camera (Qimaging Retiga 2000R with Image-proexpress 6.0) at X40 and imported as TIFF files.

Western blot analyses. AEC in 24-mm Transwell filters were washed twice, scraped off the filters in ice-cold PBS, and centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 30 μ l of ice-cold lysis buffer containing H₂O, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glycerol, 2% SDS and protease inhibitors (0.01%) and kept on ice for 1 hour. Cell lysates were then centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at 4°C. Samples (30 μ g protein per sample in Laemmli buffer containing 5% β -mercapto-ethanol) were then resolved through 7.5% or 10% acrylamide gels, electrically transferred to nitrocellulose paper, and probed with the following antibodies at respective dilutions: anti-Thyroid Transcription Factor 1 (TTF-1) (Dako) (1/200), anti-E-Cadherin (1/3000), anti-aquaporine-5 (AQP-5)

(Sigma-Aldrich) (1/200), anti-vimentin (1/3000), anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (1/5000), anti-SNAIL1 (Cell Signaling) (1/500), anti-HIF1- α (Novus biotechnologies) (1/500) , anti-HIF2- α (Novus biotechnologies) (1/1000), anti-Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (Novus biotechnologies) (1/500) and anti- β -actin (Sigma-Aldrich) (1/2000). The signals were quantified by densitometric analysis using NIH image software, normalized using quantification of the β -actin signal in each lane and expressed in arbitrary units.

Measurement of active TGF- β 1 in cell supernatant. AEC grown on Transwell filters were exposed to normoxia or hypoxia (alone or in co-culture with hMSCs) for 24h, as indicated previously. The apical supernatants were collected, spun at $12,000 \times g$ for 15 minutes at 4 °C, and stored at -80 °C for further processing. The concentrations of active TGF- β 1 were determined using specific Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions.

RNA Extraction and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Total cellular RNA from AEC cells cultured in normoxic or under hypoxic conditions was extracted using an RNeasy kit (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The eluated RNA was quantified using a Biospec-Nano (Shimadzu, Noisiel, France) at 260 nm. Single-strand cDNAs were synthesized from 0.5 μ g of total RNA using maxima first strand cDNA synthesis kit composed by a mixture of oligo (dT) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions (Fisher Scientific, Illkirch, France). Resulting cDNA samples were amplified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) with Absolute qPCR SybrGreen Rox mix (Fisher Scientific, Illkirch, France) on StepOne system qPCR (Applied Biosystem, Life technology, France). Cycle threshold values were normalized to amplification of the beta-actin gene. For each transcript, the expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, as detailed by the manufacturer. Length and sequence of primers used for quantitative real-time PCR are described in table 1.

Statistical Analyses. Results are presented as means \pm SE. Differences between groups were evaluated with unpaired *t* test for comparisons between 2 groups, and otherwise with one-way variance analyses (ANOVA) and, when allowed by the F value, results were compared by the modified

least significant difference (Fisher's PLSD). $p < 0.05$ was considered significant. StatView[®] software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for all analyses.

Results

Effect of prolonged hypoxic exposure on rat alveolar epithelial cell phenotype.

The effects of hypoxia on AEC phenotype were assessed after 6 and 12 days of exposure by changes in R_{te} , cell morphology and expression of a panel of epithelial or mesenchymal markers. Hypoxia induced a progressive and significant decrease in R_{te} ($1635 \pm 395 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vs $328 \pm 41 \Omega \cdot \text{cm}^2$ after 6 days of normoxic or hypoxic conditions, respectively; $p < 0.001$), indicating an alteration of AEC tight junctions under hypoxic condition. As shown in Figure 1, exposure to hypoxia for 6 days induced a change in the morphology of AEC, which lost their characteristic cobblestone appearance to become more irregular. Hypoxia also induced changes in the expression of epithelial markers. By immunostaining, the expression of the junctional protein ZO-1 was notably attenuated in hypoxic AEC (Fig. 1A). The expression level of E-cadherin as assessed by immunostaining and by Western blot did not decrease under hypoxic condition, but immunostaining studies revealed subtle changes in the localization of the protein (Fig. 1A, B and C): while E-cadherin was localized at the plasma membrane in normoxic AEC, it was also detected in the cytoplasm of hypoxic AEC. Hypoxic exposure induced a 53% decrease in AQP-5 protein expression levels by Western blot (Fig. 1B and C). Immunostaining experiments revealed that the nuclear expression of TTF-1 was strikingly reduced in hypoxic AEC (Fig. 1A), and Western blot experiments confirmed that TTF-1 protein expression was decreased by 70% (Fig. 1B and C). The mesenchymal markers vimentin and α -SMA were detected neither in normoxic nor in hypoxic AEC at day 6 (Fig. 1A). As shown in Figure 2, exposure to hypoxia for 12 days amplified the changes in AEC phenotype. Expression of the epithelial markers ZO-1, E-cadherin and TTF-1 was hardly detected by immunostaining after 12 days of hypoxia (Fig. 2A), and Western blot analysis confirmed that E-cadherin and TTF-1 protein expression were strikingly reduced in hypoxic AEC (Fig. 2B and C). By contrast, the expression of the mesenchymal marker α -SMA was detected in hypoxic AEC (Fig. 2A and B). Indeed, the protein expression level of vimentin was

significantly increased in hypoxic AEC as compared to normoxic cells (Fig. 2A, B and C). All together, these data indicate that prolonged hypoxic exposure induced a profound change in AEC phenotype, with a progressive loss of epithelial markers and expression of mesenchymal markers consistent with EMT.

Effect of hMSC co-culture or of hMSC conditioned media on phenotypic changes of AEC induced by prolonged hypoxia. Before studying the effect of hMSCs on AEC phenotype, we first tested whether prolonged exposure to hypoxia or co-culture with AEC could modify hMSC phenotype and viability. Prolonged hypoxic exposure didn't alter hMSC viability either when cultured alone (95.2 vs 96.5 % viable cells in normoxia and hypoxia, respectively) or when co-cultured with AEC (95.6 vs 92.8 % viable cells in normoxia and hypoxia, respectively). Following 6 days of hypoxic exposure, no significant change was detected in hMSC morphology, in the expression of hMSC cell surface markers (i.e. CD29, CD44, CD49a to CD49f, CD73, CD90 and CD105) or in the protein expression of α -SMA and vimentin (see supplemental data), indicating that hMSCs did not transform themselves into activated fibroblasts (myfibroblasts) when submitted to chronic hypoxia.

Co-culture experiments revealed that R_{te} was significantly higher in AEC monolayers co-cultured with hMSCs than in AEC monolayers without hMSC after a 6 day-hypoxic exposure (Fig. 3A). Immunostaining studies showed that co-culture of AEC with hMSC allowed AEC to maintain their epithelial phenotype under hypoxic condition (6 day-exposure) (Fig. 3B): ZO-1 and TTF-1 expression were restored in hypoxic AEC monolayers co-cultured with hMSCs. Similar observations were made when AEC were incubated with hMSC-conditioned media (hMSC-CM) for 6 days under hypoxic exposure (Fig. 3B). Western-blot experiments confirmed that TTF-1 protein expression was restored in hypoxic AEC co-cultured with hMSCs (Fig. 3C and D). The effect of hMSC co-culture on AEC phenotype was also evidenced after a 12 day-hypoxic exposure (Fig. 4). Transepithelial electric resistance was significantly decreased under hypoxic condition in AEC monolayers cultured alone but not when co-cultured with hMSCs (Fig. 4A). By immunostaining, the expression of ZO-1 and TTF-1 was completely abolished in hypoxic AEC cultured alone, but was clearly visible in AEC co-cultured with hMSCs (Fig. 4B). Also, hypoxia-induced decrease in the protein expression of E-cadherin and TTF-1 as assessed by Western-blotting was completely prevented by co-culture of AEC with hMSCs

(Fig. 4C and D). Finally, co-culture with hMSCs tended to decrease vimentin protein expression in hypoxic AEC (2.09 ± 0.46 vs 0.97 ± 0.31 arbitrary units in $1.5\%O_2$ and $1.5\%O_2 +$ hMSCs, respectively; $n=3-5$; $p=0.10$).

Effect of hMSC on Hypoxia-Inducible Factor expression in alveolar epithelial cells. To decipher the cellular mechanism(s) involved in the beneficial effect of hMSCs on AEC exposed to prolonged hypoxia, we first evaluated whether co-culture with hMSCs did modify the expression of HIF1- α and HIF2- α in hypoxic AEC (39). Stabilization of HIF1- α proteins was previously shown to be necessary in AEC for developing hypoxia-induced EMT (51). As shown by Western-blotting (Fig. 5A and 5B), HIF1- α protein was hardly detected in normoxic AEC but was significantly induced in AEC exposed to hypoxia for 2 and 3 hours. HIF2- α protein expression began to increase at 3 hours of hypoxia, but this increase was not significant. Both HIF1- α and HIF2- α protein expression levels were significantly increased in hypoxic AEC after a 24h-exposure, but went back to normoxic values after 48h of hypoxia (Fig. 5C to 5F). Neither HIF1- α protein expression nor HIF2- α protein expression were modified when hypoxic AEC were co-cultured with h-MSCs (Fig. 5B, 5D, 5F).

Effect of hMSC on transcription factors driving EMT in hypoxic alveolar epithelial cells. The temporal expression pattern of transcription factors known to induce EMT such as SNAIL, ZEB1 and TWIST1 (22) was established in AEC exposed to hypoxia for increasing times (from 2 to 48 hours). Expression levels of SNAIL-1 mRNA transcripts were not modified by hypoxic exposure (Fig. 6A) but as shown in Figure 6B, expression of SNAIL1 protein was significantly induced by short hypoxic exposures (2 and 3 hours) and rapidly decreased to reach normoxic values afterwards. Expression levels of SNAIL2 (SLUG) mRNA transcripts decreased by approximately 50% during the first hours of hypoxic exposure but went back to normal after 16 hours of exposure (not shown). Expression levels of ZEB1 and TWIST1 were significantly increased after 24 and 48 hours of hypoxic exposure, respectively (Fig. 6B and 6C). We then examined whether co-culture of AEC with hMSCs could modulate the expression of expression of SNAIL1, ZEB1 and TWIST1. Co-culture with hMSCs had no effect on hypoxia-induced expression of SNAIL1 protein (Fig. 6A). By contrast, co-culture completely prevented the increase in ZEB1 and TWIST1 mRNA levels in hypoxic AEC (Fig. 6B and 6C).

Effect of hMSC on profibrotic factor expression in alveolar epithelial cells. We next studied whether co-culture with hMSCs could affect the production of 2 profibrotic proteins in hypoxic AEC known to favour EMT: Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) and Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (43, 47). As shown in Figure 7A, TGF β 1 mRNA levels increased two-fold after 24 hours of hypoxia, and decreased thereafter (not shown). Also, the concentration of TGF β 1 in the apical medium of hypoxic AEC was strikingly increased as compared with normoxic condition (Fig. 7B). Co-culture with hMSCs completely blunted the increase in TGF β 1 mRNA expression as well as TGF β 1 protein apical secretion induced by hypoxia (Fig. 7A and 7B). Co-culture with hMSCs suppressed as well the two-fold increase in CTGF mRNA expression induced in AEC by a 48 hour-hypoxic exposure (Fig. 7C), and blunted the increase in CTGF protein expression (7D).

Involvement of Keratinocyte Growth Factor secretion in the paracrine effects of hMSC.

Keratinocyte Growth Factor (KGF), a well-known growth factor for AEC that is secreted by hMSCs (23, 33), has been previously shown to be involved in the beneficial effect of hMSC conditioned media on transepithelial sodium transport across AEC monolayers exposed to hypoxia and inflammatory cytokines (10). Therefore, we investigated the potential role of KGF in our model. Treatment of hypoxic AEC with human recombinant KGF (rhKGF) at a concentration similar to what was found in hMSC-CM (i.e. 250 pg/ml) throughout a 6-day-hypoxic exposure completely prevented the hypoxia-induced decrease in TTF-1 protein expression (Fig. 8A and 8B). Also, treatment with rhKGF for 24h or 48h fully prevented the increase in TGF β 1, TWIST1 and CTGF mRNA transcript levels (Fig. 8C, 8D and 8E) induced by hypoxia, whereas it did not affect the increase in ZEB1 mRNA expression (data not shown). Finally, Figure 8F shows that hMSC-CM completely depleted in KGF using anti-KGF antibody failed to prevent the hypoxia-induced increase in TWIST mRNA transcripts at 48h of hypoxia, whereas complete hMSC-CM or hMSC-CM treated with non specific anti-IgG did.

Discussion

The main findings of the present study can be summarized as follows. Prolonged exposure to hypoxia induced phenotypic changes in primary rat AEC consistent with EMT, i.e. a change in cell morphology, a progressive decrease in R_{te} and in the expression of epithelial markers (ZO-1, E-cadherin, AQP-5 and TTF-1) together with an increase in mesenchymal markers (vimentin and α -SMA). Hypoxia induced the expression of hypoxia-inducible factors HIF1- α and HIF2- α , as well as the expression of transcription factors driving EMT such as SNAIL1, ZEB1 and TWIST1 with a specific time-course. Hypoxic exposure also increased TGF β -1 mRNA expression and the secretion of active TGF β -1 in apical medium, and the expression of CTGF, two mediators known to induce EMT. Co-culture of AEC with bone marrow-derived hMSCs (or incubation with hMSC-CM) partially prevented the decrease in R_{te} and fully prevented the decrease of ZO-1, E-cadherin and TTF-1 expression, and the increase in vimentin expression induced by hypoxia. Co-culture completely blunted the increase in TGF β 1 expression and in ZEB1, TWIST1 and CTGF mRNA levels, whereas it did not affect HIF1- α , HIF2- α and SNAIL1 protein expression in hypoxic AEC. Finally, incubation with rhKGF at a concentration similar to what was measured in hMSC-CM fully restored the expression of the epithelial transcription factor TTF-1 in hypoxic AEC, and prevented the increase in TWIST1, TGF β 1 and CTGF expression. Taken together, our data indicate that hMSCs protect primary AEC from hypoxia-induced EMT through the paracrine modulation of EMT signalling pathways, and suggest that this effect is partly mediated by KGF secretion.

One limitation of the present study is the fact that the *in vitro* model used combined cells originating from two different species, i.e. primary rat AEC and hMSCs. Bone marrow-derived MSC were studied for obvious reasons inasmuch as these cells will likely be used in the next future for cell therapy in patients with pulmonary diseases. Unfortunately, the use of human alveolar epithelial cell lines such as A549 shows several pitfalls for the study EMT in the context of lung fibrosis. A549 cells are cancerous cells that are not able to make tight junctions as shown by very low transepithelial resistance and which express mesenchymal proteins such as vimentin and α -SMA at baseline (51). Also, their doubling time is short, which constitutes a methodological limitation to study EMT, a long-lasting and

progressive process. Primary rat AEC are usually considered as good surrogates for human AEC which are very difficult to isolate. Noteworthy, previous studies have shown that hMSCs were effective *in vivo* in several rodent models of injury (4, 26-27). One reason for that may be that most paracrine factors secreted by MSC (such as KGF, IL1-ra or PGE2) show considerable homology across species. Indeed, it is well recognized that recombinant human proteins (rhKGF and rhIL1-ra) have a biological effect on rodent AEC (9, 33). The fact that we observed a clear beneficial effect of hMSCs on rat AEC indicates that our model, despite the species difference, still represents a valuable tool for studying *in vitro* the crosstalk between AEC and MSCs.

Prolonged exposure to hypoxia (1.5% O₂, corresponding to an O₂ tension of approximately 45 mmHg in culture media) was used in this study to induce EMT in primary AEC because local alveolar hypoxia is a condition that is usually associated with acute or chronic lung injury. Alveolar hypoxia is obviously present during ALI and acute respiratory distress syndrome, due to pulmonary oedema (29). It is also observed in the course of pulmonary fibrosis, probably as a consequence of distal lung remodelling, as demonstrated by the fact that alveolar type II from patients with IPF or from mouse lungs treated with bleomycin specifically express HIF1- α and HIF1- α related genes (45). Indeed, alveolar hypoxia may be particularly important during episodes of acute exacerbation in the course of IPF (20). Hypoxia promotes EMT in a large number of cancerous cells, a phenomenon involved in the development of tumors (50). Local hypoxia has also been shown to induce EMT in non-cancerous epithelial cells from various organs, including the kidney, skin and nasal polyps (14-15, 41). In renal tubular epithelial cells, hypoxia-induced EMT was partly dependent on the expression of HIF1- α and CTGF (13-15). In a recent work using mostly alveolar epithelial cell lines, Zhou et al reported that prolonged hypoxia could also induce EMT in lung epithelial cells, and that EMT was related to the expression of HIF1- α and to the accumulation of O₂ reactive species (ROS) produced by hypoxic mitochondria, both leading to an increase in TGF β 1 expression and secretion (5, 39, 51). TGF β 1 is considered as one of the major inducers of EMT in lung fibrosis (8, 18, 19, 47). TGF β 1 has complex biological effects, through both canonical and non canonical cellular pathways, that can induce SMAD, AKT, ERK and MAPK signalling pathways leading to EMT (22). Here, in rat primary AEC, we observed progressive phenotypic changes (i.e. progressive loss of epithelial characteristics and gain of mesenchymal

markers) together with an increase in HIF1- α and in TGF β -1 expression and secretion in apical medium, consistent with previous findings of Zhou et al (51). The concentration of active TGF β 1 in apical supernatant of AEC was relatively low, around 50pg/ml. However, Zhou et al demonstrated that such concentrations of active TGF β 1 secreted by AEC under hypoxic condition were able to induce EMT via an autocrine way inasmuch as blockade of TGF β 1 type I receptor kinase prevented the hypoxia-induced EMT in these cells (51). In our experiments, the expression of HIF1- α and of HIF2- α proteins was transient (disappearing after 48 hours), an observation previously reported for of HIF1- α in A549 cells (46). Hypoxia also induced the expression of transcription factors classically involved in EMT such as SNAIL1 first, ZEB1 and TWIST1 with a specific time-course (22). Although *snail* is a target gene for HIF (28), the rapid increase in SNAIL1 protein observed after only 2h without any change in SNAIL1 mRNA levels suggest a post-translational regulation of SNAIL1 protein under hypoxic condition. The fact that ZEB1 mRNA upregulation observed at 24h of hypoxia followed activation of SNAIL1 is consistent with SNAIL1 directly targeting the *ZEB1* gene. In addition, ZEB1 expression can be induced by TGF β 1 (22). The increase in TWIST1 mRNA transcripts at 48h of hypoxia could either be due to a direct transcriptional effect of HIF1- α or to an indirect up-regulation by TGF β 1 (6, 49). Finally, we observed the up-regulation of CTGF in hypoxic AEC at 48h at both mRNA and protein levels. CTGF expression can be induced by both HIF1- α and TGF β 1, and CTGF protein was previously shown to favour EMT in several cell types including alveolar type II cells (3, 14, 40, 43). Taken together, our data confirm that prolonged exposure to hypoxia leads to alveolar EMT.

The most important finding of our study is that hMSCs could prevent hypoxia-induced EMT in AEC, at least *in vitro*. This was demonstrated by the fact that co-culture with hMSCs attenuated the hypoxia-induced decrease in transepithelial resistance, preserved the morphological appearance of AEC under hypoxia, and completely prevented the decrease in epithelial markers such as ZO-1, E-cadherin and TTF-1 as well as the increase the mesenchymal marker vimentin. These effects were reproduced by hMSC-CM, confirming the paracrine protective effect of hMSCs. Noteworthy, prolonged exposure to hypoxia did not alter the phenotype of hMSCs, which is consistent with the fact that hMSCs are physiologically exposed in the bone marrow to low O₂ concentrations, ranging from 1% to 7% O₂ (7).

The fact that when submitted to hypoxia hMSCs did not transform themselves into fibroblasts or myofibroblasts (at least *in vitro*) is of course a prerequisite for the future therapeutic use of these cells in the context of ALI or lung fibrosis.

On a mechanistic point of view, co-culture with hMSC completely blunted the up-regulation of some transcription factors driving EMT such as ZEB1 and TWIST1, but did not affect that of SNAIL1 protein. Importantly, hMSC suppressed the induction of TGF β 1 mRNAs as well as the apical secretion of active TGF β 1 induced by hypoxia. It blunted also the up-regulation of CTGF. The decrease in TGF β 1 secretion induced by hMSC co-culture is certainly a crucial point since autocrine activation of hypoxic AEC by TGF β 1 can lead to the expression of EMT-driving transcription factors ZEB1 and TWIST1 as well as the expression of the EMT inducer CTGF (3, 6, 22). The effect of hMSCs on TGF β 1 (and on downstream targets TWIST1 and CTGF) was likely not due to a modulation of HIF pathway inasmuch as neither HIF1- α nor HIF2- α protein expression were affected by co-culture condition. However, we cannot completely exclude that co-culture with hMSCs could have an effect on the function of gene transactivation by HIF- α . One hypothesis is that the decrease in TGF β 1 expression could be due to a decrease in ROS accumulation in hypoxic AEC induced by hMSC co-culture (51).

Several *ex vivo* and *in vitro* studies have evidenced the involvement of KGF in the beneficial effects of hMSC on injured AEC, namely on transepithelial alveolar sodium (Na) transport. For example, Lee et al. reported that in an *ex vivo* perfused human lung, the instillation of hMSCs following endotoxin-induced lung injury restored alveolar fluid clearance and increased vectorial Na transport, in part, due to KGF release (23). This observation was recently confirmed in a live bacterial model of lung injury in *ex vivo* perfused human lungs (25). *In vitro*, we also showed that hMSC-CM prevented the decrease in transepithelial Na transport induced by hypoxia and pro-inflammatory cytokines in AEC monolayers, and that the protective effect was lost when hMSC-CM was completely depleted of KGF (10). The protective effect of KGF on AEC has been widely demonstrated *in vitro* and in several models of lung injury in rodents and more recently in the human lung (11, 36, 38, 42). Indeed, KGF contributes to maintain rat alveolar epithelial type II cell phenotype in culture through the up-regulation of the MAPK pathway (35). Consistent with these observations, the current study shows that incubation of hypoxic

AEC with low concentrations of rhKGF as encountered in hMSC-CM partly reproduced the effects of co-culture with hMSC. Indeed, rhKGF fully prevented the decrease in TTF-1 expression after 6 days of hypoxia, and blunted the hypoxia-induced increase in TGF β 1, TWIST1 and CTGF expression. Furthermore, incubation of AEC with hMSC-CM depleted in KGF failed to prevent the hypoxia-induced increase in TWIST mRNA transcript, whereas complete hMSC-CM containing KGF did. However, it is clear that other paracrine factors distinct from KGF also contribute to the beneficial effect of hMSC inasmuch as, unlike co-culture with hMSC, incubation with rhKGF was unable to suppress the increase in ZEB1 mRNA transcripts observed in hypoxic AEC.

In conclusion, the present study shows that hMSCs prevent alveolar EMT induced by hypoxia *in vitro* by down-regulating the expression of TGF β 1 and CTGF and the activation of transcription factors driving EMT, and that this beneficial effect could be due at least in part to the release of KGF. Our study therefore identifies a novel mechanism of action of hMSCs on AEC that could contribute to the beneficial effects of hMSC administration evidenced in animal models of acute or chronic lung injuries. This protective role of hMSCs may be of particular importance in the perspective of cell therapies using hMSC in patients because alveolar hypoxia is frequently encountered during ALI or during acute exacerbation of IPF, and because EMT is thought to compromise alveolar epithelial repair and promote lung fibrosis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms Patricia Quidu and Dr Erwan Guyot for helpful technical assistance, and Pr Nathalie Charnaux for fruitful discussions.

Grants

This work was supported by Legs Poix from Chancellerie des Universités de Paris, by University Paris 13, and by Sorbonne Paris Cité. Yurdagül Uzunhan was the recipient of a Collège des Enseignants de Pneumologie fellowship, and of a Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire fellowship.

Disclosure

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

1. **Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Femand JP, Marolleau JP, and Larghero J.** Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21: 158-163, 2007.
2. **Aslam M, Baveja R, Liang OD, Fernandez-Gonzalez A, Lee C, Mitsialis SA, and Kourembanas S.** Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1122-1130, 2009.
3. **Black SA Jr, Trackman PC.** Transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) stimulates connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) expression in human gingival fibroblasts through a RhoA-independent, Rac1/Cdc42-dependent mechanism: statins with forskolin block TGFbeta1-induced CCN2/CTGF expression. *J Biol Chem* 283(16):10835-47, 2008.
4. **Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G.** Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 20: 1053-1067, 2009.
5. **Chandel NS.** Mitochondrial complex III: An essential component of universal oxygen sensing machinery? *Respir Physiol & Neurobiol* 174(3):175-81, 2010.
6. **Cho KH, Jeong KJ, Shin SC, Kang J, Park GG, Lee HY.** STAT3 mediates TGF- β 1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion. *Cancer Lett* 336: 167-73, 2013.
7. **Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Gully C, Gassner R, and Lepperdinger G.** Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6: 745-757, 2007.
8. **Felton VM, Borok Z, Willis BC.** N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(5): L805-12, 2009.
9. **Frank JA, Pittet JF, Wray C, and Matthay MA.** Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax* 63: 147-153, 2008.
10. **Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthay MA, Clerici C.** Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306(11): L975-85, 2014.
11. **Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, and Nelson S.** Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155: 1777-1784, 1997.
12. **Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, and Matthay MA.** Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 179: 1855-1863, 2007.
13. **Haase VH.** Pathophysiological consequences of HIF activation. HIF as a modulator of fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1177:57-65, 2009.
14. **Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH.** Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F1223-F1232, 2004.
15. **Higgins DF, Kimura K, Bernardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt K-U, Iwano M, Haase VH.** Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117:3810-3820, 2007.
16. **Ionescu L, Byrne RN, van Haften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, Weissmann G, Hall A, Eaton F, and Thebaud B.** Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L967-977, 2012.

17. **Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J.** Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* 18(5):759-65, 2012.
18. **Jain R, Shaul PW, Borok Z and Willis BC.** Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF- β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:38-47, 2007.
19. **Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D and Chapman HA.** Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Nat Acad Sci USA* 103:13180-13185, 2006.
20. **King TE, Pardo A, Selman M.** Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949-1961, 2011.
21. **Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, Zhuo H, Su X, Lee JW, Gupta N, Petrini M, Matthay MA.** Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302(10): L1003-13, 2012.
22. **Lamouille S, Xu J, Derynck R.** Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178-196, 2014.
23. **Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, and Matthay MA.** Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16357-16362, 2009.
24. **Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, and Matthay MA.** Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* 29: 913-919, 2011.
25. **Lee JW, Krasnodembskaya A, McKenna DH, Song Y, Abbott J, and Matthay MA.** Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cells In Ex Vivo Human Lungs Injured with Live Bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 187(7):751-60, 2013.
26. **Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, and Prockop DJ.** Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5:54-63, 2009.
27. **Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, and Prockop DJ.** Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17438-17443, 2006.
28. **Luo D, Wang J, Li J, Post M.** Mouse Snail is a target gene for HIF. *Mol Cancer Res* 9:234-45, 2011.
29. **Matthay MA, Ware LB, and Zimmerman GA.** The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 122: 2731-2740, 2012.
30. **Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, and Mezey E.** Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15: 42-49, 2009.
31. **Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, and Phinney DG.** Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11002-11007, 2007.
32. **Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, and Phinney DG.** Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8407-8411, 2003.

33. **Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, and Mason RJ.** Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 92:969-977, 1993.
34. **Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, and Clerici C.** Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 47318-47324, 2002.
35. **Qiao R, Yan W, Clavijo C, Mehrian-Shai R, Zhong Q, Kim KJ, Ann D, Crandall ED, Borok Z.** Effects of KGF on alveolar epithelial cell transdifferentiation are mediated by JNK signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(2):239-46, 2008.
36. **Ray P.** Protection of Epithelial Cells by Keratinocyte Growth Factor Signaling. *Proc Am Thorac Soc* 2:221–225, 2005.
37. **Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, and Brigham KL.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 145-152, 2005.
38. **Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y, Sato H, Kanegae Y, Hirai T, Saito I, Goto T, Kurahashi K.** Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(3):489-97, 2011.
39. **Semenza GL.** Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *N Engl J Med* 365:537-47, 2011.
40. **Shafieian M, Chen S, Wu S.** Integrin-linked kinase mediates CTGF-induced epithelial to mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells. *Pediatr Res* 77(4):520-7, 2015.
41. **Shin HW, Cho K, Kim DW, Han DH, Khalmuratova R, Kim SW, Jeon SY, Min YG, Lee CH, Rhee CS, Park JW.** Hypoxia-inducible factor 1 mediates nasal polypogenesis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Respir Crit Care Med* 185(9): 944-54, 2012.
42. **Shyamsundar M, McAuley DF, Ingram RJ, Gibson DS, O'Kane D, McKeown ST, Edwards A, Taggart C, Elborn JS, Calfee CS, Matthay MA, O'Kane CM.** Keratinocyte growth factor promotes epithelial survival and resolution in a human model of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 189(12): 1520-9, 2014.
43. **Sonnlyal S, Xu S, Jones H, Tam A, Sreeram VR, Ponticos M, Norman J, Agrawal P, Abraham D, de Crombrughe B.** Connective tissue growth factor causes EMT-like cell fate changes in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 126:2164-75, 2013.
44. **Thiery JP and Sleeman JP.** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142, 2006.
45. **Tzouveleakis A, Harokopos V, Papatountas T, Oikonomou N, Chatziioannou A, Vilaras G, Tsiambias E, Karameris A, Bouros D, Aidinis V.** Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1108-1119, 2007.
46. **Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C.** Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha and HIF-2 alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 alpha. *J Biol Chem* 279: 14871-8, 2004.
47. **Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z.** Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by Transforming Growth Factor- β_1 . Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166:1321-1332, 2005.
48. **Wang Y, Folkesson HG, Jayr C, Ware LB, and Matthay MA.** Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy. *J Appl Physiol* 87: 1852-1860, 1999.
49. **Yang M-H, Wu K-J.** TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). Implications in metastasis and development. *Cell Cycle* 7: 2090-96, 2008.

50. **Zeisberg M, Neilson EG.** Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119: 1429-37, 2009.

51. **Zhou G, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, Varga J, Sznajder JI.** Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L1120-L1130, 2010.

Figures

Fig 1

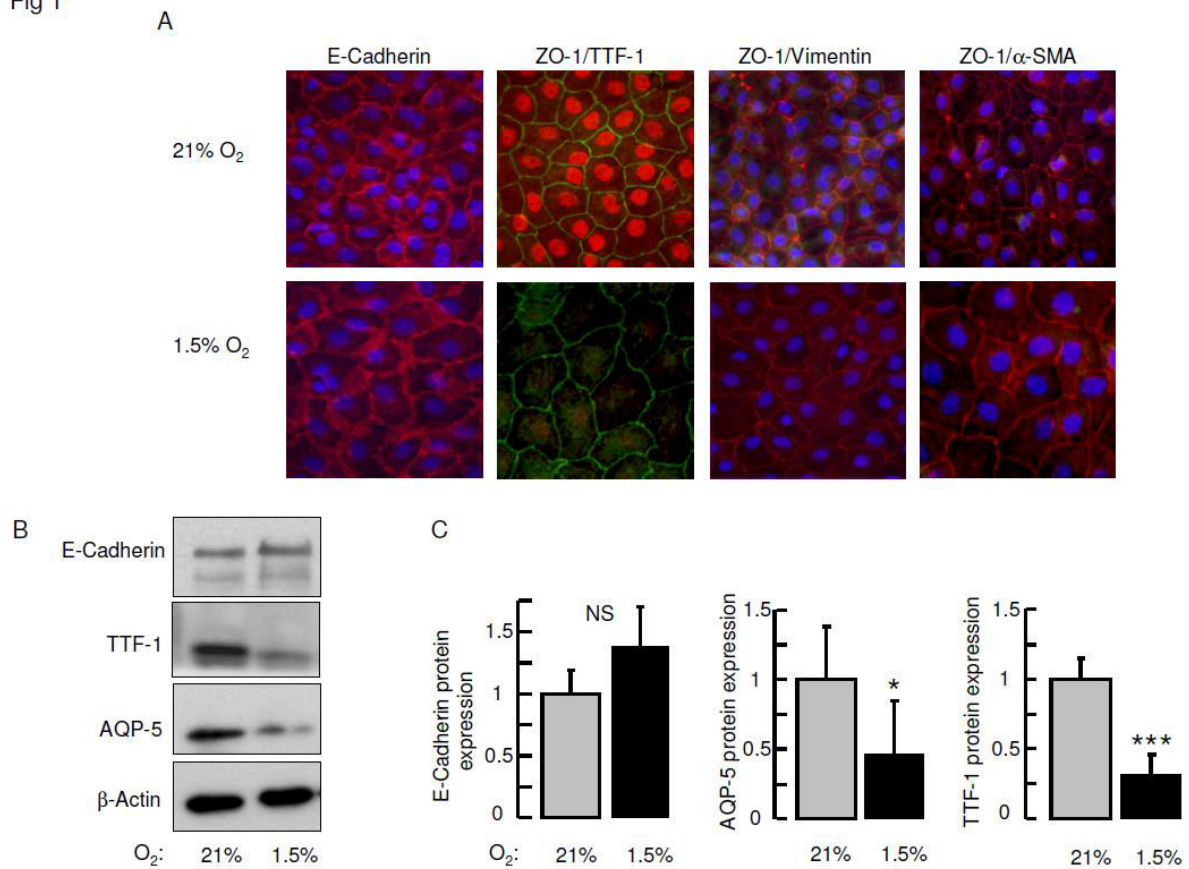


Figure 1: Effects of hypoxia on alveolar epithelial cell phenotype at day 6. At day 1 after isolation, rat AEC monolayers were exposed to a normoxic (21% O₂) or a hypoxic (1.5% O₂) atmosphere for 6 days. **A:** Representative immunostainings of E-Cadherin (red) (first column), ZO-1 (green) and TTF-1 (red) (second column), ZO-1 (red) and vimentin (green) (third column), ZO-1 (red) and α -SMA (green) (fourth column) after 6 days of normoxic or hypoxic exposure (original magnification X 400). Nuclei were stained with DAPI (blue) except for ZO-1/TTF-1 stainings. **B:** Representative immunoblots showing the expression of E-cadherin, TTF-1 and AQP-5 in normoxic/hypoxic AEC. The intracellular protein β -actin was used as a loading control. **C.** Quantification of signals was obtained using NIH image software, and data were normalized for the corresponding β -actin signal (gray bars: 21% O₂; black bars: 1.5% O₂). Results represent means \pm SE (n=10 separate experiments for E-Cadherin, n=3 for AQP-5, n=7 for TTF-1). Statistical significance was calculated from the raw data by paired *t* test. *, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively), NS: not significant.

Fig 2

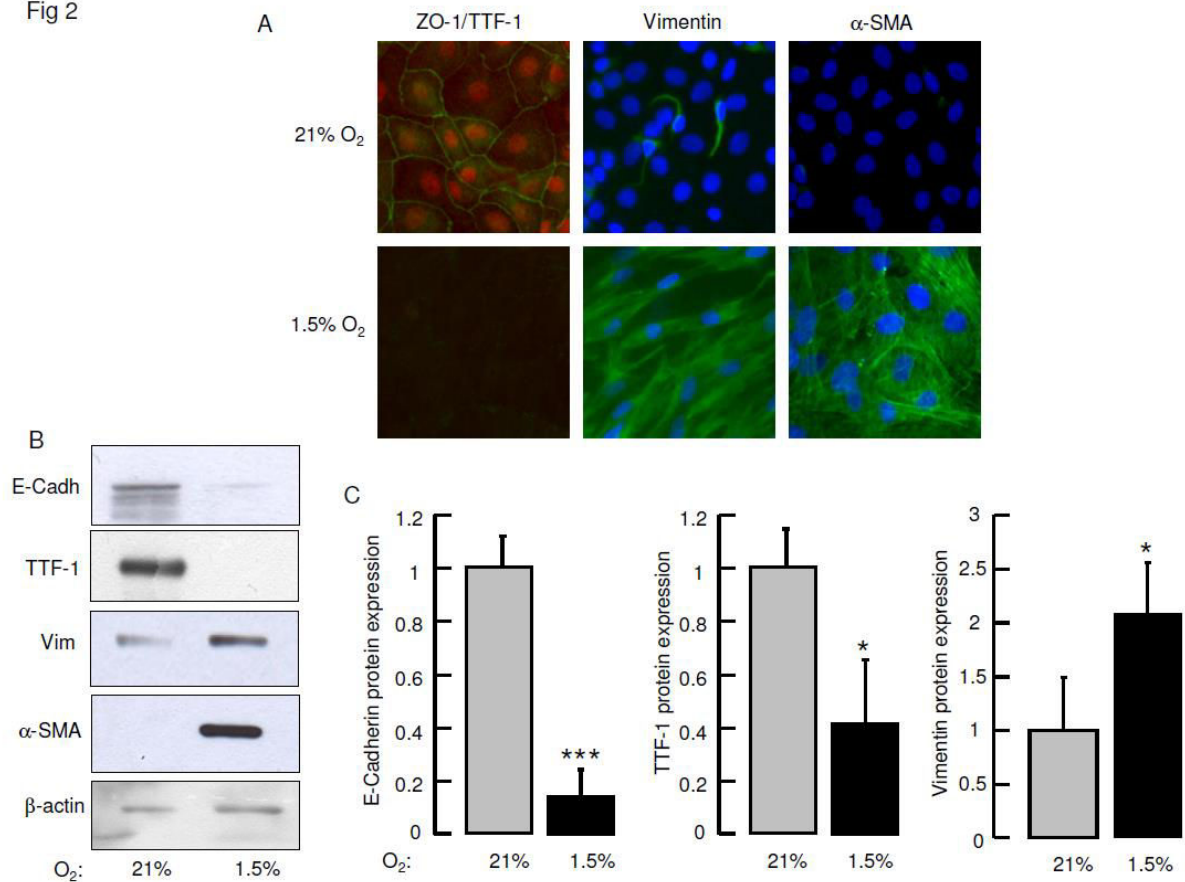


Figure 2: Effects of hypoxia on alveolar epithelial cell phenotype at day 12. At day 1 after isolation, rat AEC monolayers were exposed to a normoxic (21% O₂) or a hypoxic (1.5% O₂) atmosphere for 12 days. A: Representative immunostainings of ZO-1 (green) and TTF-1 (red), vimentin (green) and α-SMA (green) after 12 days of normoxic or hypoxic exposure (original magnification X 400). Nuclei were stained with DAPI (blue) except for ZO-1/TTF-1 stainings. B: Representative immunoblots showing the expression of E-cadherin (E-Cadh), TTF-1, vimentin (Vim) and α-SMA in normoxic/hypoxic AEC. The intracellular protein β-actin was used as a loading control. C: Densitometric signals for E-cadherin, TTF-1 and vimentin were quantified using NIH image software, and data were normalized for the corresponding β-actin signal (gray bars: 21% O₂; black bars: 1.5% O₂). Results represent means ± SE (n=4-5 separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by paired *t* test. *, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

Fig 3

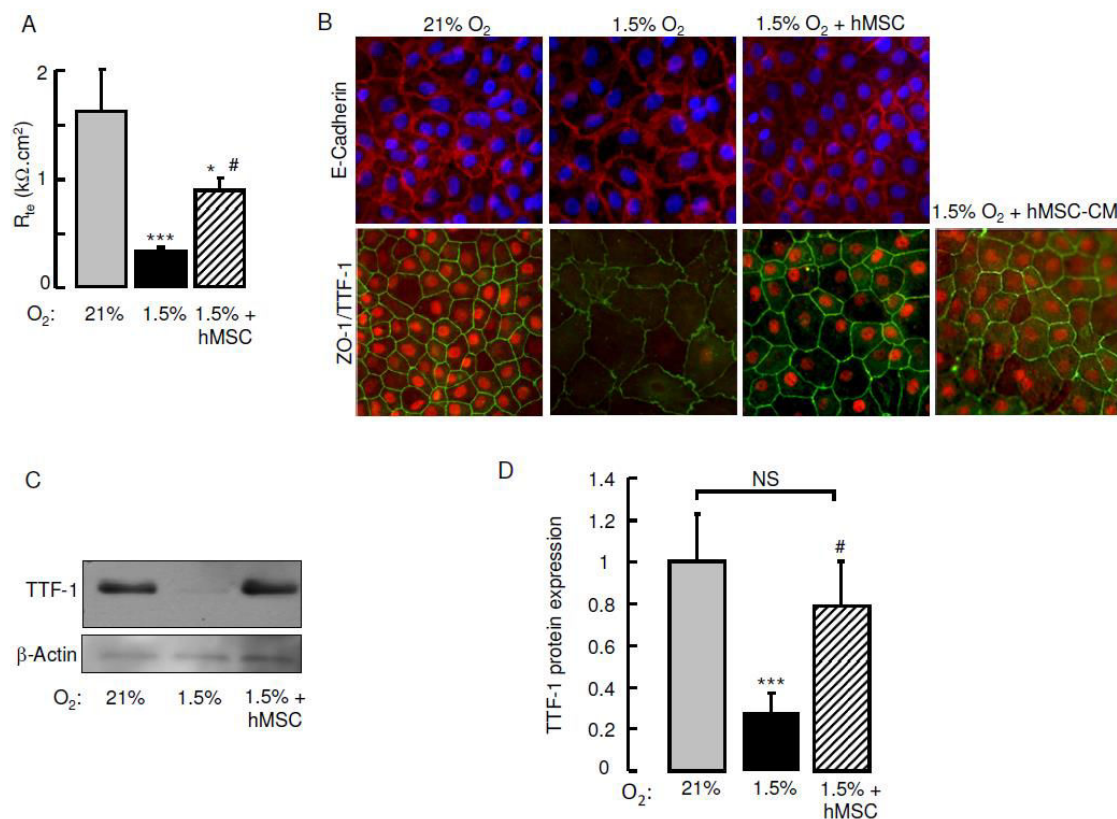


Figure 3: Effect of co-culture with hMSC on alveolar epithelial cell phenotype at day 6. At day 1 after isolation, rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells for 6 days. In some experiments, AEC were incubated with hMSC conditioned media (hMSC-CM) throughout hypoxic exposure. A: After 6 days of exposure, transepithelial electric resistance (R_{te}) was measured with a microvoltmeter across normoxic AEC monolayers (gray bars) and hypoxic AEC monolayers cultured alone (black bars) or co-cultured with hMSCs (hatched bars). Results represent means ± SE (n=13 filters per condition from 6 independent experiments). B: Representative immunostainings of E-cadherin (nuclei stained with DAPI), and ZO-1 (green) and TTF-1 (red) in AEC monolayers exposed for 6 days to normoxia, hypoxia, hypoxia + co-culture with hMSCs and hypoxia + incubation with hMSC-CM as indicated (original magnification X 400). C: Representative immunoblots showing the expression TTF-1 and β-actin. D: Densitometric signal for TTF-1 was quantified using NIH image software, and normalized for the corresponding β-actin signal (gray bars: 21% O₂; black bars: 1.5% O₂, hatched bars: 1.5% O₂ + hMSCs in co-culture). Results represent means ± SE (n=5 separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by one-way ANOVA. *, ***: significantly different from normoxic value (*p*<0.05 and *p*<0.001, respectively) and #: significantly different from hypoxic value (*p*<0.05). NS: not significant.

Fig 4

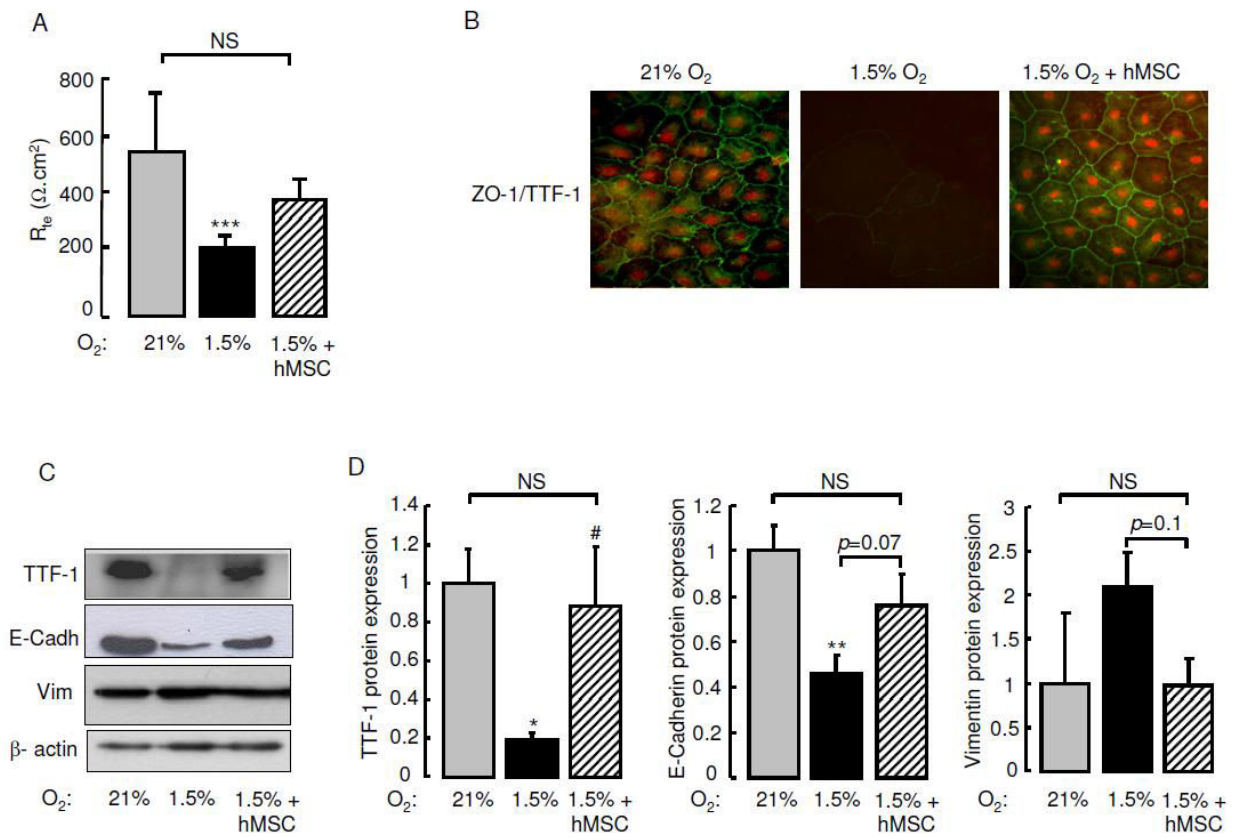


Figure 4: Effect of co-culture with hMSC on alveolar epithelial cell phenotype at day 12. At day 1 after isolation, rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells for 12 days. **A:** at the end of exposure, transepithelial electric resistance (R_{te}) was measured across normoxic AEC monolayers (gray bars) and hypoxic AEC monolayers cultured alone (black bars) or co-cultured with hMSCs (hatched bars). Results represent means ± SE (n=15 filters per condition from 9 independent experiments). **B.** Representative immunostainings of ZO-1 (green) and TTF-1 (red) in AEC monolayers exposed for 12 days to normoxia, hypoxia and hypoxia + co-culture with hMSCs (original magnification X 400). **C:** Representative immunoblots showing the expression TTF-1, E-Cadherin (E-cadh), Vimentin (Vim) and β-actin. **D:** Densitometric signals were quantified using NIH image software, and normalized for the corresponding β-actin signal (gray bars: 21% O₂; black bars: 1.5% O₂, hatched bars: 1.5% O₂ + hMSCs in co-culture). Results represent means ± SE (n=4-6 separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by one-way ANOVA. *, **, ***: significantly different from normoxic value (p<0.05 and p<0.01 and p<0.001, respectively) and #: significantly different from hypoxic value (p<0.05). NS: not significant.

Fig 5

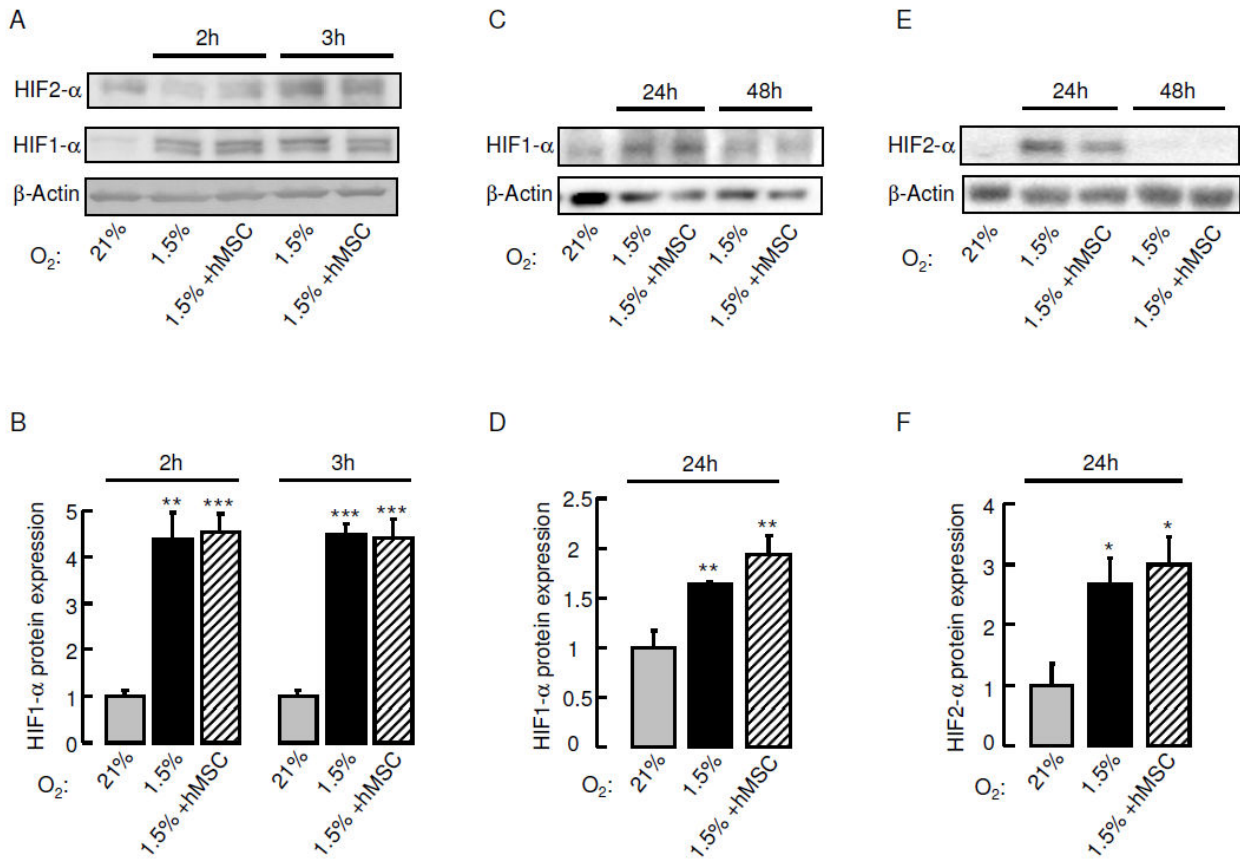


Figure 5: Effect of hMSCs on Hypoxia-Inducible Factor expression in alveolar epithelial cells.

Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for various exposure times (2h, 3h, 24h or 48h) as indicated. A and B: expression of HIF1- α , HIF2- α and β -actin in AEC exposed to normoxia (gray bars) or hypoxia for 2 and 3 h in the absence (black bars) or presence (hatched bars) of hMSC co-culture (representative immunoblots in panel A, densitometric quantification of HIF1- α normalized for β -actin signal in panel B). C and D: expression of HIF1- α and β -actin in AEC exposed to normoxia or hypoxia for 24 and 48 h in the absence or presence of hMSC co-culture (representative immunoblot in panel C, densitometric quantification at 24h in panel D). E and F: expression of HIF2- α and β -actin in AEC exposed to normoxia or hypoxia for 24 and 48 h in the absence or presence of hMSC co-culture (representative immunoblot in panel E, densitometric quantification at 24h in panel F). Results represent means \pm SE (n=4-5 separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by one-way ANOVA. *, **, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively).

Fig 6

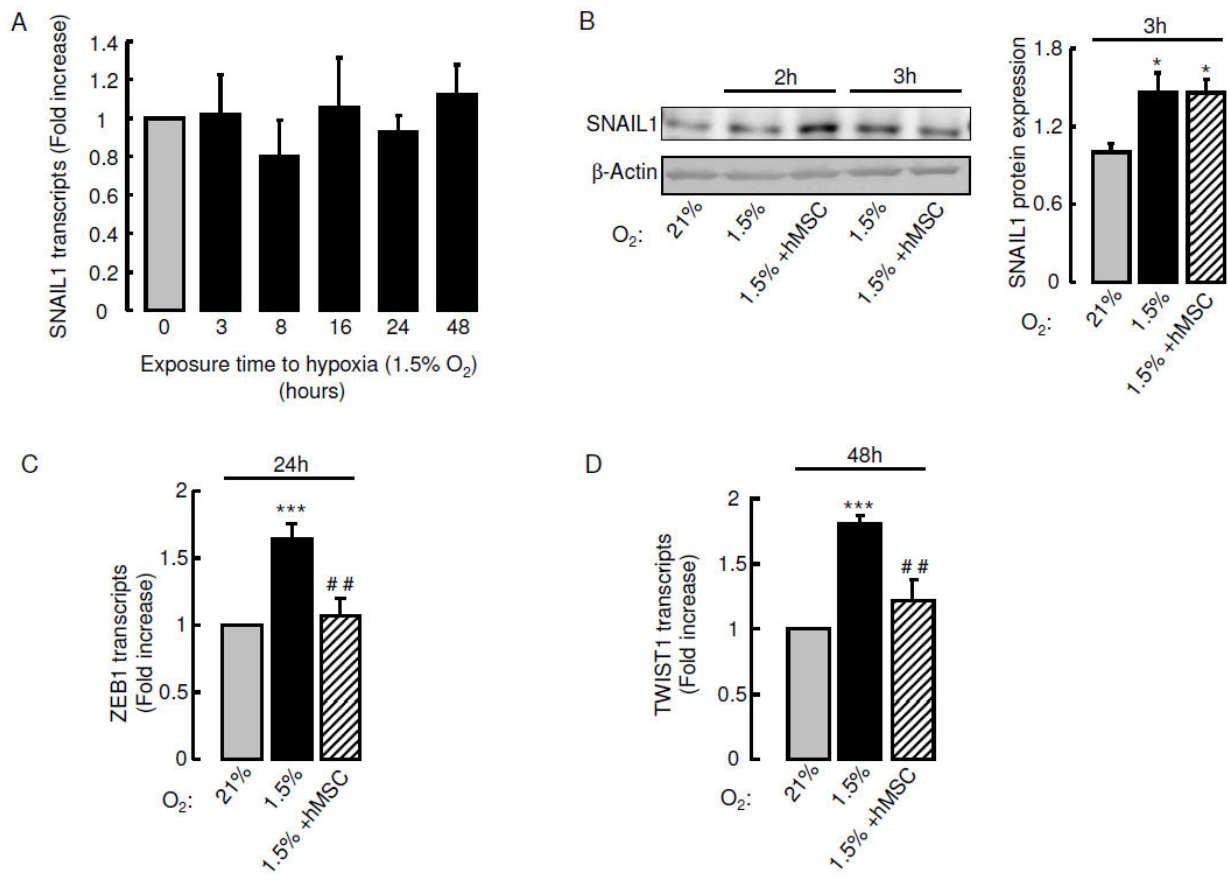


Figure 6: Effect of hMSC on transcription factors involved in hypoxia-induced EMT in alveolar epithelial cells. Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for various exposure times (2h to 48h) as indicated. A: Time-course of the expression of SNAIL1 mRNA transcripts as assessed by qRT-PCR (n=3); B: Representative immunoblots showing the expression of SNAIL1 and β -actin in AEC after 2 and 3h of exposure, and densitometric quantification of SNAIL-1 signal normalized for the corresponding β -actin signal (n=3). C: Relative expression of ZEB1 mRNA transcripts in AEC at 24h as assessed by qRT-PCR (n=5-11). D: Relative expression of TWIST1 mRNA transcripts in AEC at 48h (n=5-9). *, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) and ##: significantly different from hypoxic value ($p < 0.01$) (one-way ANOVA).

Fig 7

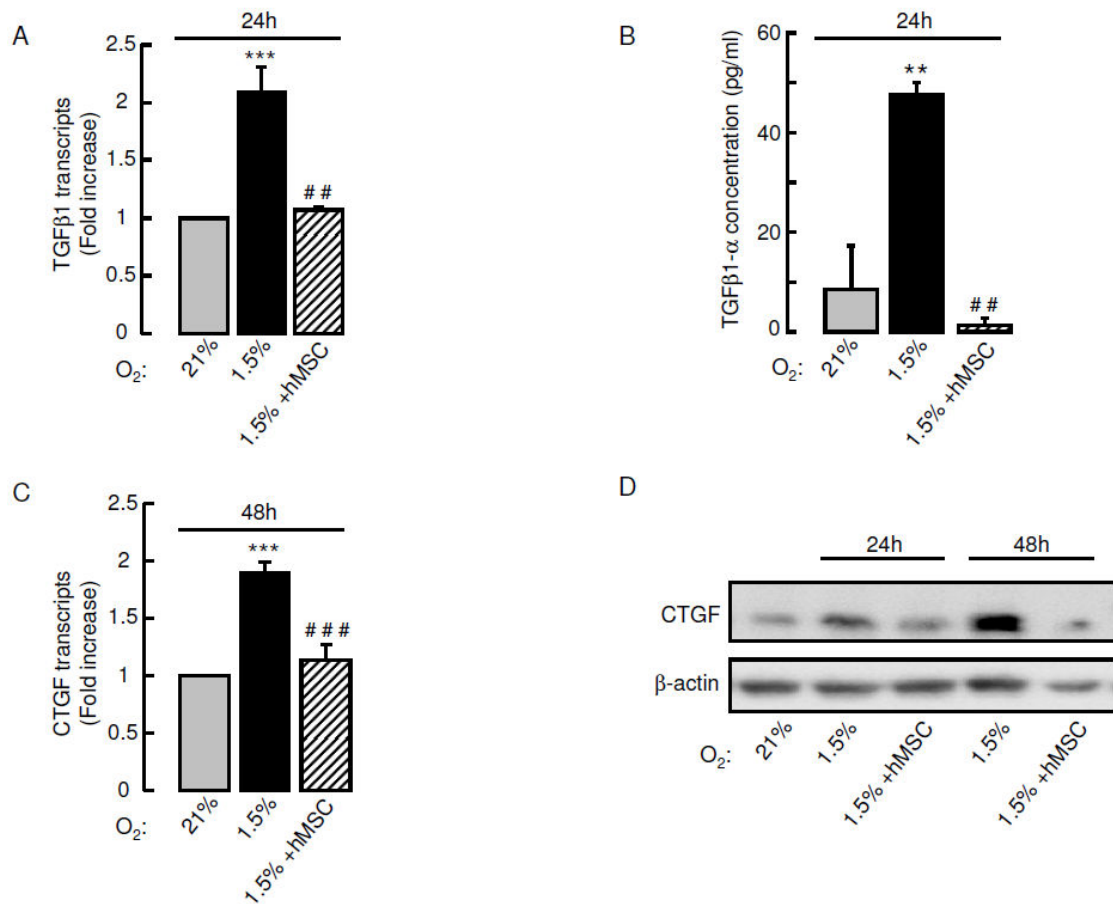


Figure 7: Effect of hMSC on profibrotic factor expression in alveolar epithelial cells. Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for 24h or 48h exposure times as indicated. A: Relative expression of TGFβ1 mRNA transcripts in AEC at 24h as assessed by qRT-PCR (n=4-10). B: Concentration of free TGFβ1 in apical medium of AEC at 24h as assessed by ELISA (n=3). C: Relative expression of CTGF mRNA transcripts in AEC at 48h (n=4-9). D: Representative immunoblots showing the expression of CTGF and β-actin in AEC after 24 and 48h of hypoxic exposure (experiments were repeated twice with similar results). **, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) and ##, ###: significantly different from hypoxic value ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (one-way ANOVA).

Fig 8

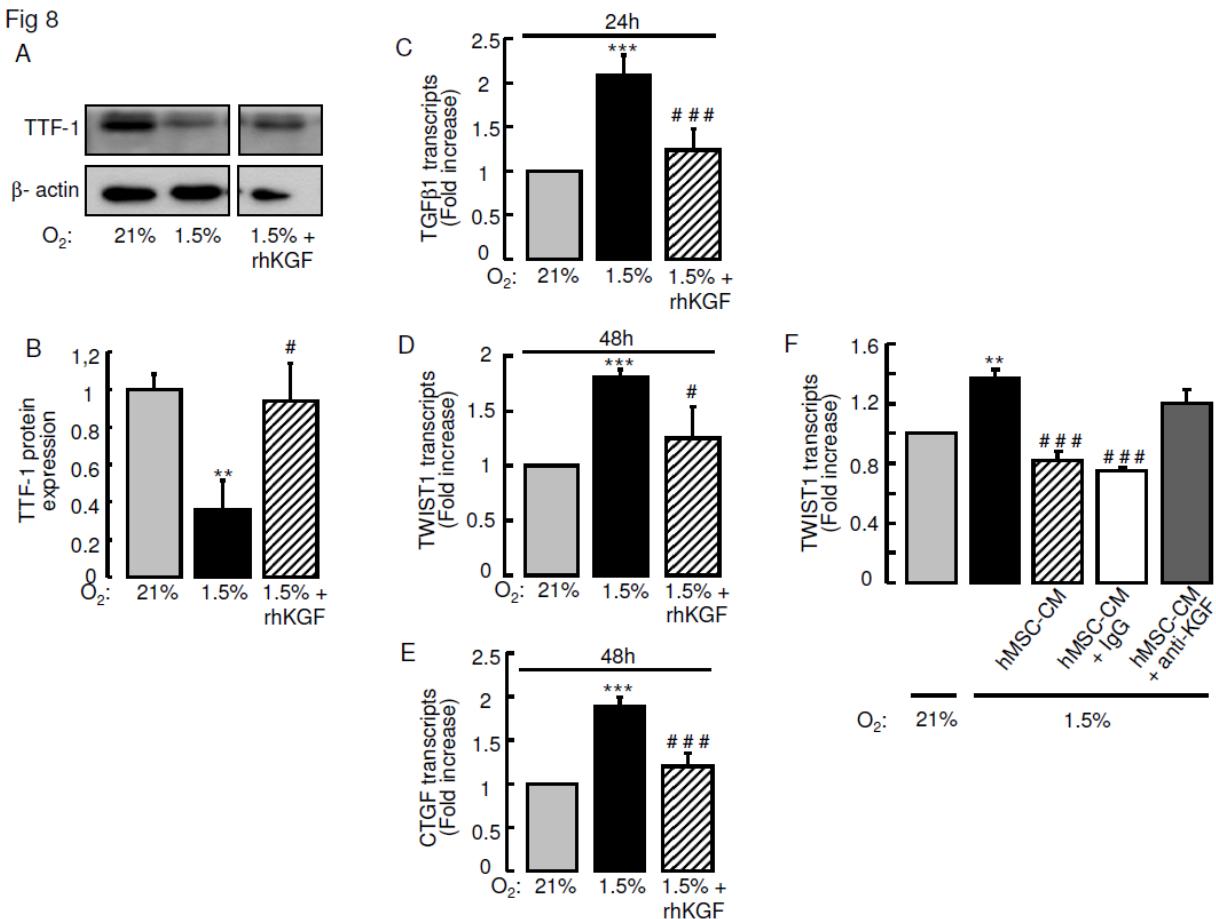
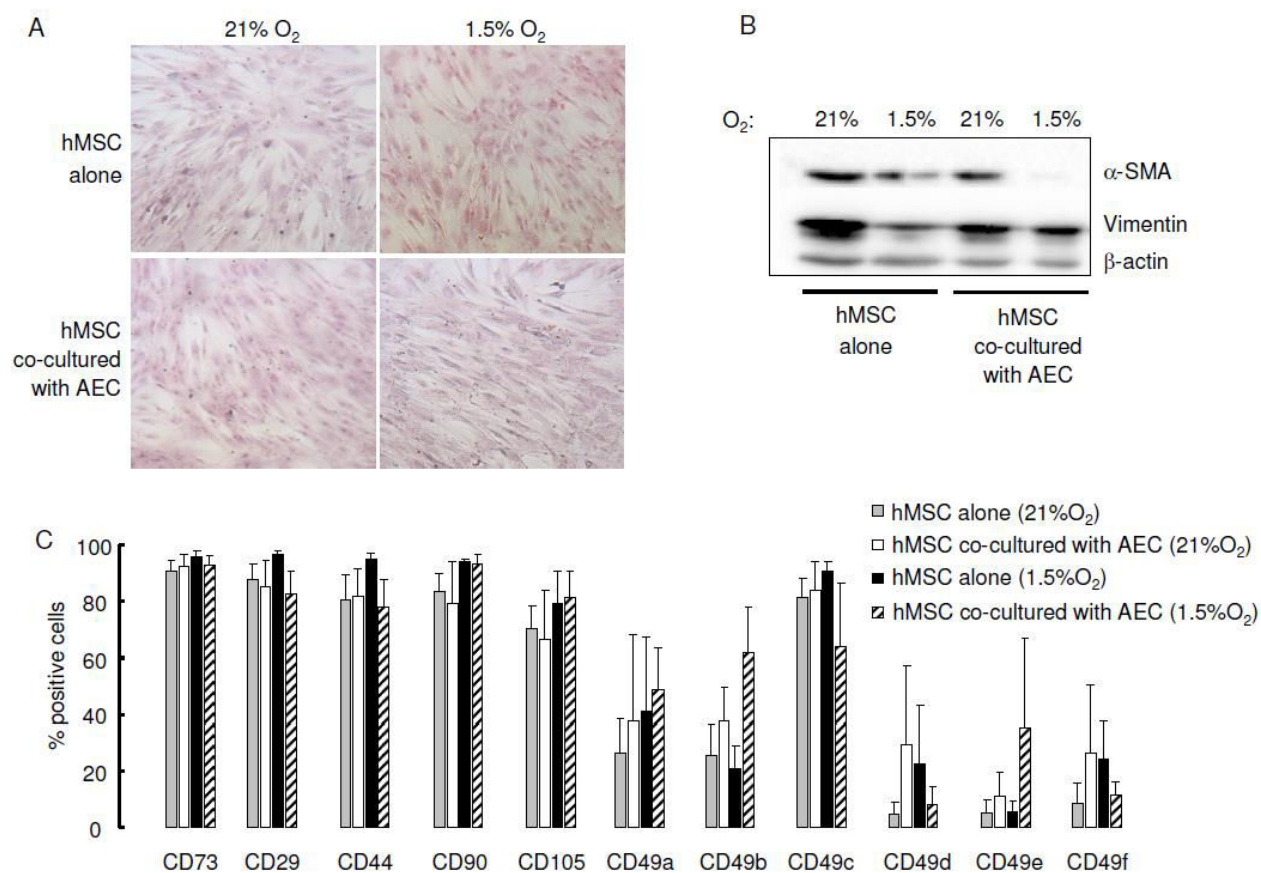


Figure 8: Effect of KGF on hypoxia-induced EMT in alveolar epithelial cells. Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars) or exposed to hypoxia (1.5% O₂) in the absence (black bars) or in the presence of rhKGF (final concentration in culture medium: 250 pg/ml) (hatched bars) for various exposure times (24h, 48h or 6 days), as indicated. A. Representative immunoblots showing the expression TTF-1 and β-actin after a 6 day-exposure. B: Densitometric quantification of TTF-1 signal normalized for the corresponding β-actin signal (n=4). C: Relative expression of TGFβ1 mRNA transcripts in AEC at 24h as assessed by qRT-PCR (n=4-10). D: Relative expression of TWIST1 mRNA transcripts in AEC at 48h (n=4-9). E: Relative expression of CTGF mRNA transcripts in AEC at 48h (n=4-9). F: Relative expression at 48h of TWIST1 mRNA transcripts in hypoxic AEC treated with hMSC-CM depleted in KGF (hMSC-CM + anti-KGF) or not depleted (hMSC-CM + IgG) (n=3). **, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (one-way ANOVA). #, ###: significantly different from hypoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

Table 1. Sequence and length of primers used for quantitative real-time PCR

Sequence name (bp)	Forward primer	Reverse primer
SNAIL1 (120)	GCTCCTCACTGCCAGGATTC	CTGCCTTCCATCAGCCATCT
SNAIL2 (90)	CATTAGAACACACACTGGGGAAA	TGCAGATGTGCCCTCAGGTT
ZEB1 (90)	CCGTAAGTTCAAGTGCACCG	GTGGGACTGCCACTGTGGAT
TWIST1 (108)	CTACGCCTTCTCCGTCTGGA	CAATGACATCTAGGTCTCCGGC
CTGF (100)	CCTAGCTGCCTACCGACTGG	CTTAGAACAGGCGCTCCACT
TGF β 1 (146)	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG	TGGGACTGATCCCATTGATT
β -actin (74)	ACCGTGAAAAGATGACCCAGA	CACAGCCTGGATGGCTACGT

Supplemental Data :



Effect of hypoxia on hMSC phenotype. One day after trypsinization, hMSC seeded at the bottom of the wells (80 000 cells/cm²) were exposed to normoxic (21% O₂) or hypoxic (1.5% O₂) atmosphere for 6 days, in the absence or presence of AEC seeded on transwell filters. A. Photomicrograph showing hMSCs cultured alone or co-cultured with AEC for 6 days under normoxic or hypoxic atmosphere (Hematoxylin-Eosin Staining; original magnification: X 200). B. Representative immunoblots showing the expression of α-SMA, vimentin and β-actin in normoxic/hypoxic hMSCs cultured alone or co-cultured with AEC. C. Expression of cell surface markers as assessed by flow cytometry in normoxic and hypoxic hMSCs cultured alone or co-cultured with AEC, as indicated. No significant difference was noted (One-way ANOVA).

SCHEMA DE L'ETUDE

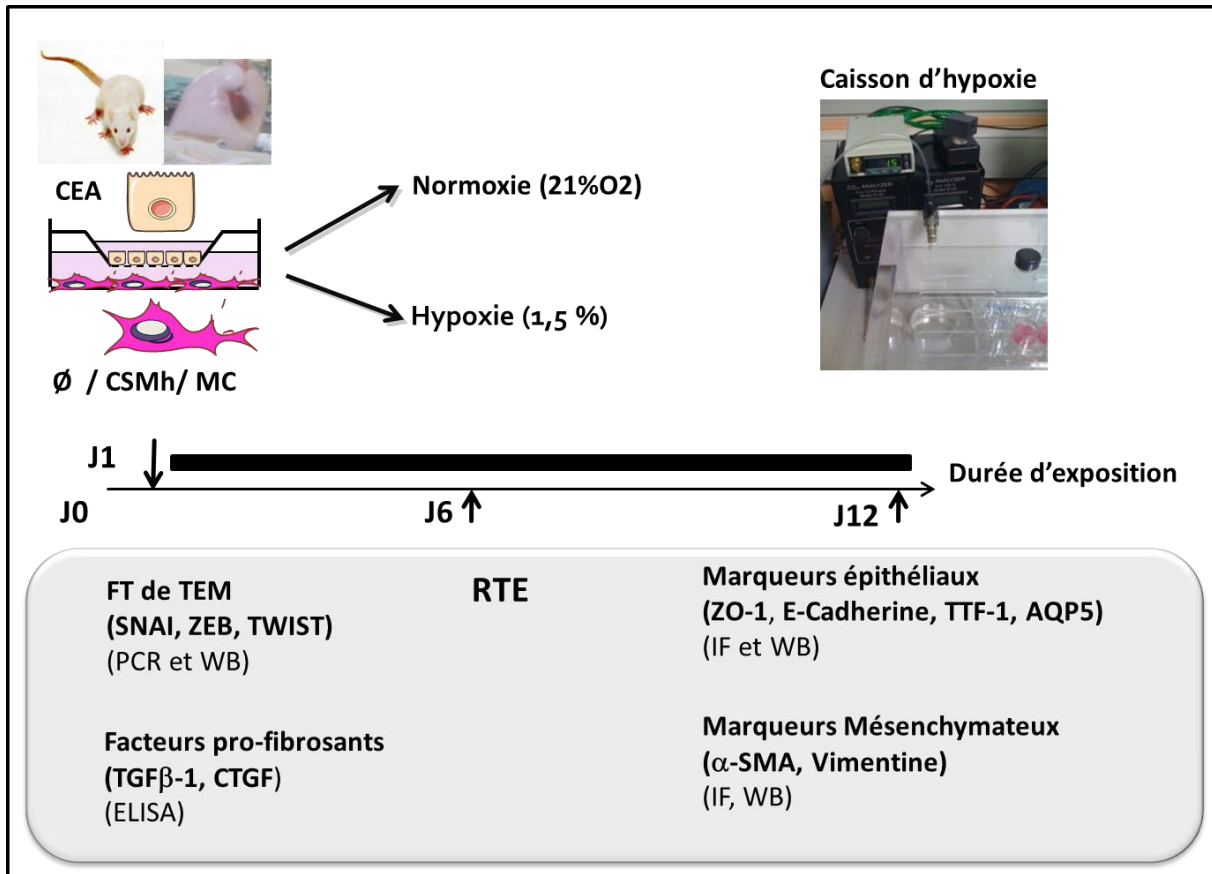


Figure 17 : Schéma du protocole de l'étude

Abréviations : CEA cellule épithéliale alvéolaire, CSMh cellules souches mésoenchymateuses humaines, MC milieu de culture, J jour, FT facteur de transcription, TEM transition épithélio-mésoenchymateuse, RTE résistance trans-épithéliale électrique, PCR polymérase chain reaction, WB western blot, IF immuno-fluorescence. TGF transforming growth factor, CTGF connective tissue growth factor.

Ce travail permet d'une part de décrire les altérations épithéliales alvéolaires dynamiques induites par l'hypoxie chronique et d'autre part de mettre en évidence le rôle protecteur des CSMh d'origine médullaire dans un modèle *in vitro* de co-culture primaire sans contact.

En hypoxie, on observe des modifications morphologiques franches avec une augmentation de la surface des cellules et une baisse progressive des résistances trans-épithéliales (RTE). La perte progressive d'expression des marqueurs épithéliaux (TTF1, AQP5, ZO-1 et E-Cadhérine) est couplée à l'apparition elle-même progressive de marqueurs mésenchymateux (α -SMA et Vimentine) observée en immunofluorescence et quantifiée en western blot. On observe l'expression à la phase initiale de l'hypoxie des facteurs de transcription impliqués dans la TEM tels que SNAI1, TWIST1 et ZEB1, ainsi que des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α . L'hypoxie induit enfin la synthèse et/ou la sécrétion dans le milieu apical de médiateurs profibrosants tels que le TGF- β 1 et le CTGF, connus pour induire une TEM.

La co-culture avec les CSMh prévient les modifications phénotypiques induites par l'hypoxie, ainsi que l'expression des protéines profibrosantes TGF- β 1 et le CTGF et des facteurs de transcription pro-TEM ZEB1 et TWIST. L'expression de HIF-1 α et HIF-2 α n'est pas modulée par la co-culture en présence de CSMh. Le rhKGF permet de réprimer la synthèse de CTGF et de TGF- β en hypoxie ainsi que l'expression du facteur de transcription de TEM TWIST. Le milieu conditionné de CSMh déplété en KGF perd sa capacité à inhiber l'induction de TWIST en hypoxie

Nos résultats soulignent le rôle protecteur paracrine des CSMh et notamment du KGF dans les modifications épithéliales évocatrices de TEM induite par l'hypoxie.

C. DISCUSSION

CRITIQUE ET LIMITES DU MODELE UTILISE

Avant tout, il paraît utile d'argumenter le niveau d'hypoxie fixé à 1,5% dans ce travail. Cette valeur repose non seulement sur les données de la littérature concernant les travaux de culture cellulaire en hypoxie à 1.5% (Higgins, Kimura et al. 2007; Zhou, Dada et al. 2009), mais également sur notre propre expérience. Nous avons en effet observé une corrélation entre le niveau d'hypoxie et l'intensité des modifications épithéliales. Aussi, les niveaux d'hypoxie tissulaire observés en situation clinique peuvent être proches des valeurs obtenues en hypoxie 1.5% dans le milieu de culture. En effet, la pression partielle d'oxygène dans notre milieu de culture est de 45 mm Hg en hypoxie 1.5%. Ces niveaux d'hypoxie peuvent être observés au cours de la fibrose pulmonaire en cas d'épisode de détérioration respiratoire qu'il soit de cause connue (infection, défaillance cardiaque gauche ou maladie thromboembolique) ou de cause inconnue, correspondant alors à une exacerbation aigüe de la maladie fibreuse. Aussi, il est vraisemblable que ces niveaux d'hypoxie puissent être observés de façon plus chronique encore et notamment à l'effort chez des patients ayant une maladie évoluée ou un syndrome de fibrose-emphysème et/ou une hypertension pulmonaire associée comme en témoignent les désaturations importantes mesurées chez ces patients lors du test de marche.

Dans ce travail, nous avons exclusivement utilisé des cultures primaires de CEA pour plusieurs raisons. La technique de culture des pneumocytes II de rat est bien maîtrisée dans notre laboratoire. Les pneumocytes obtenus, peu ou pas proliférants, ont des caractéristiques phénotypiques épithéliales indiscutables avec des jonctions intercellulaires serrées nécessaires à la constitution d'une monocouche cellulaire ayant des résistances trans-épithéliales satisfaisantes. Ces conditions sont indispensables pour l'étude du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, qui est un processus dynamique pouvant prendre plusieurs jours. Il est en effet plus difficile d'interpréter les modifications observées sur des CEA de lignées humaines ou animales, qui sont issues de cellules cancéreuses immortalisées possédant en général un temps de doublement court (environ

48h pour les A549) et une propension toute particulière à acquérir des caractéristiques d'agressivité et d'invasion cellulaire. Compte tenu du caractère naturellement prolifératif de ces cellules, elles ne peuvent pas être maintenues dans le même support de culture.

Outre les critiques sur le choix des marqueurs mésenchymateux utilisés, notamment de la vimentine qui pourrait constituer un marqueur de cellule épithéliale agressée ou activée (Witzgall, Brown et al. 1994), le principal écueil qu'il faut éviter en culture primaire est celui de la contamination fibroblastique lors de l'extraction cellulaire. Conscients des possibilités de contamination fibroblastiques de notre extraction, nous avons optimisé celle-ci en travaillant sur des rats très jeunes et en utilisant la cis-OH- proline dans les 24 premières heures de culture pour limiter la contamination fibroblastique en freinant leur prolifération comme l'indiquent Willis et coll. (Kao and Prockop 1977) (Willis, Liebler et al. 2005). L'âge des rats est un paramètre important comme le suggère Rojas et coll. avec une propension plus nette à la fibrogénèse après agression chez les rats âgés (Xu, Gonzalez et al. 2009; Bustos, Huleihel et al. 2014; Sueblinvong, Neveu et al. 2014). Dans notre expérience, nous avons constaté une plus forte contamination fibroblastique lors d'extractions réalisées chez des rats plus âgés, nous conduisant ainsi à prendre des rats très jeunes (Sprague-Dawley~125 g). Ces différentes précautions nous ont permis de garantir une pureté cellulaire satisfaisante atteignant plus de 92% (testé par marquage des corps lamellaires par la phosphine 3R), les contaminants étant principalement des macrophages. Pour tenter d'optimiser notre extraction cellulaire, nous avons procédé à une sélection par cytométrie en flux à l'aide du marqueur E-Cadhérine. Cette technique n'a pas été concluante en raison de l'auto-fluorescence des CEA et des problèmes techniques rencontrés avec lésions cellulaires rendant difficiles les analyses réalisées. Néanmoins, les marqueurs mésenchymateux n'étaient pas détectables à 6 jours de culture (Figure 1A), ce qui exclut une contamination fibroblastique importante.

Il faut par ailleurs souligner que toutes les caractéristiques de la TEM n'ont pas été étudiées dans ce travail comme l'acquisition des propriétés des cellules myofibroblastiques, à savoir notamment la motilité des cellules et leur production de collagène. On peut parler de perte

du phénotype épithélial certainement, peut-être pas complètement de TEM, mais c'est le propre de la TEM de type 2 (Nieto 2011; Lopez-Novoa and Nieto 2009).

Pour revenir au modèle de co-culture utilisé, l'utilisation de CEA et de CSM issues de deux espèces différentes mérite probablement d'être justifiée comme indiqué plus haut dans le premier article.

Enfin, dans ce travail, le rôle propre du KGF a été testé par l'administration de rhKGF d'une part et d'autre part par la déplétion en KGF du milieu de culture de CSMh. Il aurait été intéressant dans ce modèle de coculture en hypoxie chronique d'utiliser des CSM ne produisant pas de KGF. L'utilisation de la technique de RNA interférant anti-KGF a été testée. Malgré les différentes expériences réalisées, nous n'avons pas obtenu une extinction de la synthèse de KGF, mais plutôt une baisse de son expression évaluée en ELISA entre 55 et 65%.

INFLUENCE DE L'HYPOXIE CHRONIQUE SUR LE PHENOTYPE DES CEA

PERTE DU PHENOTYPE EPITHELIAL EN HYPOXIE

En hypoxie chronique, on constate une baisse progressive des résistances trans-épithéliales, qui témoigne de la perte des jonctions serrées entre les cellules, étape nécessaire à l'acquisition du phénotype mésenchymateux. Les valeurs de RTE en normoxie dans notre modèle ($1635 \pm 395 \Omega \cdot \text{cm}^2$) sont comparables aux données de la littérature (Filippatos, Hughes et al. 1997). La baisse de ces résistances est significative en hypoxie avec des valeurs de RTE qui atteignent $328 \pm 41 \Omega \cdot \text{cm}^2$ à 6 jours ($p < 0,001$). Ces valeurs continuent de baisser plus lentement à 12 jours. Cependant, la persistance d'une valeur seuil témoigne de l'existence d'une couche cellulaire viable. La persistance par ailleurs de noyaux bien visibles à la coloration au DAPI constitue un autre témoin de la persistance d'une couche cellulaire viable. Cette baisse des RTE accompagne des modifications morphologiques franches des cellules qui deviennent plus larges et qui perdent leur géométrie cubique avec l'apparition de formes parfois stellaires. Quant à l'expression des marqueurs épithéliaux, on assiste à des modifications différentielles de leurs expressions. Tandis que la baisse d'expression du

facteur de transcription nucléaire TTF-1 est très rapide (observée en IF et confirmée en WB). Il faut souligner l'illustration du rôle du TTF-1 dans les pneumocytes par le syndrome clinique lié au déficit isolé partiel de ce facteur de transcription (dû à une délétion d'un allèle 14q12-21) responsable, en dehors des anomalies thyroïdiennes et neurologiques, d'une maladie pulmonaire sévère dès la naissance avec une perturbation franche du métabolisme du surfactant provoquant un équivalent de maladie des membranes hyalines avec des anomalies pulmonaires kystiques (Galambos, Levy et al. 2010). Ces éléments suggèrent l'influence de l'hypoxie dans le métabolisme des protéines du surfactant, qui pourrait constituer une autre dimension des effets de l'hypoxie sur le poumon profond.

Dans notre modèle, l'hypoxie induit une baisse d'expression des autres marqueurs épithéliaux caractéristiques que sont la protéine transmembranaire AQP5 ou les protéines de jonction ZO-1 et E-Cadhérine (Figures 2 A, B et C). Pour ce dernier, qui constitue la cible principale des facteurs de transcription impliqués dans la TEM, la baisse d'expression est tardive et survient après une phase de redistribution sous membranaire de la protéine comme l'illustrent les figures 1A, B et C.

La question de la caractérisation des CEA en culture peut se poser. En effet, s'agit-il de pneumocytes de type II ou de pneumocytes de type I ? Un des éléments de réponse pourrait se limiter à la description morphologique avec des cellules cuboïdes régulières tout au long de la culture en normoxie, pouvant correspondre à des pneumocytes de type II. Si on s'intéresse aux marqueurs épithéliaux, la distinction entre ces 2 types cellulaires reposerait sur la détection de l'aquaporine 5, qui est présent sur les pneumocytes de type I. L'AQP-5 est présent en normoxie et disparaît en hypoxie, plaidant pour une altération épithéliale avec « switch » phénotypique sans pour autant se limiter à une transdifférenciation pneumocytes de type I / pneumocytes de type II.

L'existence dans notre modèle d'une TEM est suggérée par la baisse des marqueurs épithéliaux parallèlement à l'apparition de marqueurs mésenchymateux (Thiery and Sleeman 2006). Notre choix s'est porté sur les marqueurs classiques de cellules myofibroblastiques comme l' α -SMA et la vimentine.

Les analyses phénotypiques réalisées suggèrent donc l'existence d'un phénomène de transformation mésenchymateuse lente et progressive induite par l'hypoxie chronique comparable aux effets du TGF- β dans un modèle de culture primaire rapporté par Willis et coll. et que nous avons reproduit dans notre laboratoire (Willis, Liebler et al. 2005). Décrit dans d'autres modèles de fibrogénèse, notamment rénale (Higgins, Kimura et al. 2007), le rôle de l'hypoxie dans la TEM a été plus rarement étudié dans le poumon. Zhou et coll. avaient montré l'influence de l'hypoxie dans la TEM des CEA essentiellement sur des lignées de cellules épithéliales RLE-6TN, MLE 12 et A 549, issues respectivement du rat, de la souris et de l'Homme (Zhou, Dada et al. 2009). L'existence d'une TEM est confortée dans notre travail par la mise en évidence d'une expression certes transitoire, mais clairement provoquée par l'hypoxie, des facteurs de transcription classiquement impliqués dans la TEM que ce soit au cours du développement ou plus particulièrement au cours des processus fibrosants (Thiery and Sleeman 2006; Thiery, Acloque et al. 2009; Duffield, Luper et al. 2013; Lamouille, Xu et al. 2014). Comme développé plus loin, nous observons notamment une augmentation de l'expression de TWIST dans notre modèle, comme cela a été observé par d'autres auteurs (Pozharskaya, Torres-Gonzalez et al. 2009; Sakamoto, Hashimoto et al. 2012; Lamouille, Xu et al. 2014).

L'ensemble de nos résultats plaide donc pour un rôle de l'hypoxie dans la TEM potentiellement impliquée dans la fibrogénèse pulmonaire dans ce modèle *in vitro* avec notamment une stabilisation des facteurs de transcription de la TEM tels que TWIST, ZEB et SNAIL, répresseur principal de la E-Cadhérine. Ces résultats *in vitro* méritent d'être étayés *in vivo*.

LES CSM FREINENT LES ALTERATIONS EPITHELIALES INDUITES PAR L'HYPOXIE

La co-culture avec des CSM humaines en fonds de boîte permet de limiter les altérations phénotypiques induites par l'hypoxie.

Non seulement la taille, la morphologie, mais aussi la résistance trans-épithéliale sont maintenues en hypoxie en présence de CSMh en fonds de puits dans notre modèle de co-culture (Figure 5). Les données en immunofluorescence sont confirmées par des quantifications en WB concernant les marqueurs épithéliaux comme TTF-1, AQP5 et E-Cadhérine. De même, les CSM empêchent l'apparition des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine à des temps tardifs. Ainsi, les CSMh préservent le phénotype épithélial des CEA *in vitro* tout au long de la culture.

Les CSMh utilisées dans notre étude ont été préalablement isolées, purifiées et caractérisées au Laboratoire de Thérapie Cellulaire de l'Hôpital Saint-Louis par l'équipe du Pr Larghero. Nous avons pris le soin de contrôler les principales caractéristiques phénotypiques des CSMh dans notre modèle de culture prolongée (jusqu'à 6 jours) en hypoxie. L'absence de transformation fibroblastique voire myofibroblastique a été en effet vérifiée par immunomarquage α -SMA et Vimentine et quantification en western blot. Le maintien de ces caractéristiques phénotypiques est cohérent avec le fait que les CSM humaines sont à l'état physiologique dans la moelle dans un microenvironnement hypoxique avec des niveaux d'oxygène allant de 1 à 7% (Fehrer, Brunauer et al. 2007). Ce maintien du phénotype des CSM en hypoxie pourrait constituer un prérequis important pour permettre leur administration future dans des situations de SDRA ou de fibrose pulmonaire. Cependant, il convient bien sûr de prendre en compte le système intégré et les autres facteurs du microenvironnement du poumon malade susceptibles d'induire une différenciation locale de ces CSM.

IMPLICATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA TEM

Les altérations épithéliales induites par l'hypoxie suggèrent l'existence d'une TEM, dont la confirmation passe par la mise en évidence de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans ce phénomène (Thiery and Sleeman 2006) (Duffield, Lupper et al. 2013; Lamouille, Xu et al. 2014). Nous nous sommes donc intéressés aux facteurs de transcription classiquement décrits comme SNAI, TWIST et ZEB et nous parvenons à montrer que l'hypoxie induit ces facteurs. Nous montrons qu'il s'agit d'une induction temporaire avec une expression différentielle dans les 48 heures d'hypoxie. Ainsi, l'ARNm de SNAI 1 apparaît à 2-3h d'hypoxie suivi par SNAI 2 dont l'expression persiste jusqu'à 16h d'hypoxie. Vient ensuite l'ARNm de ZEB1 présent à 24h d'hypoxie puis enfin TWIST1 qui est le dernier à apparaître, à 48h d'hypoxie.

L'influence propre de chacun de ces facteurs n'a pas été testée dans notre modèle, mais il est vraisemblable qu'il y ait une intrication de ces facteurs de transcription entre eux. Le caractère séquentiel de l'intervention de ces différents facteurs de croissance est en effet décrit (Lamouille 2014). SNAIL participerait à l'expression de ZEB et on décrit une coopération de SNAIL et de TWIST pour l'expression protéique de ZEB (Dave, Guaita-Esteruelas et al. 2011).

La contribution de TWIST au cours de la fibrogénèse est suggérée notamment dans différents modèles *in vivo* (Pozharskaya, Torres-Gonzalez et al. 2009). Dans le poumon de FPI, au sein des zones de fibrose, une surexpression de TWIST est observée notamment dans les zones de double marquage épithélio-mésenchymateux évoquant une TEM (Pozharskaya, Torres-Gonzalez et al. 2009). TWIST peut être induit par HIF-1, mais aussi NFκB, IGF-1 et la voie EGF/EGFR (Lo, Hsu et al. 2007; Yang, Wu et al. 2008; Pozharskaya, Torres-Gonzalez et al. 2009; Sakamoto, Hashimoto et al. 2012). Bien que la délétion ciblée de TWIST dans les CEA ne prévienne pas la survenue d'une fibrose induite par la bléomycine chez la souris, son

implication dans les phénomènes de TEM *in vitro* est clairement soulignée (Yang, Wu et al. 2008; Pozharskaya, Torres-Gonzalez et al. 2009; Yang, Velikoff et al. 2015).

TWIST pourrait constituer une cible pour des thérapeutiques anti-fibrosantes. Une équipe a récemment mis en évidence le rôle des HDAC dans la modulation de l'expression de TWIST via l'induction des inhibiteurs de fixation à l'ADN (Id2), qui empêchent l'action de TWIST, hétérodimère en double hélice de la famille des bHLH (Yang, Velikoff et al. 2015).

Dans notre modèle, la co-culture en présence de CSM permet une modulation de l'expression de TWIST, ZEB mais n'a pas d'effet sur l'expression de SNAI 1 et 2 qui restent transitoirement inductibles.

IMPLICATION DU TGF

Parmi les inducteurs de ces facteurs de transcription, figurent les médiateurs profibrosants au premier rang desquels le TGF- β , qui est sécrété dans le milieu apical des CEA en culture en condition d'hypoxie (Figure 8A). Cette sécrétion est optimale à 24h d'hypoxie (ARNm et protéine) et elle est réprimée par la co-culture avec des CSM. Il en est de même pour le CTGF (ARNm et protéine). L'interprétation de ces résultats est assez cohérente avec le rôle profibrosant de l'hypoxie médié par la synthèse autocrine de TGF- β et de CTGF, synthèse elle-même modulée par les CSMh.

Les concentrations de TGF- β mesurées dans le milieu apical des CEA sont de l'ordre de 50 pg/ml et rejoignent les valeurs rapportées par Zhou et coll. , à savoir 20 pg/ 10^6 cellules (Zhou, Dada et al. 2009). Bien que les concentrations de TGF- β administrées pour induire une TEM en culture cellulaire sont de l'ordre de 1-3 ng/mL soit 20 à 50 fois plus importantes (Willis, Liebler et al. 2005; Higgins, Kimura et al. 2007; Felton, Borok et al. 2009), les quantités sécrétées par les CEA en hypoxie peuvent suffire à induire des effets profibrosants de manière autocrine, puisque le blocage du récepteur de type I prévient la TEM (Zhou, Dada et al. 2009). Le TGF- β se fixe à son récepteur transmembranaire serine/thréonine kinase type II, qui est phosphorylé et permet la formation d'un hétérodimère avec le récepteur de type I créant un complexe ligand-récepteur, qui entraîne la phosphorylation de

Smad2 et Smad3 conduisant à leur association avec Smad4 et à leur translocation dans le noyau (Bonniaud, Margetts et al. 2005). La transactivation des gènes de réponse au TGF- β est alors lancée incluant les protéines pro-fibrosantes avec entre autres le CTGF, dont la sécrétion est également induite ici par l'hypoxie. Les éléments de réponse au TGF- β comprennent non seulement la cascade des SMAD, mais aussi la voie de survie AKT et les voies de signalisation ERK, MAPK impliqués entre autres dans les phénomènes de TEM (Lamouille, Xu et al. 2014).

L'implication du TGF β dans notre modèle pourrait être vérifiée par l'utilisation de bloqueurs de ce facteur de croissance à l'aide par exemple d'un anticorps bloquant.

IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION HYPOXIQUE HIF

Si on s'intéresse maintenant aux évènements en amont de la synthèse du TGF- β en hypoxie, la principale voie de signalisation qui est évoquée est celle des facteurs de transcription HIF. Nous montrons ici une expression de HIF-1 α et HIF-2 α dans les 48 premières heures d'hypoxie (Figure 5). Tandis que l'expression de HIF-1 α est précoce, celle de HIF-2 α reste plus prolongée et diminue plus tardivement après 24h. Le caractère transitoire de l'expression de HIF a été décrit sur des CEA de la lignée A549 (Uchida, Rossignol et al. 2004). L'expression de HIF constitue vraisemblablement une étape initiale indispensable à la mise en place des éléments de réponse à l'hypoxie. Aussi, ce qui vient conforter le rôle de HIF dans notre modèle, c'est le résultat de l'administration d'un stabilisateur de HIF en normoxie, le chlorure de Cobalt (Wang and Semenza 1993). En effet, les altérations épithéliales induites sont comparables : modification morphologique, baisse d'expression nucléaire de TTF1 et de ZO-1 à la membrane. L'implication de HIF dans les modifications phénotypiques induites par l'hypoxie est suggérée par d'autres équipes. Le rôle de HIF au cours de la TEM a également été exploré dans la cancérogénèse (Zeisberg and Neilson 2009; De Craene and Berx 2013; Lamouille, Xu et al. 2014). HIF-2 α est l'isoforme majeur impliqué dans la TEM de la tumorigénèse (Kim, Perera et al. 2009). Pour ce qui est de la fibrogénèse, le rôle déterminant de la stabilisation de HIF et notamment de HIF-1 α est rapporté au cours de la TEM induite par l'hypoxie sur des cellules tubulaires rénales (Higgins, Kimura et al.

2007). Zhou et coll. ont montré le rôle de la stabilisation de HIF dans la TEM induite par l'hypoxie *in vitro* sur des CEA. HIF semble être impliqué dans la synthèse du TGF- β , mais il y a peu de donnée sur l'activation du TGF- β et notamment sur la régulation dépendante des intégrines (Zhou, Dada et al. 2009; Chapman 2011). La stabilisation de HIF-1 α est vérifiée dans un modèle de fibrose à la bléomycine, mais également dans le poumon de fibrose humaine (Tzouveleakis, Harokopos et al. 2007). Par ailleurs, le rôle de HIF est souligné dans un modèle animal de souris développant une fibrose spontanée ayant une délétion allélique du facteur de Von Hippel Lindau pVHL), élément requis pour l'ubiquitination de HIF (Hickey, Richardson et al. 2010).

Dans notre modèle, les CSM en co-culture ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression de HIF. En effet, la protéine HIF garde la même cinétique en hypoxie en présence ou non des CSM en co-culture. L'effet bénéfique des CSM dans notre modèle de co-culture ne semble pas être lié à la modulation de la voie HIF. Cependant, le milieu conditionné de CSMh obtenu en normoxie permet une modulation de HIF, suggérant le rôle d'un médiateur que les CSMh ne parviennent pas à sécréter ou pas suffisamment en hypoxie. La comparaison du secretome des CSM en normoxie et en hypoxie pourrait ainsi apporter des pistes éventuelles.

Si l'effet des CSM en co-culture ne semble pas être en lien avec HIF, il reste plusieurs voies de signalisation qui pourraient intervenir, telles que la voie NF κ B ou encore la voie EGF/EGFR, toutes deux impliquées dans la stabilisation des facteurs transcriptionnels de la TEM tels que TWIST, ZEB et SNAIL. Des travaux ont montré l'implication des lysyls oxydases dans la stabilisation de SNAIL au niveau intra-cellulaire et dans les dépôts de collagène en extra-cellulaire (Sahlgren, Gustafsson et al. 2008).

AUTRES VOIES POTENTIELLEMENT IMPLIQUEES

D'autres hypothèses peuvent donc être formulées pour tenter de comprendre l'effet bénéfique des CSMh en co-culture en hypoxie.

Le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut être avancé. L'influence des ROS dans la survenue d'une TEM est décrite et l'utilisation de la N-acétyl-cystéine semble prévenir ce phénomène (Felton, Borok et al. 2009). La production de ROS est classique en hyperoxie et peut être induite par d'autres facteurs tels que les médiateurs profibrosants, au premier rang desquels, le TGF- β . Des travaux cliniques montrent une augmentation des ROS dans le poumon de fibrose (Borok, Buhl et al. 1991; Kinnula and Myllarniemi 2008; Koli, Myllarniemi et al. 2008). Le rôle de l'hypoxie dans la synthèse des ROS est également souligné (Chandel, Maltepe et al. 1998; Lin, David et al. 2008; Zhou, Dada et al. 2009; Chandel 2010; Semenza 2011). L'utilisation d'antioxydants extérieurs tels que la NAC ou le blocage de la synthèse mitochondriale des ROS, conduisent à la baisse de la production de TGF- β et préviennent les phénomènes de TEM (Felton, Borok et al. 2009; Zhou, Dada et al. 2009). Au sein de notre laboratoire, le rôle du stress oxydant a également été exploré. L'utilisation de Euk134 et de la N-acétyl-cystéine (5mM) ont permis de prévenir du moins partiellement les altérations épithéliales induites par l'hypoxie suggérant indirectement le rôle des ROS. Le niveau du stress oxydant dans les CEA exposées à l'hypoxie a pu être évalué par la mesure du γ -H2AX (Mémoire de Master 2 F. Jeny). De façon intéressante, ce travail a montré une modulation du niveau des ROS par le milieu conditionné de CSMh.

Enfin, une autre hypothèse est celle du stress du réticulum endoplasmique, qui est impliquée dans les phénomènes de TEM et qui pourrait être modulée par les CSMh (Zhong, Zhou et al. 2011). Révélé au cours des fibroses familiales avec mutation de la protéine C du surfactant, le rôle du stress du RE dans les CEA est suggéré au cours de la fibrogénèse pulmonaire (Nogee, Dunbar et al. 2001; Thomas, Lane et al. 2002; Korfei, Ruppert et al. 2008; Lawson, Crossno et al. 2008). Responsable essentiellement d'une apoptose épithéliale excessive, le stress du RE semble également être impliqué dans les altérations du phénotype des CEA compatibles avec une TEM *in vitro* et *in vivo* (Lawson, Cheng et al. 2011; Zhong, Zhou et al. 2011; Tanjore, Blackwell et al. 2012). L'induction du stress du RE conduit à l'activation des voies de signalisation MAPK, Smad, β -caténine et Src kinase, dont l'inactivation ciblée par des agents pharmacologiques semble prévenir la TEM (Tanjore, Cheng et al. 2011). De façon intéressante, la mélatonine semble limiter le stress du RE dans

un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine (Zhao, Wu et al. 2014). Les interactions de la mélatonine et des CSM sont complexes avec des effets bénéfiques et synergiques, qui soulignent leurs propriétés anti-oxydantes intéressantes dans différents modèles d'agression (Mias, Trouche et al. 2008; Tang, Cai et al. 2013).

ROLE PARACRINE DES CSM

Les CSMh ont des propriétés particulièrement intéressantes permettant de préserver le phénotype épithélial des CEA soumises à l'hypoxie chronique dans notre modèle de co-culture. La co-culture permet de moduler la sécrétion de TGF- β , de CTGF et empêche l'expression des facteurs de transcription TWIST-1 et ZEB-1, impliqués dans les phénomènes de TEM. Cependant, l'expression de HIF et de SNAIL-1 ne sont pas modifiés par les CSMh en co-culture.

Ces effets paracrines peuvent être liés à différents médiateurs appartenant au secretome des CSMh. Nous nous sommes intéressés en particulier à un candidat, le keratinocyte growth factor (KGF). Le rôle bénéfique du KGF dans les agressions épithéliales aiguës a été décrit dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* (Panos, Bak et al. 1995; Yano, Deterding et al. 1996; Guery, Mason et al. 1997; Gupta, Su et al. 2007; Lee, Fang et al. 2009; Sakamoto, Yazawa et al. 2011; Lee, Krasnodembskaya et al. 2013; Goolaerts, Pellan-Randrianarison et al. 2014; Shyamsundar, McAuley et al. 2014). Le KGF assure la protection de la cellule épithéliale et intervient notamment dans le maintien du transport de sodium transépithélial et dans la balance oxydants/antioxydants. Il induit entre autres les voies de survie cellulaire Akt et MAPK (Qiao, Yan et al. 2008). Dans ce travail, la concentration de KGF dans le surnageant des CSMh a été mesurée avec des valeurs aux alentours de 250 pg/mL. Nous avons montré que l'administration de KGF humain recombinant à la posologie de 50 pg/mL suffit à préserver le phénotype épithélial des CEA en culture (maintien des RTE, de l'expression de TTF-1 et de ZO-1). Le rhKGF inhibe non seulement la synthèse de TGF- β 1 et de CTGF, mais aussi l'expression de TWIST-1 en hypoxie. Le milieu conditionné de CSMh supprime l'induction de TWIST1 en hypoxie, mais la déplétion en KGF du milieu conditionné de CSMh fait perdre cette propriété, soulignant ainsi le rôle du KGF dans la modulation de

l'expression de TWIST dans notre modèle. Cependant, les CSMh secrètent vraisemblablement d'autres médiateurs qui garantissent et complètent les propriétés protectrices des CSMh.

Outre les facteurs de croissance, il est possible qu'interviennent des substances présentes dans des exosomes produits par les CSMh. En effet, différentes équipes ont souligné le rôle de ces structures de 30-60 nm, pouvant contenir non seulement des médiateurs hydrophobes mais aussi du matériel génétique (ARNm et microARN) ou encore des mitochondries (Islam, Das et al. 2012). Ces microvésicules participent ainsi aux phénomènes paracrines, mais aussi juxtacrines des cellules souches (Collino, Deregibus et al. 2010; Zhu, Feng et al. 2014). Il est possible que ces microvésicules contiennent des médiateurs pouvant interférer directement avec les facteurs de transcription impliqués dans la TEM comme par exemple TWIST ou ZEB. Si l'effet des CSM en co-culture ne semble pas être en lien avec HIF, il reste plusieurs voies de signalisation qui pourraient intervenir, telles que la voie NFkB ou encore la voie EGF/EGFR.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos résultats issus de modèles *in vitro* permettent de souligner le rôle bénéfique des CSM et de leur milieu conditionné sur les altérations épithéliales induites par l'hypoxie chronique continue. Dans le premier travail, nous montrons l'apparition d'altérations fonctionnelles des CEA sous l'effet conjoint de l'hypoxie et des cytokines pro-inflammatoires avec une augmentation de la perméabilité épithéliale associée à une baisse des capacités de transport de fluide. Dans le second travail, nous mettons en évidence des modifications phénotypiques progressives des CEA en hypoxie avec la perte d'expression des marqueurs épithéliaux et l'apparition de marqueurs mésenchymateux évoquant l'existence d'une TEM, comme l'atteste l'expression des facteurs de transcription de la TEM (SNAI, ZEB et TWIST). Les CSM ont dans ces deux modèles des effets cytoprotecteurs de mécanisme paracrine impliquant notamment le KGF. Ce médiateur permet de restaurer l'expression apicale de la protéine α -ENaC. Il semble également impliqué dans la modulation des facteurs de transcription de la TEM (TWIST).

Cet effet bénéfique des CSM nous amène à nous interroger sur le rôle éventuel des cellules mésenchymateuses différenciées que sont les fibroblastes (Shannon, Pan et al. 2001). Ces cellules ont été utilisées comme témoins par d'autres auteurs ayant évalué l'effet des CSM (Gupta, Su et al. 2007; Lee, Fang et al. 2009). Comparer les effets des fibroblastes issus de « poumons sains » à ceux des CSMh, pose néanmoins plusieurs questions importantes à formuler : les fibroblastes « dits de poumons sains » sont ceux extraits au pourtour de lésions tumorales qui ont fait l'objet d'une exérèse chirurgicale, la prolifération de ces fibroblastes est plus rapide que les CSMh conduisant à une confluence plus précoce et donc à une inhibition de contact liée à l'acquisition d'un phénotype quiescent. Afin de pallier ce problème avec les CSMh, nous les avons changés à 6 jours de culture. Une prolifération plus rapide impliquerait un changement plus rapide des cellules en fonds de puits voire d'autres modalités d'inhibition de prolifération comme l'irradiation des cellules... Quoiqu'il en soit, il serait bien sûr intéressant de comparer l'effet des CSM à celui des fibroblastes « sains » mais surtout à celui des fibroblastes de fibrose. Nous serions alors confrontés aux difficultés liées

à la grande hétérogénéité des populations fibroblastiques dans le poumon de fibrose (Crestani, Besnard et al. 2013). De plus, alors que l'hypoxie constitue pour des CSM une condition en quelque sorte physiologique permettant d'optimiser leurs propriétés, elle pourrait s'avérer néfaste sur des fibroblastes matures, favorisant leur prolifération et leur transformation myofibroblastique (Hinz, Phan et al. 2012), rendant impossible voire dangereuse toute velléité de thérapie cellulaire avec ces cellules.

Bien que nous ayons été confrontés aux difficultés d'extraction des CEA humaines, il n'en demeure pas moins que la reproduction de ces travaux sur CEA humaines constitue une étape intéressante pour corroborer nos résultats.

La confirmation *in vivo* de ces résultats serait un prolongement élégant de notre travail, qui viendrait également conforter nos hypothèses. La quantification du phénomène de TEM par technique de traçage génétique ciblant les CEA pourrait être faite dans un modèle murin de fibrose à la bléomycine avec des animaux exposés ou non à l'hypoxie. Les CSM humaines pourraient être administrées (par voie trachéale ou vasculaire) dans ce modèle afin d'estimer leur influence éventuelle sur ce phénomène de TEM. Ces résultats viendraient alors appuyer le rôle protecteur des CSM notamment dans des situations d'hypoxie, telles que les épisodes de détérioration respiratoire de toute cause et notamment les épisodes d'exacerbation aiguë, qui grèvent actuellement le pronostic des patients ayant une FPI.

Enfin, dans la perspective de se rapprocher davantage de la clinique, une autre approche serait l'évaluation des effets *in vitro* de l'hypoxie intermittente sur les phénomènes décrits dans ce travail en hypoxie continue. Cette hypoxie intermittente mimerait les phénomènes d'hypoxie intermittente nocturne liés à un syndrome d'apnée obstructive du sommeil, dont l'incidence est augmentée au cours de la FPI (Mermigkis, Chapman et al. 2007; Lancaster, Mason et al. 2009; Schiza, Mermigkis et al. 2015). L'étude des effets de l'hypoxie intermittente sur le phénotype des CSM serait couplée à l'analyse du phénotype et des propriétés profibrosantes des CEA dans ce contexte.

Ces différentes approches viendraient corroborer notre hypothèse initiale axée sur le rôle de l'hypoxie dans la fibrogénèse et sur les effets cytoprotecteurs des CSM dans ce contexte, encourageant la thérapie cellulaire au cours de ces pathologies.

RÉFÉRENCES

- (2000). "Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network." N Engl J Med **342**(18): 1301-1308.
- Abe, R., S. C. Donnelly, et al. (2001). "Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites." J Immunol **166**(12): 7556-7562.
- Abreu, S. C., M. A. Antunes, et al. (2011). "Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases." Intensive Care Med **37**(9): 1421-1431.
- Acloque, H., M. S. Adams, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." J Clin Invest **119**(6): 1438-1449.
- Adamson, I. Y., C. Hedgecock, et al. (1990). "Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair." Am J Pathol **137**(2): 385-392.
- Adamson, I. Y. and G. M. King (1984). "Sex differences in development of fetal rat lung. I. Autoradiographic and biochemical studies." Lab Invest **50**(4): 456-460.
- Adamson, I. Y. and G. M. King (1984). "Sex differences in development of fetal rat lung. II. Quantitative morphology of epithelial-mesenchymal interactions." Lab Invest **50**(4): 461-468.
- Adamson, I. Y., L. Young, et al. (1988). "Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis." Am J Pathol **130**(2): 377-383.
- Ahluwalia, N., B. S. Shea, et al. (2014). "New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses." Am J Respir Crit Care Med **190**(8): 867-878.
- Alvarez, D., M. Levine, et al. (2015). "Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position." Stem Cells Cloning **8**: 61-65.
- Amariglio, N., A. Hirshberg, et al. (2009). "Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient." PLoS Med **6**(2): e1000029.
- Andersson-Sjoland, A., C. G. de Alba, et al. (2008). "Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis." Int J Biochem Cell Biol **40**(10): 2129-2140.
- Andersson-Sjoland, A., K. Nihlberg, et al. (2011). "Fibrocytes and the tissue niche in lung repair." Respir Res **12**: 76.
- Annane, D., V. Sebille, et al. (2002). "Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock." JAMA **288**(7): 862-871.
- Antoniades, H. N., M. A. Bravo, et al. (1990). "Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis." J Clin Invest **86**(4): 1055-1064.
- Aoyagi-Ikeda, K., T. Maeno, et al. (2011). "Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor- β -Smad3 pathway." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(1): 136-144.
- Armanios, M. Y., J. J. Chen, et al. (2007). "Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **356**(13): 1317-1326.

- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, et al. (1967). "Acute respiratory distress in adults." Lancet **2**(7511): 319-323.
- Aslam, M., R. Baveja, et al. (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease." Am J Respir Crit Care Med **180**(11): 1122-1130.
- Attili, A. K., E. A. Kazerooni, et al. (2008). "Smoking-related interstitial lung disease: radiologic-clinical-pathologic correlation." Radiographics **28**(5): 1383-1396; discussion 1396-1388.
- Badri, L., S. Murray, et al. (2011). "Mesenchymal stromal cells in bronchoalveolar lavage as predictors of bronchiolitis obliterans syndrome." Am J Respir Crit Care Med **183**(8): 1062-1070.
- Badri, L., N. M. Walker, et al. (2011). "Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(4): 809-816.
- Bajwa, E. K., N. T. Ayas, et al. (2005). "Interferon-gamma1b therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: a metaanalysis." Chest **128**(1): 203-206.
- Barbas-Filho, J. V., M. A. Ferreira, et al. (2001). "Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP)." J Clin Pathol **54**(2): 132-138.
- Barkauskas, C. E., M. J. Counce, et al. (2013). "Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung." J Clin Invest **123**(7): 3025-3036.
- Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-3161.
- Barth, K., R. Blasche, et al. (2006). "Lack of evidence for caveolin-1 and CD147 interaction before and after bleomycin-induced lung injury." Histochem Cell Biol **126**(5): 563-573.
- Basset, G., C. Crone, et al. (1987). "Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium." J Physiol **384**: 325-345.
- Basset, G., C. Crone, et al. (1987). "Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung." J Physiol **384**: 311-324.
- Bauman, K. A., S. H. Wettlaufer, et al. (2010). "The antifibrotic effects of plasminogen activation occur via prostaglandin E2 synthesis in humans and mice." J Clin Invest **120**(6): 1950-1960.
- Beeh, K. M., J. Beier, et al. (2002). "Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Eur Respir J **19**(6): 1119-1123.
- Beers, M. F., C. Y. Kim, et al. (1994). "Localization, synthesis, and processing of surfactant protein SP-C in rat lung analyzed by epitope-specific antipeptide antibodies." J Biol Chem **269**(32): 20318-20328.
- Beers, M. F. and E. E. Morrisey (2011). "The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration." J Clin Invest **121**(6): 2065-2073.
- Bell, E. L., T. A. Klimova, et al. (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia." Mol Cell Biol **27**(16): 5737-5745.
- Bellingan, G., H. Montgomery, et al. (2014). "Use of interferon beta for acute respiratory distress syndrome: proceed with caution--authors' reply." Lancet Respir Med **2**(4): e2-3.
- Bernard, G. R., A. Artigas, et al. (1994). "The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination." Am J Respir Crit Care Med **149**(3 Pt 1): 818-824.

- Bernard, G. R., J. M. Luce, et al. (1987). "High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome." N Engl J Med **317**(25): 1565-1570.
- Berra, E., E. Benizri, et al. (2003). "HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia." EMBO J **22**(16): 4082-4090.
- Bhattacharya, J. and M. A. Matthay (2013). "Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury." Annu Rev Physiol **75**: 593-615.
- Bolanos, A. L., C. M. Milla, et al. (2012). "Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(11): L978-990.
- Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., et al. (1987). "Early methylprednisolone treatment for septic syndrome and the adult respiratory distress syndrome." Chest **92**(6): 1032-1036.
- Bonnaud, P., P. J. Margetts, et al. (2005). "TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis." J Immunol **175**(8): 5390-5395.
- Bonnaud, P., P. J. Margetts, et al. (2005). "Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor." Am J Respir Crit Care Med **171**(8): 889-898.
- Borie, R., C. Quesnel, et al. (2013). "Detection of alveolar fibrocytes in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis." PLoS One **8**(1): e53736.
- Borok, Z., R. Buhl, et al. (1991). "Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis." Lancet **338**(8761): 215-216.
- Borok, Z., S. I. Danto, et al. (1998). "Na(+)-K(+)-ATPase expression in alveolar epithelial cells: upregulation of active ion transport by KGF." Am J Physiol **274**(1 Pt 1): L149-158.
- Borok, Z., A. Gillissen, et al. (1991). "Augmentation of functional prostaglandin E levels on the respiratory epithelial surface by aerosol administration of prostaglandin E." Am Rev Respir Dis **144**(5): 1080-1084.
- Boutet, A., C. A. De Frutos, et al. (2006). "Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney." EMBO J **25**(23): 5603-5613.
- Bouvry, D., C. Planes, et al. (2006). "Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(5): 519-527.
- Bove, P. F., M. Hristova, et al. (2008). "Inflammatory levels of nitric oxide inhibit airway epithelial cell migration by inhibition of the kinase ERK1/2 and activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha." J Biol Chem **283**(26): 17919-17928.
- Brown, L. M., C. S. Calfee, et al. (2011). "A simple classification model for hospital mortality in patients with acute lung injury managed with lung protective ventilation." Crit Care Med **39**(12): 2645-2651.
- Brunelle, J. K., E. L. Bell, et al. (2005). "Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation." Cell Metab **1**(6): 409-414.
- Bruno, S., C. Grange, et al. (2009). "Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury." J Am Soc Nephrol **20**(5): 1053-1067.
- Bucala, R., L. A. Spiegel, et al. (1994). "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." Mol Med **1**(1): 71-81.

- Budinger, G. R., G. M. Mutlu, et al. (2011). "Epithelial cell death is an important contributor to oxidant-mediated acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **183**(8): 1043-1054.
- Bustos, M. L., L. Huleihel, et al. (2014). "Aging mesenchymal stem cells fail to protect because of impaired migration and antiinflammatory response." Am J Respir Crit Care Med **189**(7): 787-798.
- Calfee, C. S., M. A. Matthay, et al. (2011). "Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma." Am J Respir Crit Care Med **183**(12): 1660-1665.
- Camelo, A., R. Dunmore, et al. (2014). "The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: breaking the barrier." Front Pharmacol **4**: 173.
- Canessa, C. M., J. D. Horisberger, et al. (1993). "Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration." Nature **361**(6411): 467-470.
- Canessa, C. M., L. Schild, et al. (1994). "Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits." Nature **367**(6462): 463-467.
- Cargnoni, A., L. Gibelli, et al. (2009). "Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis." Cell Transplant **18**(4): 405-422.
- Castanon, I. and M. K. Baylies (2002). "A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function." Gene **287**(1-2): 11-22.
- Castro, C. Y. (2006). "ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective." Semin Thorac Cardiovasc Surg **18**(1): 13-19.
- Ceradini, D. J. and G. C. Gurtner (2005). "Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue." Trends Cardiovasc Med **15**(2): 57-63.
- Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-2749.
- Chambers, D. C., D. Enever, et al. (2014). "A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Respirology **19**(7): 1013-1018.
- Chambers, R. C. (2008). "Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention?" Br J Pharmacol **153** Suppl 1: S367-378.
- Chandel, N. S. (2002). "Detection of oxygen-sensing properties of mitochondria." Methods Enzymol **352**: 31-40.
- Chandel, N. S. (2010). "Mitochondrial complex III: an essential component of universal oxygen sensing machinery?" Respir Physiol Neurobiol **174**(3): 175-181.
- Chandel, N. S., G. R. Budinger, et al. (2009). "Keratinocyte growth factor expression is suppressed in early acute lung injury/acute respiratory distress syndrome by smad and c-Abl pathways." Crit Care Med **37**(5): 1678-1684.
- Chandel, N. S., E. Maltepe, et al. (1998). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11715-11720.
- Chandel, N. S. and J. I. Sznajder (2000). "Stretching the lung and programmed cell death." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1003-1004.
- Chapman, H. A. (2011). "Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis." Annu Rev Physiol **73**: 413-435.

- Chen, J., Z. Chen, et al. (2004). "Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs." Lab Invest **84**(6): 727-735.
- Chen, X. J., D. C. Eaton, et al. (2002). "Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(4): L609-620.
- Chilosi, M., V. Poletti, et al. (2002). "Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63." Lab Invest **82**(10): 1335-1345.
- Chilosi, M., V. Poletti, et al. (2003). "Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Pathol **162**(5): 1495-1502.
- Chiumello, D., M. Cressoni, et al. (2014). "Bedside selection of positive end-expiratory pressure in mild, moderate, and severe acute respiratory distress syndrome." Crit Care Med **42**(2): 252-264.
- Christie, J. D., M. M. Wurfel, et al. (2012). "Genome wide association identifies PPF1A1 as a candidate gene for acute lung injury risk following major trauma." PLoS One **7**(1): e28268.
- Clerici, C. and C. Planes (2009). "Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(3): L267-274.
- Cohen, A. W., R. Hnasko, et al. (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease." Physiol Rev **84**(4): 1341-1379.
- Collard, H. R., B. B. Moore, et al. (2007). "Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **176**(7): 636-643.
- Collino, F., S. Bruno, et al. (2015). "AKI Recovery Induced by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Carrying MicroRNAs." J Am Soc Nephrol.
- Collino, F., M. C. Deregibus, et al. (2010). "Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs." PLoS One **5**(7): e11803.
- Colombat, M., H. Mal, et al. (2007). "Pulmonary vascular lesions in end-stage idiopathic pulmonary fibrosis: Histopathologic study on lung explant specimens and correlations with pulmonary hemodynamics." Hum Pathol **38**(1): 60-65.
- Comellas, A. P., L. A. Dada, et al. (2006). "Hypoxia-mediated degradation of Na,K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system." Circ Res **98**(10): 1314-1322.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, et al. (2003). "Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha." Cardiovasc Res **60**(3): 569-579.
- Cooke, C. R., J. M. Kahn, et al. (2008). "Predictors of hospital mortality in a population-based cohort of patients with acute lung injury." Crit Care Med **36**(5): 1412-1420.
- Cool, C. D., S. D. Groshong, et al. (2006). "Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum." Am J Respir Crit Care Med **174**(6): 654-658.
- Crapo, J. D., B. E. Barry, et al. (1982). "Cell number and cell characteristics of the normal human lung." Am Rev Respir Dis **126**(2): 332-337.
- Crestani, B., V. Besnard, et al. (2013). "Fibroblasts: the missing link between fibrotic lung diseases of different etiologies?" Respir Res **14**: 81.

- Crestani, B., S. Marchand-Adam, et al. (2012). "Hepatocyte growth factor and lung fibrosis." Proc Am Thorac Soc **9**(3): 158-163.
- Crisostomo, P. R., Y. Wang, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism." Am J Physiol Cell Physiol **294**(3): C675-682.
- Crosby, L. M. and C. M. Waters (2010). "Epithelial repair mechanisms in the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(6): L715-731.
- Cuiffo, B. G. and A. E. Karnoub (2012). "Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts." Cell Adh Migr **6**(3): 220-230.
- Curley, G. F. and D. F. McAuley (2014). "Clinical trial design in prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome." Clin Chest Med **35**(4): 713-727.
- Dada, L. A. and J. I. Sznajder (2003). "Mechanisms of pulmonary edema clearance during acute hypoxemic respiratory failure: role of the Na,K-ATPase." Crit Care Med **31**(4 Suppl): S248-252.
- Daniels, C. E., J. A. Lasky, et al. (2010). "Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results." Am J Respir Crit Care Med **181**(6): 604-610.
- Daniels, C. E., E. S. Yi, et al. (2008). "Autopsy findings in 42 consecutive patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Eur Respir J **32**(1): 170-174.
- Dave, N., S. Guaita-Esteruelas, et al. (2011). "Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition." J Biol Chem **286**(14): 12024-12032.
- Davidovich, N., B. C. DiPaolo, et al. (2013). "Cyclic stretch-induced oxidative stress increases pulmonary alveolar epithelial permeability." Am J Respir Cell Mol Biol **49**(1): 156-164.
- De Craene, B. and G. Berx (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." Nat Rev Cancer **13**(2): 97-110.
- Decolgne, N., M. Kolb, et al. (2007). "TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis." J Immunol **179**(9): 6043-6051.
- Decolgne, N., G. Wettstein, et al. (2010). "Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles." Eur Respir J **35**(1): 176-185.
- Degryse, A. L., H. Tanjore, et al. (2011). "TGFbeta signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(6): L887-897.
- 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.
- Deiuliis, J., Z. Shah, et al. (2011). "Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers." PLoS One **6**(1): e16376.
- DeMaio, L., S. T. Buckley, et al. (2012). "Ligand-independent transforming growth factor-beta type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition." J Pathol **226**(4): 633-644.
- Desai, T. J., D. G. Brownfield, et al. (2014). "Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer." Nature **507**(7491): 190-194.

- Diaz de Leon, A., J. T. Cronkhite, et al. (2010). "Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations." PLoS One **5**(5): e10680.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Drab, M., P. Verkade, et al. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science **293**(5539): 2449-2452.
- du Bois, R. M. (2010). "Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis." Nat Rev Drug Discov **9**(2): 129-140.
- du Bois, R. M., D. Weycker, et al. (2011). "Ascertainment of individual risk of mortality for patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **184**(4): 459-466.
- Duffield, J. S., M. Lupher, et al. (2013). "Host responses in tissue repair and fibrosis." Annu Rev Pathol **8**: 241-276.
- Eaton, D. C., M. N. Helms, et al. (2009). "The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease." Annu Rev Physiol **71**: 403-423.
- Egan, J. J., F. J. Martinez, et al. (2005). "Lung function estimates in idiopathic pulmonary fibrosis: the potential for a simple classification." Thorax **60**(4): 270-273.
- Egli, M., H. Duplain, et al. (2004). "Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice." J Physiol **560**(Pt 3): 857-865.
- Elvidge, G. P., L. Glenny, et al. (2006). "Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways." J Biol Chem **281**(22): 15215-15226.
- Englert, J. M., L. E. Hanford, et al. (2008). "A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Pathol **172**(3): 583-591.
- Erickson, S. E., G. S. Martin, et al. (2009). "Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005." Crit Care Med **37**(5): 1574-1579.
- Erickson, S. E., M. G. Shlipak, et al. (2009). "Racial and ethnic disparities in mortality from acute lung injury." Crit Care Med **37**(1): 1-6.
- Falk, M. M. (2000). "Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels." Eur J Cell Biol **79**(8): 564-574.
- Fang, X., A. P. Neyrinck, et al. (2010). "Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1." J Biol Chem **285**(34): 26211-26222.
- Fehrenbach, A., M. Ochs, et al. (2000). "Beneficial effect of lung preservation is related to ultrastructural integrity of tubular myelin after experimental ischemia and reperfusion." Am J Respir Crit Care Med **161**(6): 2058-2065.
- Fehrer, C., R. Brunauer, et al. (2007). "Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan." Aging Cell **6**(6): 745-757.
- Feinman, R., E. A. Deitch, et al. (2010). "HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **299**(4): G833-843.

- Felton, V. M., Z. Borok, et al. (2009). "N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(5): L805-812.
- Fernandez Perez, E. R., C. E. Daniels, et al. (2010). "Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study." Chest **137**(1): 129-137.
- Filippatos, G. S., W. F. Hughes, et al. (1997). "Mechanisms of liquid flux across pulmonary alveolar epithelial cell monolayers." In Vitro Cell Dev Biol Anim **33**(3): 195-200.
- Fingerlin, T. E., E. Murphy, et al. (2013). "Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis." Nat Genet **45**(6): 613-620.
- Firsov, D., I. Gautschi, et al. (1998). "The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC)." EMBO J **17**(2): 344-352.
- Flaherty, K. R., T. V. Colby, et al. (2003). "Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1410-1415.
- Flori, H. R., D. V. Glidden, et al. (2005). "Pediatric acute lung injury: prospective evaluation of risk factors associated with mortality." Am J Respir Crit Care Med **171**(9): 995-1001.
- Folkesson, H. G., S. R. Kuzenko, et al. (2012). "The adenosine 2A receptor agonist GW328267C improves lung function after acute lung injury in rats." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(3): L259-271.
- Frank, J. A., J. F. Pittet, et al. (2008). "Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade." Thorax **63**(2): 147-153.
- Frank, J. A., C. M. Wray, et al. (2006). "Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(6): L1191-1198.
- Friedenstein, A. Y., R. I. Rapoport, et al. (1968). "Histotypical structures arising in diploid human strains in organ cultures." Exp Cell Res **49**(3): 488-494.
- Fukuda, R., B. Kelly, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1." Cancer Res **63**(9): 2330-2334.
- Galambos, C., H. Levy, et al. (2010). "Pulmonary pathology in thyroid transcription factor-1 deficiency syndrome." Am J Respir Crit Care Med **182**(4): 549-554.
- Gao, J., J. E. Dennis, et al. (2001). "The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion." Cells Tissues Organs **169**(1): 12-20.
- Gao, L. and K. C. Barnes (2009). "Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(5): L713-725.
- Garcia-Sancho, C., I. Buendia-Roldan, et al. (2011). "Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis." Respir Med **105**(12): 1902-1907.
- Garrean, S., X. P. Gao, et al. (2006). "Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide." J Immunol **177**(7): 4853-4860.
- Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev (2007). "beta-Catenin signaling in biological control and cancer." J Cell Biochem **102**(4): 820-828.

- Geiser, T., K. Atabai, et al. (2001). "Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments in vitro alveolar epithelial repair by an IL-1beta-dependent mechanism." Am J Respir Crit Care Med **163**(6): 1384-1388.
- Geiser, T., M. Ishigaki, et al. (2004). "H₂O₂ inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(2): L448-453.
- Gille, T., N. Randrianarison-Pellan, et al. (2014). "Hypoxia-induced inhibition of epithelial Na⁺ channels in the lung. Role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway." Am J Respir Cell Mol Biol **50**(3): 526-537.
- Glavan, B. J., T. D. Holden, et al. (2011). "Genetic variation in the FAS gene and associations with acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **183**(3): 356-363.
- Goolaerts, A., M. Lafargue, et al. (2011). "PAI-1 is an essential component of the pulmonary host response during Pseudomonas aeruginosa pneumonia in mice." Thorax **66**(9): 788-796.
- Goolaerts, A., N. Pellan-Randrianarison, et al. (2014). "Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **306**(11): L975-985.
- Gotts, J. E. and M. A. Matthay (2011). "Mesenchymal stem cells and acute lung injury." Crit Care Clin **27**(3): 719-733.
- Gotts, J. E. and M. A. Matthay (2014). "Endogenous and exogenous cell-based pathways for recovery from acute respiratory distress syndrome." Clin Chest Med **35**(4): 797-809.
- Gribbin, J., R. B. Hubbard, et al. (2006). "Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK." Thorax **61**(11): 980-985.
- Groenman, F., M. Rutter, et al. (2007). "Hypoxia-inducible factors in the first trimester human lung." J Histochem Cytochem **55**(4): 355-363.
- Guerin, C., J. Reignier, et al. (2013). "Prone positioning in the acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **369**(10): 980-981.
- Guery, B. P., C. M. Mason, et al. (1997). "Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs." Am J Respir Crit Care Med **155**(5): 1777-1784.
- Gupta, N., A. Krasnodembskaya, et al. (2012). "Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine Escherichia coli pneumonia." Thorax **67**(6): 533-539.
- Gupta, N., X. Su, et al. (2007). "Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice." J Immunol **179**(3): 1855-1863.
- Haase, V. H. (2009). "Pathophysiological Consequences of HIF Activation: HIF as a modulator of fibrosis." Ann N Y Acad Sci **1177**: 57-65.
- Hagimoto, N., K. Kuwano, et al. (2002). "TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells." J Immunol **168**(12): 6470-6478.
- Hagimoto, N., K. Kuwano, et al. (1997). "Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(3): 272-278.

- Hagimoto, N., K. Kuwano, et al. (1997). "Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **16**(1): 91-101.
- Hanze, J., B. G. Eul, et al. (2003). "RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation." Biochem Biophys Res Commun **312**(3): 571-577.
- Harada, T., K. Nabeshima, et al. (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in human lungs with usual interstitial pneumonia: quantitative immunohistochemistry." Pathol Int **60**(1): 14-21.
- Hare, J. M. and S. V. Chaparro (2008). "Cardiac regeneration and stem cell therapy." Curr Opin Organ Transplant **13**(5): 536-542.
- Hare, J. M., J. E. Fishman, et al. (2012). "Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial." JAMA **308**(22): 2369-2379.
- Hashimoto, N., H. Jin, et al. (2004). "Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis." J Clin Invest **113**(2): 243-252.
- Hashimoto, N., S. H. Phan, et al. (2010). "Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(2): 161-172.
- Hay, E. D. (1995). "An overview of epithelio-mesenchymal transformation." Acta Anat (Basel) **154**(1): 8-20.
- Heldman, A. W., D. L. DiFede, et al. (2014). "Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial." JAMA **311**(1): 62-73.
- Herold, S., N. M. Gabrielli, et al. (2013). "Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **305**(10): L665-681.
- Herzog, E. L., A. R. Brody, et al. (2008). "Knowns and unknowns of the alveolus." Proc Am Thorac Soc **5**(7): 778-782.
- Hickey, M. M., T. Richardson, et al. (2010). "The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice." J Clin Invest **120**(3): 827-839.
- Higgins, D. F., K. Kimura, et al. (2007). "Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition." J Clin Invest **117**(12): 3810-3820.
- Higgins, D. F., K. Kimura, et al. (2008). "Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis." Cell Cycle **7**(9): 1128-1132.
- Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2012). "Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling." Am J Pathol **180**(4): 1340-1355.
- Hodgson, U., V. Pulkkinen, et al. (2006). "ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Hum Genet **79**(1): 149-154.
- Horan, G. S., S. Wood, et al. (2008). "Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation." Am J Respir Crit Care Med **177**(1): 56-65.
- Horowitz, J. C. and V. J. Thannickal (2006). "Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis." Semin Respir Crit Care Med **27**(6): 600-612.
- Hough, C. L. (2014). "Steroids for acute respiratory distress syndrome?" Clin Chest Med **35**(4): 781-795.

- Hu, C. J., L. Y. Wang, et al. (2003). "Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation." Mol Cell Biol **23**(24): 9361-9374.
- Hu, G., R. D. Ye, et al. (2008). "Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(2): L178-186.
- Hu, S. L., H. S. Luo, et al. (2010). "Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells." Crit Care Med **38**(11): 2181-2189.
- Hummler, E., P. Barker, et al. (1996). "Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice." Nat Genet **12**(3): 325-328.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.
- Inomata, M., K. Kamio, et al. (2014). "Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis." Respir Res **15**: 16.
- Ionescu, L., R. N. Byrne, et al. (2012). "Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(11): L967-977.
- Isaacs, J. S., Y. J. Jung, et al. (2005). "HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability." Cancer Cell **8**(2): 143-153.
- Islam, M. N., S. R. Das, et al. (2012). "Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury." Nat Med **18**(5): 759-765.
- Iwano, M., D. Plieth, et al. (2002). "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis." J Clin Invest **110**(3): 341-350.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." Genes Dev **12**(2): 149-162.
- Iyer, S. N., J. S. Wild, et al. (1995). "Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters." J Lab Clin Med **125**(6): 779-785.
- Janda, E., K. Lehmann, et al. (2002). "Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways." J Cell Biol **156**(2): 299-313.
- Jiang, B. H., G. L. Semenza, et al. (1996). "Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): C1172-1180.
- Jin, H. L. and J. C. Dong (2011). "Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: from initial apoptosis of epithelial cells to lung remodeling?" Chin Med J (Engl) **124**(24): 4330-4338.
- Johnson, D. and E. S. Bennett (2006). "Isoform-specific effects of the beta2 subunit on voltage-gated sodium channel gating." J Biol Chem **281**(36): 25875-25881.
- Johnson, M. D., J. H. Widdicombe, et al. (2002). "Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1966-1971.
- Kaelin, W. G., Jr. and P. J. Ratcliffe (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." Mol Cell **30**(4): 393-402.
- Kage, H. and Z. Borok (2012). "EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship." Curr Opin Pulm Med **18**(5): 517-523.

- Kalluri, R. and E. G. Neilson (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." J Clin Invest **112**(12): 1776-1784.
- Kangelaris, K. N., A. Sapru, et al. (2012). "The association between a Darc gene polymorphism and clinical outcomes in African American patients with acute lung injury." Chest **141**(5): 1160-1169.
- Kao, W. W. and D. J. Prockop (1977). "Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations." Nature **266**(5597): 63-64.
- Kapetanaki, M. G., A. L. Mora, et al. (2013). "Influence of age on wound healing and fibrosis." J Pathol **229**(2): 310-322.
- Kasper, M., T. Reimann, et al. (1998). "Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis." Histochem Cell Biol **109**(1): 41-48.
- Kaufman, R. J. (2002). "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease." J Clin Invest **110**(10): 1389-1398.
- Kaufman, R. J., D. Scheuner, et al. (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 411-421.
- Kaunisto, J., E. R. Salomaa, et al. (2013). "Idiopathic pulmonary fibrosis--a systematic review on methodology for the collection of epidemiological data." BMC Pulm Med **13**: 53.
- Keating, A. (2012). "Mesenchymal stromal cells: new directions." Cell Stem Cell **10**(6): 709-716.
- Ketai, L. H. and J. D. Godwin (1998). "A new view of pulmonary edema and acute respiratory distress syndrome." J Thorac Imaging **13**(3): 147-171.
- Khalil, N., R. N. O'Connor, et al. (1996). "TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(2): 131-138.
- Khurana, P., R. Sugadev, et al. (2013). "HypoxiaDB: a database of hypoxia-regulated proteins." Database (Oxford) **2013**: bat074.
- Kim, C. F., E. L. Jackson, et al. (2005). "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer." Cell **121**(6): 823-835.
- Kim, J. W., I. Tchernyshyov, et al. (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." Cell Metab **3**(3): 177-185.
- Kim, K. K., M. C. Kugler, et al. (2006). "Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13180-13185.
- Kim, K. K., Y. Wei, et al. (2009). "Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis." J Clin Invest **119**(1): 213-224.
- Kim, W. Y., S. Perera, et al. (2009). "HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice." J Clin Invest **119**(8): 2160-2170.
- Kimura, H., A. Weisz, et al. (2000). "Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide." Blood **95**(1): 189-197.

- King, T. E., Jr., K. K. Brown, et al. (2011). "BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **184**(1): 92-99.
- King, T. E., Jr., A. Pardo, et al. (2011). "Idiopathic pulmonary fibrosis." Lancet **378**(9807): 1949-1961.
- King, T. E., Jr., M. I. Schwarz, et al. (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality." Am J Respir Crit Care Med **164**(6): 1025-1032.
- Kinnula, V. L. (2008). "Redox imbalance and lung fibrosis." Antioxid Redox Signal **10**(2): 249-252.
- Kinnula, V. L., C. L. Fattman, et al. (2005). "Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy." Am J Respir Crit Care Med **172**(4): 417-422.
- Kinnula, V. L. and M. Myllarniemi (2008). "Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis." Antioxid Redox Signal **10**(4): 727-738.
- Kistler, K. D., L. Nalysnyk, et al. (2014). "Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review of the literature." BMC Pulm Med **14**: 139.
- Koli, K., M. Myllarniemi, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta activation in the lung: focus on fibrosis and reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **10**(2): 333-342.
- Kolodsick, J. E., M. Peters-Golden, et al. (2003). "Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(5): 537-544.
- Konigshoff, M., N. Balsara, et al. (2008). "Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis." PLoS One **3**(5): e2142.
- Konigshoff, M. and O. Eickelberg (2010). "WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal?" Am J Respir Cell Mol Biol **42**(1): 21-31.
- Konigshoff, M., M. Kramer, et al. (2009). "WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis." J Clin Invest **119**(4): 772-787.
- Korfei, M., C. Ruppert, et al. (2008). "Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **178**(8): 838-846.
- Kotani, I., A. Sato, et al. (1995). "Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis." Thromb Res **77**(6): 493-504.
- Kotton, D. N., A. J. Fabian, et al. (2005). "Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(4): 328-334.
- Kotton, D. N., B. Y. Ma, et al. (2001). "Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium." Development **128**(24): 5181-5188.
- Koury, J., E. A. Deitch, et al. (2004). "Persistent HIF-1alpha activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide." Shock **22**(3): 270-277.
- Kovacs, D., S. Raffa, et al. (2009). "Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB." J Dermatol Sci **54**(2): 106-113.
- Koval, M. (2013). "Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions." Annu Rev Physiol **75**: 551-567.

- Krasnodembskaya, A., G. Samarani, et al. (2012). "Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**(10): L1003-1013.
- Krasnodembskaya, A., Y. Song, et al. (2010). "Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37." *Stem Cells* **28**(12): 2229-2238.
- Krause, D. S., N. D. Theise, et al. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." *Cell* **105**(3): 369-377.
- Krick, S., B. G. Eul, et al. (2005). "Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**(5): 395-403.
- Kuwano, K., R. Kunitake, et al. (1996). "P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **154**(2 Pt 1): 477-483.
- Kuwano, K., R. Kunitake, et al. (2001). "Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(2): L316-325.
- Kuwano, K., N. Nakashima, et al. (2003). "Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias." *Eur Respir J* **21**(2): 232-240.
- Lam, C. F., Y. C. Liu, et al. (2008). "Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits." *Anesthesiology* **108**(3): 392-401.
- Lama, V., B. B. Moore, et al. (2002). "Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent." *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**(6): 752-758.
- Lama, V. N. and S. H. Phan (2006). "The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond." *Proc Am Thorac Soc* **3**(4): 373-376.
- Lama, V. N., L. Smith, et al. (2007). "Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts." *J Clin Invest* **117**(4): 989-996.
- Lamouille, S., J. Xu, et al. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(3): 178-196.
- Lan, Y. W., K. B. Choo, et al. (2015). "Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Stem Cell Res Ther* **6**(1): 97.
- Lancaster, L. H., W. R. Mason, et al. (2009). "Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis." *Chest* **136**(3): 772-778.
- Lawson, W. E., D. S. Cheng, et al. (2011). "Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(26): 10562-10567.
- Lawson, W. E., P. F. Crossno, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(6): L1119-1126.
- Lawson, W. E., J. E. Loyd, et al. (2011). "Genetics in pulmonary fibrosis--familial cases provide clues to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Med Sci* **341**(6): 439-443.
- Le Blanc, K. (2003). "Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells." *Cytotherapy* **5**(6): 485-489.

- Le Blanc, K., F. Frassoni, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." Lancet **371**(9624): 1579-1586.
- Lecuona, E., H. Sun, et al. (2013). "Protein kinase A- α regulates Na,K-ATPase endocytosis in alveolar epithelial cells exposed to high CO₂ concentrations." Am J Respir Cell Mol Biol **48**(5): 626-634.
- Lee, C. G., S. J. Cho, et al. (2004). "Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis." J Exp Med **200**(3): 377-389.
- Lee, J. M., W. Bae, et al. (2014). "The efficacy and safety of prone positional ventilation in acute respiratory distress syndrome: updated study-level meta-analysis of 11 randomized controlled trials." Crit Care Med **42**(5): 1252-1262.
- Lee, J. S., H. R. Collard, et al. (2013). "Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of data from three randomised controlled trials." Lancet Respir Med **1**(5): 369-376.
- Lee, J. S., H. R. Collard, et al. (2010). "Does chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis?" Am J Med **123**(4): 304-311.
- Lee, J. W., X. Fang, et al. (2007). "Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells." J Biol Chem **282**(33): 24109-24119.
- Lee, J. W., X. Fang, et al. (2009). "Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16357-16362.
- Lee, J. W., X. Fang, et al. (2011). "Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors." Stem Cells **29**(6): 913-919.
- Lee, J. W., A. Krasnodembskaya, et al. (2013). "Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in ex vivo human lungs injured with live bacteria." Am J Respir Crit Care Med **187**(7): 751-760.
- Lee, S. H., A. S. Jang, et al. (2010). "Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis." Respir Res **11**: 16.
- Lepperdinger, G., R. Brunauer, et al. (2008). "Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies?" Exp Gerontol **43**(11): 1018-1023.
- Leslie, K. O. (2012). "Idiopathic pulmonary fibrosis may be a disease of recurrent, tractional injury to the periphery of the aging lung: a unifying hypothesis regarding etiology and pathogenesis." Arch Pathol Lab Med **136**(6): 591-600.
- Ley, B. and H. R. Collard (2013). "Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis." Clin Epidemiol **5**: 483-492.
- Ley, B., C. J. Ryerson, et al. (2012). "A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis." Ann Intern Med **156**(10): 684-691.
- Li, G., M. Malinchoc, et al. (2011). "Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota." Am J Respir Crit Care Med **183**(1): 59-66.
- Li, M., M. S. Krishnaveni, et al. (2011). "Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis." J Clin Invest **121**(1): 277-287.
- Li, X., Y. Zhang, et al. (2014). "Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage." Am J Respir Cell Mol Biol **51**(3): 455-465.

- Lin, X., C. A. David, et al. (2008). "A chemical genomics screen highlights the essential role of mitochondria in HIF-1 regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 174-179.
- Liu, K. D., D. V. Glidden, et al. (2007). "Predictive and pathogenetic value of plasma biomarkers for acute kidney injury in patients with acute lung injury." Crit Care Med **35**(12): 2755-2761.
- Liu, P., M. Rudick, et al. (2002). "Multiple functions of caveolin-1." J Biol Chem **277**(44): 41295-41298.
- Lo, H. W., S. C. Hsu, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression." Cancer Res **67**(19): 9066-9076.
- Loffing-Cueni, D., S. Y. Flores, et al. (2006). "Dietary sodium intake regulates the ubiquitin-protein ligase nedd4-2 in the renal collecting system." J Am Soc Nephrol **17**(5): 1264-1274.
- Lopez-Garcia, C., A. M. Klein, et al. (2010). "Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift." Science **330**(6005): 822-825.
- Lopez-Novoa, J. M. and M. A. Nieto (2009). "Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression." EMBO Mol Med **1**(6-7): 303-314.
- Lu, H., R. A. Forbes, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis." J Biol Chem **277**(26): 23111-23115.
- Luo, F., X. Liu, et al. (2006). "Hypoxia-inducible transcription factor-1alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway." BMC Cancer **6**: 26.
- Luo, W., J. Zhong, et al. (2010). "Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha." J Biol Chem **285**(6): 3651-3663.
- Ma, N., H. Gai, et al. (2011). "Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into type II alveolar epithelial cells in vitro." Cell Biol Int **35**(12): 1261-1266.
- Ma, T., N. Fukuda, et al. (2000). "Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice." J Clin Invest **105**(1): 93-100.
- Macias-Barragan, J., A. Sandoval-Rodriguez, et al. (2010). "The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets." Fibrogenesis Tissue Repair **3**: 16.
- Maharaj, S., C. Shimbori, et al. (2013). "Fibrocytes in pulmonary fibrosis: a brief synopsis." Eur Respir Rev **22**(130): 552-557.
- Maher, T. M., I. C. Evans, et al. (2010). "Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **182**(1): 73-82.
- Mairbaur, H., R. Wodopia, et al. (1997). "Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia." Am J Physiol **273**(4 Pt 1): L797-806.
- Maitra, M., Y. Wang, et al. (2010). "Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem **285**(29): 22103-22113.
- Makino, Y., R. Cao, et al. (2001). "Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression." Nature **414**(6863): 550-554.

- Makino, Y., R. Uenishi, et al. (2007). "Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells." J Biol Chem **282**(19): 14073-14082.
- Malik, B., L. Schlanger, et al. (2001). "Enac degradation in A6 cells by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." J Biol Chem **276**(16): 12903-12910.
- Maniatis, N. A., O. Chernaya, et al. (2012). "Caveolins and lung function." Adv Exp Med Biol **729**: 157-179.
- Marik, P. E., S. M. Pastores, et al. (2008). "Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine." Crit Care Med **36**(6): 1937-1949.
- Marmai, C., R. E. Sutherland, et al. (2011). "Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **301**(1): L71-78.
- Martinez, F. J., J. A. de Andrade, et al. (2014). "Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **370**(22): 2093-2101.
- Martinez, F. J., R. F. Grossman, et al. (2005). "Patient stratification in the management of acute bacterial exacerbation of chronic bronchitis: the role of levofloxacin 750 mg." Eur Respir J **25**(6): 1001-1010.
- Mascre, G., S. Dekoninck, et al. (2012). "Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance." Nature **489**(7415): 257-262.
- Masterson, C., M. Jerkic, et al. (2015). "Mesenchymal stromal cell therapies: potential and pitfalls for ARDS." Minerva Anestesiol **81**(2): 179-194.
- Matthay, M. A. (2002). "Alveolar fluid clearance in patients with ARDS: does it make a difference?" Chest **122**(6 Suppl): 340S-343S.
- Matthay, M. A. (2014). "Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress." Am J Respir Crit Care Med **189**(11): 1301-1308.
- Matthay, M. A., C. Clerici, et al. (2002). "Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung." J Appl Physiol (1985) **93**(4): 1533-1541.
- Matthay, M. A., C. C. Landolt, et al. (1982). "Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **53**(1): 96-104.
- Matthay, M. A., L. B. Ware, et al. (2012). "The acute respiratory distress syndrome." J Clin Invest **122**(8): 2731-2740.
- Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman (2005). "Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(4): 319-327.
- Matute-Bello, G., M. M. Wurfel, et al. (2007). "Essential role of MMP-12 in Fas-induced lung fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(2): 210-221.
- McNulty, K. and S. M. Janes (2012). "Stem cells and pulmonary fibrosis: cause or cure?" Proc Am Thorac Soc **9**(3): 164-171.
- Meduri, G. U., A. J. Chinn, et al. (1994). "Corticosteroid rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS. Patterns of response and predictors of outcome." Chest **105**(5): 1516-1527.

- Meduri, G. U., A. S. Headley, et al. (1998). "Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." *JAMA* **280**(2): 159-165.
- Mei, S. H., J. J. Haitsma, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(8): 1047-1057.
- Mei, S. H., S. D. McCarter, et al. (2007). "Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1." *PLoS Med* **4**(9): e269.
- Mercat, A., J. C. Richard, et al. (2008). "Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." *JAMA* **299**(6): 646-655.
- Mermigkis, C., J. Chapman, et al. (2007). "Sleep-related breathing disorders in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." *Lung* **185**(3): 173-178.
- Meyer, N. J., M. Li, et al. (2011). "ANGPT2 genetic variant is associated with trauma-associated acute lung injury and altered plasma angiopoietin-2 isoform ratio." *Am J Respir Crit Care Med* **183**(10): 1344-1353.
- Mias, C., E. Trouche, et al. (2008). "Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney." *Stem Cells* **26**(7): 1749-1757.
- Millar, J. E., J. F. Fraser, et al. (2015). "Mesenchymal stromal cells and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): challenges for clinical application." *Thorax* **70**(7): 611-612.
- Milosevic, J., K. Pandit, et al. (2012). "Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**(6): 879-887.
- Minakata, Y., S. Suzuki, et al. (1998). "Impact of beta-adrenergic agonist on Na⁺ channel and Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar type II cells." *Am J Physiol* **275**(2 Pt 1): L414-422.
- Mizgerd, J. P. (2008). "Acute lower respiratory tract infection." *N Engl J Med* **358**(7): 716-727.
- Moeller, A., S. E. Gilpin, et al. (2009). "Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **179**(7): 588-594.
- Moodley, Y., D. Atienza, et al. (2009). "Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury." *Am J Pathol* **175**(1): 303-313.
- Moore, B. B., R. Paine, 3rd, et al. (2001). "Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling." *J Immunol* **167**(8): 4368-4377.
- Moore, B. B., M. Peters-Golden, et al. (2003). "Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(2): L342-349.
- Morote-Garcia, J. C., P. Rosenberger, et al. (2008). "HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak." *Blood* **111**(12): 5571-5580.
- Morty, R. E. and K. R. Walley (2014). "A step forward toward the clinical application of palifermin for acute respiratory distress syndrome?" *Am J Respir Crit Care Med* **189**(12): 1455-1456.
- Moss, M. and E. L. Burnham (2003). "Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction." *Crit Care Med* **31**(4 Suppl): S207-212.

- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2009). "The regulation of TGFbeta signal transduction." Development **136**(22): 3699-3714.
- Mubarak, K. K., A. Montes-Worboys, et al. (2012). "Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis." Eur Respir J **39**(1): 133-140.
- Mulugeta, S., V. Nguyen, et al. (2005). "A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(6): 521-530.
- Munger, J. S., X. Huang, et al. (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-328.
- Mura, M., M. A. Porretta, et al. (2012). "Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study." Eur Respir J **40**(1): 101-109.
- Murray, J. F., M. A. Matthay, et al. (1988). "An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome." Am Rev Respir Dis **138**(3): 720-723.
- Nakayama, S., H. Mukae, et al. (2008). "Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts." Life Sci **82**(3-4): 210-217.
- Nauta, A. J. and W. E. Fibbe (2007). "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells." Blood **110**(10): 3499-3506.
- Navaratnam, V., K. M. Fleming, et al. (2011). "The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K." Thorax **66**(6): 462-467.
- Nawshad, A., D. Lagamba, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis." Cells Tissues Organs **179**(1-2): 11-23.
- Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, et al. (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production." Nat Med **15**(1): 42-49.
- Nieto, M. A. (2011). "The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 347-376.
- Noble, P. W., C. Albera, et al. (2011). "Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials." Lancet **377**(9779): 1760-1769.
- Nogee, L. M., A. E. Dunbar, 3rd, et al. (2001). "A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease." N Engl J Med **344**(8): 573-579.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-1312.
- Noth, I., K. J. Anstrom, et al. (2012). "A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **186**(1): 88-95.
- Noth, I., Y. Zhang, et al. (2013). "Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study." Lancet Respir Med **1**(4): 309-317.
- Obadina, E. T., J. M. Torrealba, et al. (2013). "Acute pulmonary injury: high-resolution CT and histopathological spectrum." Br J Radiol **86**(1027): 20120614.

- Odajima, N., T. Betsuyaku, et al. (2007). "Loss of caveolin-1 in bronchiolization in lung fibrosis." J Histochem Cytochem **55**(9): 899-909.
- Oga, T., T. Matsuoka, et al. (2009). "Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta." Nat Med **15**(12): 1426-1430.
- Oku, H., T. Shimizu, et al. (2008). "Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis." Eur J Pharmacol **590**(1-3): 400-408.
- Opitz, B., V. van Laak, et al. (2010). "Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung." Am J Respir Crit Care Med **181**(12): 1294-1309.
- Ortiz, L. A., M. Dutreil, et al. (2007). "Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 11002-11007.
- Ortiz, L. A., F. Gambelli, et al. (2003). "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8407-8411.
- Ouiddir, A., C. Planes, et al. (1999). "Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(6): 710-718.
- Pan, L. H., K. Yamauchi, et al. (2001). "Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF." Eur Respir J **17**(6): 1220-1227.
- Pandit, K. V., D. Corcoran, et al. (2010). "Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **182**(2): 220-229.
- Pandit, K. V., J. Milosevic, et al. (2011). "MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis." Transl Res **157**(4): 191-199.
- Panos, R. J., P. M. Bak, et al. (1995). "Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats." J Clin Invest **96**(4): 2026-2033.
- Papazian, L., J. M. Forel, et al. (2010). "Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **363**(12): 1107-1116.
- Peinado, H., M. Del Carmen Iglesias-de la Cruz, et al. (2005). "A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression." EMBO J **24**(19): 3446-3458.
- Peljto, A. L., Y. Zhang, et al. (2013). "Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." JAMA **309**(21): 2232-2239.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2004). "Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis." J Clin Invest **114**(3): 438-446.
- Picard, N., D. Eladari, et al. (2008). "Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice." J Biol Chem **283**(8): 4602-4611.
- Piera-Velazquez, S., Z. Li, et al. (2011). "Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders." Am J Pathol **179**(3): 1074-1080.
- Piguet, P. F., C. Ribaux, et al. (1993). "Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Pathol **143**(3): 651-655.

- Pimentel, J. C. (1967). "Tridimensional photographic reconstruction in a study of the pathogenesis of honeycomb lung." *Thorax* **22**(5): 444-452.
- Planes, C., M. Blot-Chaubaud, et al. (2002). "Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells." *J Biol Chem* **277**(49): 47318-47324.
- Planes, C., B. Escoubet, et al. (1997). "Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**(4): 508-518.
- Planes, C., G. Friedlander, et al. (1996). "Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line." *Am J Physiol* **271**(1 Pt 1): L70-78.
- Planes, C., C. Leyvraz, et al. (2005). "In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(6): L1099-1109.
- Planes, C., N. H. Randrianarison, et al. (2010). "ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1." *EMBO Mol Med* **2**(1): 26-37.
- Plataki, M., A. V. Koutsopoulos, et al. (2005). "Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis." *Chest* **127**(1): 266-274.
- Pozharskaya, V., E. Torres-Gonzalez, et al. (2009). "Twist: a regulator of epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis." *PLoS One* **4**(10): e7559.
- Prabhakar, N. R. and G. L. Semenza (2012). "Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2." *Physiol Rev* **92**(3): 967-1003.
- Prasse, A., D. V. Pechkovsky, et al. (2006). "A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18." *Am J Respir Crit Care Med* **173**(7): 781-792.
- Prockop, D. J., C. A. Gregory, et al. (2003). "One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** Suppl 1: 11917-11923.
- Psathakis, K., D. Mermigkis, et al. (2006). "Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis." *Eur J Clin Invest* **36**(5): 362-367.
- Qiao, R., W. Yan, et al. (2008). "Effects of KGF on alveolar epithelial cell transdifferentiation are mediated by JNK signaling." *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**(2): 239-246.
- Raghu, G., K. J. Anstrom, et al. (2012). "Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis." *N Engl J Med* **366**(21): 1968-1977.
- Raghu, G., J. Behr, et al. (2013). "Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial." *Ann Intern Med* **158**(9): 641-649.
- Raghu, G., K. K. Brown, et al. (2008). "Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial." *Am J Respir Crit Care Med* **178**(9): 948-955.
- Raghu, G., S. Y. Chen, et al. (2014). "Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11." *Lancet Respir Med* **2**(7): 566-572.
- Raghu, G., H. R. Collard, et al. (2011). "An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management." *Am J Respir Crit Care Med* **183**(6): 788-824.

- Rahman, I., S. K. Biswas, et al. (2006). "Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases." Eur J Pharmacol **533**(1-3): 222-239.
- Randolph, A. G. (2009). "Management of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in children." Crit Care Med **37**(8): 2448-2454.
- Randrianarison, N., B. Escoubet, et al. (2007). "beta-Liddle mutation of the epithelial sodium channel increases alveolar fluid clearance and reduces the severity of hydrostatic pulmonary oedema in mice." J Physiol **582**(Pt 2): 777-788.
- Ranieri, V. M., G. D. Rubenfeld, et al. (2012). "Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition." JAMA **307**(23): 2526-2533.
- Ratajczak, J., K. Miekus, et al. (2006). "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery." Leukemia **20**(5): 847-856.
- Rawlins, E. L., T. Okubo, et al. (2009). "The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium." Cell Stem Cell **4**(6): 525-534.
- Richeldi, L., U. Costabel, et al. (2011). "Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **365**(12): 1079-1087.
- Richeldi, L., R. M. du Bois, et al. (2014). "Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **370**(22): 2071-2082.
- Rock, J. R. and B. L. Hogan (2011). "Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 493-512.
- Rojas, M., J. Xu, et al. (2005). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(2): 145-152.
- Rubenfeld, G. D. (2014). "ARDS: promising insights for a challenging syndrome." Lancet Respir Med **2**(12): 955-956.
- Rubenfeld, G. D., E. Caldwell, et al. (2005). "Incidence and outcomes of acute lung injury." N Engl J Med **353**(16): 1685-1693.
- Rugonyi, S., S. C. Biswas, et al. (2008). "The biophysical function of pulmonary surfactant." Respir Physiol Neurobiol **163**(1-3): 244-255.
- Sahlgren, C., M. V. Gustafsson, et al. (2008). "Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(17): 6392-6397.
- Saika, S., S. Kono-Saika, et al. (2004). "Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury." Am J Pathol **164**(2): 651-663.
- Sakai, N. and A. M. Tager (2013). "Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis." Biochim Biophys Acta **1832**(7): 911-921.
- Sakamoto, K., N. Hashimoto, et al. (2012). "Differential modulation of surfactant protein D under acute and persistent hypoxia in acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(1): L43-53.
- Sakamoto, S., T. Yazawa, et al. (2011). "Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(3): 489-497.

- Salazar, K. D., S. M. Lankford, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(5): L1002-1011.
- Samoszuk, M. K., J. Walter, et al. (2004). "Improved immunohistochemical method for detecting hypoxia gradients in mouse tissues and tumors." J Histochem Cytochem **52**(6): 837-839.
- Sarmiento, X., J. J. Guardiola, et al. (2011). "Discrepancy between clinical criteria for diagnosing acute respiratory distress syndrome secondary to community acquired pneumonia with autopsy findings of diffuse alveolar damage." Respir Med **105**(8): 1170-1175.
- Sato, M., Y. Muragaki, et al. (2003). "Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction." J Clin Invest **112**(10): 1486-1494.
- Schinkothe, T., W. Bloch, et al. (2008). "In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **17**(1): 199-206.
- Schiza, S., C. Mermigkis, et al. (2015). "Idiopathic pulmonary fibrosis and sleep disorders: no longer strangers in the night." Eur Respir Rev **24**(136): 327-339.
- Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 343-354.
- Schroedl, C., D. S. McClintock, et al. (2002). "Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(5): L922-931.
- Seibold, M. A., A. L. Wise, et al. (2011). "A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis." N Engl J Med **364**(16): 1503-1512.
- Selak, M. A., S. M. Armour, et al. (2005). "Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase." Cancer Cell **7**(1): 77-85.
- Selman, M., T. E. King, et al. (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy." Ann Intern Med **134**(2): 136-151.
- Selman, M. and A. Pardo (2006). "Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers." Proc Am Thorac Soc **3**(4): 364-372.
- Selman, M. and A. Pardo (2014). "Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model." Am J Respir Crit Care Med **189**(10): 1161-1172.
- Selman, M., A. Pardo, et al. (2006). "Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis." Am J Respir Crit Care Med **173**(2): 188-198.
- Selman, M., A. Pardo, et al. (2008). "Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs?" PLoS Med **5**(3): e62.
- Semenza, G. L. (2004). "Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level." Physiology (Bethesda) **19**: 176-182.
- Semenza, G. L. (2011). "Oxygen sensing, homeostasis, and disease." N Engl J Med **365**(6): 537-547.
- Shannon, J. M., T. Pan, et al. (2001). "Lung fibroblasts improve differentiation of rat type II cells in primary culture." Am J Respir Cell Mol Biol **24**(3): 235-244.

- Shimoda, L. A. and G. L. Semenza (2011). "HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease." Am J Respir Crit Care Med **183**(2): 152-156.
- Shyamsundar, M., D. F. McAuley, et al. (2014). "Keratinocyte growth factor promotes epithelial survival and resolution in a human model of lung injury." Am J Respir Crit Care Med **189**(12): 1520-1529.
- Signorelli, S., P. Jennings, et al. (2010). "Differential effects of hypoxic stress in alveolar epithelial cells and microvascular endothelial cells." Cell Physiol Biochem **25**(1): 135-144.
- Simon-Blancal, V., O. Freynet, et al. (2012). "Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: outcome and prognostic factors." Respiration **83**(1): 28-35.
- Sisson, T. H., M. Mendez, et al. (2010). "Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **181**(3): 254-263.
- Snyder, P. M. (2000). "Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na(+) channel to the cell surface." J Clin Invest **105**(1): 45-53.
- Snyder, P. M. (2005). "Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking." Endocrinology **146**(12): 5079-5085.
- Song, J. W., S. B. Hong, et al. (2011). "Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: incidence, risk factors and outcome." Eur Respir J **37**(2): 356-363.
- Spagnolo, P., J. Grunewald, et al. (2014). "Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts." Lancet Respir Med **2**(5): 416-428.
- Spagnolo, P., T. M. Maher, et al. (2015). "Idiopathic pulmonary fibrosis: Recent advances on pharmacological therapy." Pharmacol Ther.
- Spagnolo, P., N. Sverzellati, et al. (2015). "Idiopathic pulmonary fibrosis: an update." Ann Med **47**(1): 15-27.
- Spees, J. L., D. A. Pociask, et al. (2007). "Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **176**(4): 385-394.
- Spragg, R. G., G. R. Bernard, et al. (2010). "Beyond mortality: future clinical research in acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **181**(10): 1121-1127.
- Sprung, C. L., D. Annane, et al. (2008). "Hydrocortisone therapy for patients with septic shock." N Engl J Med **358**(2): 111-124.
- Stan, R. V., W. G. Roberts, et al. (1997). "Immunoisolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae)." Mol Biol Cell **8**(4): 595-605.
- Steele, M. P., M. C. Speer, et al. (2005). "Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **172**(9): 1146-1152.
- Steinberg, K. P., L. D. Hudson, et al. (2006). "Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **354**(16): 1671-1684.
- Strieter, R. M. (2005). "Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel." Chest **128**(5 Suppl 1): 526S-532S.
- Strieter, R. M., E. C. Keeley, et al. (2009). "The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." J Leukoc Biol **86**(5): 1111-1118.

- Strutz, F., M. Zeisberg, et al. (2002). "Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation." Kidney Int **61**(5): 1714-1728.
- Sueblinvong, V., R. Loi, et al. (2008). "Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells." Am J Respir Crit Care Med **177**(7): 701-711.
- Sueblinvong, V., W. A. Neveu, et al. (2014). "Aging promotes pro-fibrotic matrix production and increases fibrocyte recruitment during acute lung injury." Adv Biosci Biotechnol **5**(1): 19-30.
- Swigris, J. J., A. L. Olson, et al. (2012). "Ethnic and racial differences in the presence of idiopathic pulmonary fibrosis at death." Respir Med **106**(4): 588-593.
- Tager, A. M., P. LaCamera, et al. (2008). "The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak." Nat Med **14**(1): 45-54.
- Tanaka, K., A. Azuma, et al. (2012). "Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Chest **142**(4): 1011-1019.
- Tanaka, K., T. Ishihara, et al. (2010). "Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(3): L348-360.
- Tang, Y., B. Cai, et al. (2013). "Melatonin pretreatment improves the survival and function of transplanted mesenchymal stem cells after focal cerebral ischemia." Cell Transplant.
- Tanjore, H., T. S. Blackwell, et al. (2012). "Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(8): L721-729.
- Tanjore, H., D. S. Cheng, et al. (2011). "Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem **286**(35): 30972-30980.
- Tanjore, H., X. C. Xu, et al. (2009). "Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **180**(7): 657-665.
- Taskar, V. and D. Coultas (2008). "Exposures and idiopathic lung disease." Semin Respir Crit Care Med **29**(6): 670-679.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-142.
- Thomas, A. Q., K. Lane, et al. (2002). "Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred." Am J Respir Crit Care Med **165**(9): 1322-1328.
- Thompson, E. W., J. Torri, et al. (1994). "Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells." Clin Exp Metastasis **12**(3): 181-194.
- Tobin, R. W., C. E. Pope, 2nd, et al. (1998). "Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **158**(6): 1804-1808.
- Toonkel, R. L., J. M. Hare, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells and idiopathic pulmonary fibrosis. Potential for clinical testing." Am J Respir Crit Care Med **188**(2): 133-140.

- Treutlein, B., D. G. Brownfield, et al. (2014). "Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq." Nature **509**(7500): 371-375.
- Tropea, K. A., E. Leder, et al. (2012). "Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal stromal cell treatment in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(9): L829-837.
- Truwit, J. D., G. R. Bernard, et al. (2014). "Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **370**(23): 2191-2200.
- Tsakiri, K. D., J. T. Cronkhite, et al. (2007). "Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7552-7557.
- Tsuji, T., K. Aoshiba, et al. (2004). "Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(6): 643-649.
- Tsukita, S., M. Furuse, et al. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 285-293.
- Tzouvelekis, A., F. Bonella, et al. (2015). "Update on therapeutic management of idiopathic pulmonary fibrosis." Ther Clin Risk Manag **11**: 359-370.
- Tzouvelekis, A., V. Harokopos, et al. (2007). "Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis." Am J Respir Crit Care Med **176**(11): 1108-1119.
- Tzouvelekis, A., V. Paspaliaris, et al. (2013). "A prospective, non-randomized, no placebo-controlled, phase Ib clinical trial to study the safety of the adipose derived stromal cells-stromal vascular fraction in idiopathic pulmonary fibrosis." J Transl Med **11**: 171.
- Uchida, T., F. Rossignol, et al. (2004). "Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha." J Biol Chem **279**(15): 14871-14878.
- Uhal, B. D., I. Joshi, et al. (1998). "Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): L1192-1199.
- Uhal, B. D., I. Joshi, et al. (1995). "Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro." Am J Physiol **269**(6 Pt 1): L819-828.
- Uhal, B. D., X. Li, et al. (2011). "Regulation of alveolar epithelial cell survival by the ACE-2/angiotensin 1-7/Mas axis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **301**(3): L269-274.
- Ulich, T. R., E. S. Yi, et al. (1994). "Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo." J Clin Invest **93**(3): 1298-1306.
- Uzunhan, Y., H. Nunes, et al. (2011). "[Innovative therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis]." Presse Med **40**(12 Pt 1): 1100-1112.
- Valeyre, D., C. Albera, et al. (2014). "Comprehensive assessment of the long-term safety of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Respirology **19**(5): 740-747.
- Valeyre, D., O. Freynet, et al. (2010). "[Epidemiology of interstitial lung diseases]." Presse Med **39**(1): 53-59.
- Vallet, V., A. Chraïbi, et al. (1997). "An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel." Nature **389**(6651): 607-610.

- Vallet, V., C. Pfister, et al. (2002). "Cell-surface expression of the channel activating protease xCAP-1 is required for activation of ENaC in the *Xenopus* oocyte." J Am Soc Nephrol **13**(3): 588-594.
- Vannella, K. M., T. R. Luckhardt, et al. (2010). "Latent herpesvirus infection augments experimental pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **181**(5): 465-477.
- Villar, J., D. Sulemanji, et al. (2014). "The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed?" Curr Opin Crit Care **20**(1): 3-9.
- von Bahr, L., I. Batsis, et al. (2012). "Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation." Stem Cells **30**(7): 1575-1578.
- Voswinckel, R., T. Ziegelhoeffer, et al. (2003). "Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth." Circ Res **93**(4): 372-379.
- Vyas-Read, S., P. W. Shaul, et al. (2007). "Nitric oxide attenuates epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L212-221.
- Waghray, M., Z. Cui, et al. (2005). "Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts." FASEB J **19**(7): 854-856.
- Walter, J., L. B. Ware, et al. (2014). "Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis." Lancet Respir Med **2**(12): 1016-1026.
- Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.
- Wang, A., Y. Yokosaki, et al. (1996). "Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(5): 664-672.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1993). "Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction." Blood **82**(12): 3610-3615.
- Wang, H. B., M. Dembo, et al. (2000). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." Am J Physiol Cell Physiol **279**(5): C1345-1350.
- Wang, R., G. Alam, et al. (2000). "Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF-alpha requires angiotensin II generation de novo." J Cell Physiol **185**(2): 253-259.
- Wang, R., O. Ibarra-Sunga, et al. (2000). "Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(1): L143-151.
- Wang, R., C. Ramos, et al. (1999). "Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): L1158-1164.
- Wang, X. M., Y. Zhang, et al. (2006). "Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis." J Exp Med **203**(13): 2895-2906.
- Wang, Y., H. G. Folkesson, et al. (1999). "Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy." J Appl Physiol (1985) **87**(5): 1852-1860.
- Wang, Y., C. Huang, et al. (2013). "miR-375 regulates rat alveolar epithelial cell trans-differentiation by inhibiting Wnt/beta-catenin pathway." Nucleic Acids Res **41**(6): 3833-3844.

- Ware, L. B. (2005). "Prognostic determinants of acute respiratory distress syndrome in adults: impact on clinical trial design." Crit Care Med **33**(3 Suppl): S217-222.
- Ware, L. B. (2006). "Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome." Semin Respir Crit Care Med **27**(4): 337-349.
- Ware, L. B., T. Koyama, et al. (2010). "Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury." Chest **137**(2): 288-296.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **342**(18): 1334-1349.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay (2002). "Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(5): L924-940.
- Waters, C. M. and U. Savla (1999). "Keratinocyte growth factor accelerates wound closure in airway epithelium during cyclic mechanical strain." J Cell Physiol **181**(3): 424-432.
- Waypa, G. B., J. D. Marks, et al. (2013). "Superoxide generated at mitochondrial complex III triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation." Am J Respir Crit Care Med **187**(4): 424-432.
- Weibel, E., and R. Crystal. (1997). The Lung. Philadelphia, Lippincott Raven,.
- Weiss, D. J. (2015). "Cell therapies for ARDS: a promising start." Lancet Respir Med **3**(1): 2-3.
- Weiss, D. J., R. Casaburi, et al. (2013). "A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD." Chest **143**(6): 1590-1598.
- Weisz, O. A., J. M. Wang, et al. (2000). "Non-coordinate regulation of endogenous epithelial sodium channel (ENaC) subunit expression at the apical membrane of A6 cells in response to various transporting conditions." J Biol Chem **275**(51): 39886-39893.
- Wenger, R. H., A. Rolfs, et al. (1998). "Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter." Blood **91**(9): 3471-3480.
- Wettstein, G., P. S. Bellaye, et al. (2013). "Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation." FASEB J **27**(4): 1549-1560.
- Wheaton, W. W. and N. S. Chandel (2011). "Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism." Am J Physiol Cell Physiol **300**(3): C385-393.
- Whitsett, J. A. (2002). "Genetic basis of familial interstitial lung disease: misfolding or function of surfactant protein C?" Am J Respir Crit Care Med **165**(9): 1201-1202.
- Wiesener, M. S., J. S. Jurgensen, et al. (2003). "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs." FASEB J **17**(2): 271-273.
- Willis, B. C. and Z. Borok (2007). "TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(3): L525-534.
- Willis, B. C., J. M. Liebler, et al. (2005). "Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Pathol **166**(5): 1321-1332.

- Willson, D. F., N. J. Thomas, et al. (2005). "Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial." *JAMA* **293**(4): 470-476.
- Wilson, J. G., K. D. Liu, et al. (2015). "Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial." *Lancet Respir Med* **3**(1): 24-32.
- Wipff, P. J., D. B. Rifkin, et al. (2007). "Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix." *J Cell Biol* **179**(6): 1311-1323.
- Witzgall, R., D. Brown, et al. (1994). "Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells." *J Clin Invest* **93**(5): 2175-2188.
- Wollin, L., I. Maillet, et al. (2014). "Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* **349**(2): 209-220.
- Wollin, L., E. Wex, et al. (2015). "Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis." *Eur Respir J* **45**(5): 1434-1445.
- Wright, J. R. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nat Rev Immunol* **5**(1): 58-68.
- Wu, Y., B. M. Evers, et al. (2009). "Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation." *J Biol Chem* **284**(1): 640-648.
- Xiong, N., Z. Zhang, et al. (2011). "VEGF-expressing human umbilical cord mesenchymal stem cells, an improved therapy strategy for Parkinson's disease." *Gene Ther* **18**(4): 394-402.
- Xu, J., E. T. Gonzalez, et al. (2009). "Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung injury in aged mice." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**(7): 731-739.
- Xu, J., A. Mora, et al. (2007). "Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**(3): 291-299.
- Xue, C., D. Plieth, et al. (2003). "The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis." *Cancer Res* **63**(12): 3386-3394.
- Yamada, M., H. Kubo, et al. (2005). "Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair." *Thorax* **60**(5): 410-413.
- Yamada, M., H. Kubo, et al. (2004). "Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury." *J Immunol* **172**(2): 1266-1272.
- Yamada, M., H. Kubo, et al. (2013). "The increase of microRNA-21 during lung fibrosis and its contribution to epithelial-mesenchymal transition in pulmonary epithelial cells." *Respir Res* **14**: 95.
- Yamada, S. and W. J. Nelson (2007). "Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion." *J Cell Biol* **178**(3): 517-527.
- Yang, J., C. Dai, et al. (2005). "A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition." *J Am Soc Nephrol* **16**(1): 68-78.
- Yang, J., S. A. Mani, et al. (2004). "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." *Cell* **117**(7): 927-939.

- Yang, J., M. Velikoff, et al. (2015). "Overexpression of inhibitor of DNA-binding 2 attenuates pulmonary fibrosis through regulation of c-Abl and Twist." Am J Pathol **185**(4): 1001-1011.
- Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6): 818-829.
- Yang, M. H., M. Z. Wu, et al. (2008). "Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis." Nat Cell Biol **10**(3): 295-305.
- Yang, S., S. Banerjee, et al. (2012). "Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis." Am J Pathol **180**(2): 484-493.
- Yano, T., R. R. Deterding, et al. (1996). "Keratinocyte growth factor reduces lung damage due to acid instillation in rats." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(4): 433-442.
- Zavadil, J., M. Bitzer, et al. (2001). "Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6686-6691.
- Zavadil, J. and E. P. Bottinger (2005). "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions." Oncogene **24**(37): 5764-5774.
- Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." J Clin Invest **119**(6): 1429-1437.
- Zeisberg, M., A. A. Shah, et al. (2005). "Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney." J Biol Chem **280**(9): 8094-8100.
- Zemans, R. L., S. P. Colgan, et al. (2009). "Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol **40**(5): 519-535.
- Zeyed, Y. F., J. A. Bastarache, et al. (2012). "The severity of shock is associated with impaired rates of net alveolar fluid clearance in clinical acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(6): L550-555.
- Zhang, R., Y. Pan, et al. (2015). "Mechanical Stress Induces Lung Fibrosis via Midkine Signaling Pathway." Am J Respir Crit Care Med.
- Zhao, H., Q. Q. Wu, et al. (2014). "Melatonin inhibits endoplasmic reticulum stress and epithelial-mesenchymal transition during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." PLoS One **9**(5): e97266.
- Zheng, G., L. Huang, et al. (2014). "Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study." Respir Res **15**: 39.
- Zhong, Q., B. Zhou, et al. (2011). "Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(3): 498-509.
- Zhou, G., L. A. Dada, et al. (2008). "Hypoxia-mediated Na-K-ATPase degradation requires von Hippel Lindau protein." FASEB J **22**(5): 1335-1342.
- Zhou, G., L. A. Dada, et al. (2009). "Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1120-1130.

Zhu, Y. G., X. M. Feng, et al. (2014). "Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice." Stem Cells **32**(1): 116-125.

Zisman, D. A., M. Schwarz, et al. (2010). "A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **363**(7): 620-628.

1. Y.Uzunhan. Aspects génétiques des pneumopathies interstitielles diffuses. ***Revue des Maladies Respiratoires, Actualités ; 4 (7) : 381-6- Octobre 2012***
2. Uzunhan Y, Nunes H, Gille T, Bron C, Planès C, Valeyre D. [Innovative therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis]. ***Presse Med. 2011 Dec; 40:1100-12. Epub 2011 Sep 3.***
3. Y.Uzunhan. Les cellules souches en pneumologie : de la thérapie cellulaire au *bio-engineering* du poumon. ***Revue des Maladies Respiratoires, Actualités, vol 3, N°5, Octobre 2011 : 454-460***
4. Abstract Congrès ERS O.Bernard et coll. (Communication orale Amsterdam, septembre 2015). **Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating hypoxic signaling**