# UNIVERSITE DE NANTES FACULTE DE MEDECINE

# MECANISMES DE LA REPONSE DE L'EPITHELIUM DES VOIES AERIENNES A L'AGRESSION

Approche génomique de la réponse à l'hyperoxie et rôle de c-fos dans l'expression de NOS2

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE Discipline Sciences de la vie et de la santé Spécialité Biologie Médecine Santé

Présentée et soutenue publiquement par

# CHAMBELLAN Arnaud

Le 03 juillet 2009, devant le jury ci-dessous

Président : M. MAGNAN Antoine, PUPH, Faculté de Médecine, Nantes

Rapporteurs : M. DINH XUAN Anh Tuan, PUPH, Faculté de Médecine, Cochin, ParisM. PISON Christophe, PUPH, Faculté de Médecine, Grenoble

**Examinateurs** : M. MAGNAN Antoine, PUPH, Faculté de Médecine, Nantes

M. BONAY Marcel, MCUPH, Faculté de Médecine Bichat, Paris

Directeur de thèse : Mme LEMARCHAND Patricia, PUPH, Faculté de Médecine ,

Nantes

# TABLE DES MATIERES

I.	Liste des abréviations	4
II.	Liste des figures	6
III.	Liste des tableaux	7
IV.	Introduction générale	8
A.	Muqueuse des voies aériennes, environnement atmosphérique et pathologies bronchiques	8
B.	La cellule épithéliale des voies aériennes	12
C.	Types d'agressions et stress oxydant au niveau des voies aériennes	15
1.	Fumée de tabac	16
2.	Hyperoxie	18
3.	Pollution atmosphérique	20
D.	Place du stress oxydant dans la physiopathologie des bronchopathies chroniques	23
1.	La BPCO	23
2.	L'asthme	26
3.	La mucoviscidose	27
E.	Systèmes de défense extracellulaire	29
1.	Clairance muco-ciliaire	29
2.	Mucus, mucines et immunoglobulines	30
3.	Systèmes antioxydants	31
F. l'hyp	Principales voies de signalisation impliquées dans la réponse de l'épithélium respiratoire à peroxie	33
1.	Voie des MAP kinases	33
2.	Voie impliquant NF-κB	34
3.	Voie impliquant AP-1	35
V.	Contexte et objectifs du travail	36
VI.	Mécanismes de la réponse épithéliale respiratoire à l'hyperoxie chez l'homme in vivo	38
A.	Contexte et enjeu	38

В.	Intérêt de l'approche fonctionnelle génomique dans l'étude intégrée de la biologie des systèmes 39
C.	Manuscrit 1
D.	Discussion des résultats
VII. des vo	Rôle de c-Fos dans l'expression de la NO synthase inductible au niveau de l'épithélium pies aériennes
A.	Contexte et enjeu
B.	Résultats préliminaires 51
C.	Manuscrit 2
D.	Discussion des résultats
VIII.	Conclusions et perspectives60
IX.	Annexes
A.	Synthèse des principales données sur les effets de l'hyperoxie selon les modèles expérimentaux 63
B. sur	Les particules diesels peuvent-elles activer les cellules de Langerhans des voies aériennes ? Étude un modèle <i>in vitro</i>
C.	Particules diesels et allergie: mécanismes cellulaires
D.	Pollution atmosphérique et environnementale et pathologie respiratoire
E.	Les particules diesels altèrent la mycobactéricidie des macrophages humains
F.	Principaux résultats de l'analyse pangénomique effectuée sur FOSi
1	Evaluation des critères qualité des puces Affymetrix HG-U133A
2	Analyse par regroupements (clusters) selon la similitude des profils d'expression
3.	Analyse génomique fonctionnelle de FOSi/FOSscr
4	. Analyse préliminaire pour les cytokines
G. Soc	Résultats préliminaires sur la survie cellulaire de FOSi et FOSscr (abstract American Thoracic iety, San Diego 2009)
X.	Bibliographie77

## I. Liste des abréviations

AP-1: activator of protein 1

- ARNi: ARN interference
- BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive
- CFTR: cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator
- DEP: diesel exhaust particle
- ERA: espèces réactives de l'azote
- ERKs: extracellular signal-regulated kinases
- ERO: espèces réactives de l'oxygène
- FiO2: fraction inspirée d'oxygène
- GSH: glutathione
- HBEC: human bronchial epithelial cell
- HDAC: histone déacétylase
- HIF: hypoxia-inducible factor
- HSP: heat shock protein
- IFN: interferon
- IL: interleukine
- I-κB: inhibitor of kappa B
- JNKs: c-Jun N-terminal kinases
- MAPK: mitogen-activated protein kinases
- NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- NF-kB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO: nitric oxide

NOS: NO synthase

O2: oxygène

STAT: signal transducers and activator of transcription

TNF: tumor necrosis factor

TGF: transforming growth factor

V/Q: rapport ventilation/perfusion

### II. Liste des figures

Figure 1: espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au niveau respiratoire

Figure 2: principales réponses précoces de l'épithélium à la fumée de tabac

Figure 3: mécanismes de la mort cellulaire par nécrose (souris et lignées humaines)

Figure 4: stress oxydant médié par les principaux polluants atmosphériques

**Figure 5:** hiérarchisation de la réponse cellulaire au stress oxydant généré par les particules diesels

Figure 6: place du stress oxydant dans la BPCO

Figure 7: principales voies de signalisation décrites en réponse au stress oxydant

Figure 8: mécanismes d'activation des MAPKs et d'AP-1 par le tabac et les fibres d'asbeste

Figure 9: principales étapes du protocole d'étude

**Figure 10:** fonctions cellulaires impliquées dans la réponse précoce à l'hyperoxie chez le sujet sain [selon GOMINER]

**Figure 11:** principales enzymes impliquées dans la réponse à l'hyperoxie chez le sujet sain [selon GOMINER]

Figure 12: synthèse des principales voies impliquées dans la réponse précoce à l'hyperoxie

Figure 13: place de c-Fos dans les principales voies d'activation de la NOS2

Figure 14: séquences ARN interférence de c-Fos retenues pour la construction des plasmides FOSi

Figure 15: western blot de p56 sur extrait protéique total

Figure 16: niveau d'expression de c-Fos sur extrait protéique total

Figure 17: expression de c-Fos selon les clones sélectionnés en utilisant la séquence c-Fos ARNi 177

# III. Liste des tableaux

Tableau I: espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) d'intérêt biologique

Tableau II: principales fonctions de la cellule épithéliale des voies aériennes

**Tableau III:** principales molécules produites par la cellule épithéliale des voies aériennes en réponse aux agents pathogènes

Tableau IV: principaux antioxydants présents au niveau des voies aériennes

Tableau V: principaux gènes régulés par NFkB

Tableau VI: caractéristiques des sujets sains avant et après exposition à l'hyperoxie

## IV. Introduction générale

# A. Muqueuse des voies aériennes, environnement atmosphérique et pathologies bronchiques

Le système respiratoire occupe une place particulière dans l'organisme. Son versant épithélial est en contact permanent avec le monde extérieur tout comme la muqueuse digestive avec laquelle il partage un certain nombre de similitudes (1). Son épithélium est pseudo-stratifié et constitué d'au moins huit types de cellules qui peuvent être classées en trois catégories : les cellules basales, les cellules ciliées et les cellules sécrétoires (2).

Les cellules ciliées sont majoritaires représentant plus de 50% de l'ensemble des cellules épithéliales. Elles possèdent environ 300 cils/cellule et de nombreuses mitochondries au pôle apical qui témoignent de son intense activité métabolique (3). Les cellules caliciformes (goblet cells) représentent 20 à 30% des cellules épithéliales au niveau des voies aériennes proximales. Elles ont une fonction sécrétoire avec un appareil de Golgi particulièrement développé et de nombreux granules sécrétoires. On les trouve augmentées dans la plupart des bronchopathies inflammatoires chroniques comme l'asthme et la BPCO (4). Les cellules basales adhèrent fermement à la membrane basale et représentent les progéniteurs des cellules ciliées et caliciformes. Elles ont un rôle important dans la réparation de l'épithélium après une agression et sécrètent entre autre l'endopeptidase neutre responsable de l'inactivation de peptides inflammatoires comme la bradykinine et les tachykinines (5). Les cellules de Clara représentent une population intermédiaire. Elles sont à la fois progénitrice des cellules ciliées et caliciformes et assurent une fonction de protection de l'épithélium en sécrétant des antiprotéases (notamment le secretory leukocyte protease inhibitor-SLPI qui neutralise l'élastase, la trypsine et la cathepsine G). Elles ont aussi une fonction de détoxification des xénobiotiques par l'action des mono-oxygénases P450 (6).

Parmi les cellules minoritaires, on identifie les cellules en brosse qui représentent moins de 10% des cellules épithéliales et dont la fonction reste mal connue (7). Les cellules neuroendocrines ont un rôle dans la croissance et la régénération épithéliale (8). Au niveau des glandes sous-muqueuses qui s'abouchent au niveau de l'épithélium par un canal sécrétoire on trouve des cellules caliciformes. Ces glandes sécrètent plus de 90% du mucus qui tapisse les voies aériennes en les remontant grâce à l'activité des cellules ciliées (2). La vie sur terre s'est développée sur un mode essentiellement aérobie en privilégiant l'utilisation de l'oxygène. Celui-ci occupe une place centrale dans l'équilibre redox des milieux biologiques notamment dans la production énergétique indispensable à toute biosynthèse et vie cellulaire qui se sont organisées autour du cycle de l'azote et du carbone (9). Plus de 90% de l'oxygène utilisé par la cellule est transformé en eau par le système de la cytochrome oxydase mitochondriale. Le métabolisme oxydatif génère des espèces radicalaires particulièrement instables et réactives sur le plan biologique, en particulier au niveau de l'appareil respiratoire (**tableau I**) (10-12).

	Radicaux libres		Espèces non radicalaires	
ERO	$O_2^{-\bullet}$	Anion superoxyde	$H_2O_2$	Peroxyde d'hydrogène
	•OH	Hydroxyl	HOCl	Acide hypochlorique
	$HO_2^{\bullet}$	Hydroperoxyl	$O_3$	Ozone
	RO•	Alkoxyl	R-OOH	Hydroperoxyde
	$RO_2^{\bullet}$	Peroxyl		
	ROO•	Hydroperoxyde		
ERA	NO•	Monoxyde d'azote	$\mathrm{NO}^+$	Cation nitrosyl
	$NO_2^{\bullet}$	Dioxyde d'azote	NO	Anion nitroxyl
			$NO_2^+$	Cation nitronium
			ONOO <sup>-</sup>	Anion peroxynitrite
			R-OONO	Alkyl peroxynitrites

Tableau I: espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) d'intérêt biologique

L'oxygène en lui-même est relativement stable et ne réagit que lentement comparé aux autres espèces radicalaires. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est d'autant plus réactif en présence de métaux de transition qui le transforme en radical hydroxyl ('OH) hautement réactif. L'anion superoxyde (1 à 5% de l'oxygène présent dans l'organisme) réagit surtout avec lui-même pour donner de l' $H_2O_2$  moins réactif, ou lorsqu'il est en présence de métaux de transition en 'OH. Ces espèces réactives de l'oxygène interfèrent avec de nombreux constituants de la cellule et agissent en tant que second messager lorsqu'elles sont produites de manière contrôlées et transitoires. Par contre leur production soutenue est incompatible avec le maintien de l'homéostasie cellulaire ce qui constitue le stress oxydant (10). Ces processus sont catalysés dans leurs étapes précoces par trois systèmes enzymatiques ubiquitaires (10). La NADPH oxydase est une protéine membranaire à hème qui catalyse la réaction de l'O2 en anion superoxyde sur son versant cytoplasmique. La xanthine oxydase est une enzyme cytoplasmique et du peroxysome qui contient de nombreux atomes de fer. Elle catalyse la dernière réaction de dégradation oxydative des purines en transformant la xanthine en acide urique avec production d'anion superoxyde. Son activation épithéliale est dépendante de l'équilibre redox, notamment de la baisse du glutathion (GSH) intracellulaire (13). Mais c'est surtout au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, qu'est produit l'anion superoxyde en tant que second messager à l'état normal (14).

Au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes, l'anion superoxyde est rapidement neutralisé par le monoxyde d'azote (NO) qui le transforme en espèces moins réactives appelées espèces réactives de l'azote dont le peroxynititrite est un des plus réactif (15-18). Le NO est une molécule ubiquitaire formée à partir de l'O2 et de l'arginine par les NO synthases (19). Elles sont présentent sous 3 isoformes au niveau de l'épithélium des voies aériennes (20, 21). C'est surtout la forme inductible (NOS2) qui permet de produire une grande quantité de NO en réponse à différents stimuli.

Les ERA générées en réponse au stress oxydant ont une grande importance biologique et sont impliquées dans la physiopathologie de la plupart des maladies bronchiques dont l'asthme, la BPCO et le mucoviscidose (15, 20, 22). Il a été ainsi rapporté que le stress nitrosant entraînait la nitration de CFTR et sa dégradation par le protéasome ce qui pourrait rendre compte de certaines similitudes entre les bronchopathies chroniques et la mucoviscidose (23).

Ces espèces réactives de l'oxygène (ou radicaux libres) et de l'azote sont des signaux cellulaires hautement contrôlés et impliqués dans un très grand nombre de fonctions cellulaires (**figure 1**) (10). La mitochondrie et le réticulum endoplasmique sont particulièrement sensibles à l'équilibre redox intracellulaire. La mitochondrie car elle permet de lier le stress oxydant à la production d'énergie indispensable au métabolisme de la cellule et sa survie. Le réticulum endoplasmique, parce qu'il exerce un rôle dans le turn-over et l'homéostasie des protéines suivant un stress oxydant (24). Des mécanismes de défense antioxydants capables de maintenir un environnement intra- et péricellulaire réducteur se sont développés afin de maintenir l'homéostasie redox entre espèces oxydantes et capacités des tissus vivants à les neutraliser (11).

Figure 1: espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au niveau respiratoire



De très nombreux agents pathogènes sont véhiculés par l'atmosphère au niveau des voies aériennes. Il sont soit naturels (virus, bactéries, incidents géoclimatiques) soit anthropiques liés aux activités humaines (fumée de tabac, pollution automobile, industrielle et de l'habitat). Ceci confère à l'épithélium des voies aériennes des propriétés originales de protection et d'interactions intercellulaires et d'organisation de la réponse aux agents agresseurs. Ces mécanismes de protection se sont organisés autours de la clairance muco-ciliaire, du recrutement de cellules phagocytaires et de la réponse inflammatoire. Le système nerveux est particulièrement important dans le contrôle de la bronchomotricité, de la toux et la sécrétion de mucus.

L'épithélium des voies aériennes expose une large surface d'environ 70 m<sup>2</sup> à l'environnement oxydatif chez l'homme adulte, ce qui le rend particulièrement vulnérable. Ainsi une fraction inspirée d'oxygène (FiO2) supérieure à 40%, comme utilisée dans le traitement des insuffisances respiratoires hypoxémiantes néonatales ou de l'adulte, ne peut être maintenue sur une longue période sans entraîner de rapides altérations de la muqueuse des voies aériennes. On observe en effet une aggravation du syndrome de détresse

respiratoire de l'adulte et des séquelles à type de dysplasie broncho-pulmonaire chez l'enfant (25-28).

Ces différents aspects expliquent qu'un des mécanismes précoces les plus fréquemment retrouvé dans la physiopathologie des maladies respiratoires soit un déséquilibre dans le contrôle du stress oxydant au profit des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces espèces vont initier une réponse pléïotrope complexe au niveau de l'épithélium et compromettre l'intégrité de la muqueuse des voies aériennes. C'est le cas de pathologies aussi différentes dans leur expression que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la mucoviscidose qui représentent chacune d'elle des enjeux importants de santé publique dans notre pays (17, 29-31). Le système immunitaire intervient dans la phase suivante. Il a une grande importance dans la régulation de la réponse aux agents pathogènes au niveau de la muqueuse des voies aériennes. Il ne sera pas détaillé dans ce travail qui se focalise sur la réponse précoce de l'épithélium à l'agression. En effet, la cellule épithéliale a un rôle plutôt freinateur afin de contenir la sollicitation excessive du système immunitaire ce qui permet de protéger la muqueuse des effets délétères d'une réponse inflammatoire inappropriée (32).

### B. La cellule épithéliale des voies aériennes

Une des premières fonctions de l'épithélium des voies aériennes est la protection physique contre les agents pathogènes (**tableau II**). Elle occupe une position de sentinelle et organise la transmission des informations à d'autres types cellulaires soit par contact direct avec les cellules de Langerhans qui vont à leur tour initier la réponse immuno-inflammatoire, soit par voie paracrine avec le système nerveux, les cellules musculaires lisses et les cellules immunitaires. Une des caractéristiques de la cellule épithéliale est d'être polarisé. Sa partie apicale est en contact avec la lumière des voies aériennes et détermine la fonction cellulaire, tandis que le territoire basolatéral est pour le maintien de l'homéostasie cellules épithéliales est en contact privilégié avec les cellules mésenchymateuses – aussi appelées enveloppe de fibroblastes atténuées - et les ramifications nerveuses par l'intermédiaire d'une matrice extracellulaire, l'ensemble constituant l'unité trophique épithélio-mésenchymateuse, dont le rôle est fondamental dans le développement et la ramification de l'arbre bronchique.

Il tient aussi probablement une place importante dans la réponse aux agressions et aux facteurs environnementaux (33).

L'épithélium des voies aériennes représente une barrière physique grâce à la présence d'un système jonctionnel serré (zonula occludens) à la partie haute de la membrane latérale. Ce système protége la muqueuse et ses différents constituants de la diffusion des agents irritants et particules inhalées (poussières, particules diesel, pneumallergènes, gaz toxiques) (34). Ainsi lors de l'abrasion de l'épithélium, ces substances vont pouvoir atteindre directement d'autres structures comme la cellule musculaire lisse et les ramifications des différents systèmes nerveux intervenant dans le contrôle du tonus musculaire, mais aussi les cellules immunitaires et mésenchymateuses qui vont entraîner une réponse inflammatoire intense avec profonds remaniements de la muqueuse. Le maintien de l'intégrité épithéliale et les mécanismes de sa régénération ont donc une place centrale dans la restitution *ad integrum* de la muqueuse après une agression. Lorsque celle-ci est altérée, un compromis sous forme d'un remodelage plus ou moins définitif va s'installer et entraîner la perte des processus physiologiques normaux de l'homéostasie épithéliale comme cela s'observe dans l'asthme et la BPCO (5, 35).

Tableau II: principales fonctions de la cellule épithéliale des voies aériennes

-

Protection physique vis-à-vis du milieu extérieur		
Sécrétion de mucus et transport ciliaire		
Régulation des transports de fluides et d'ions entre la lumière et la muqueuse		
Protection antimicrobienne		
Protection antioxydante		
Protection antiprotéase		
Régulation de la réponse inflammatoire		
Régulation du tonus musculaire lisse		
Régénération épithéliale		
Régulation du remodelage de la muqueuse		

Les cellules épithéliales des voies aériennes synthétisent et sécrètent de nombreux médiateurs notamment pro-inflammatoires dont les principaux sont résumés dans le **tableau III** (2, 36, 37). La présence notamment après stimulation, de molécules d'adhérence comme IntraCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Human Leukocyte Antigen (HLA) classe I et HLA classe II, leur confère un rôle de cellule présentatrice vis-à-vis des lymphocytes et des cellules dendritiques (38). Elles ont ainsi un rôle crucial dans l'orientation et le contrôle de la réponse inflammatoire et donc indirectement tonus bronchique (2, 39-42).

La cellule épithéliale est particulièrement exposée à de nombreux signaux et agents environnementaux et occupe une place centrale dans la genèse des réponses à l'agression. Elle régule la synthèse du mucus, la sécrétion de différents facteurs pro-inflammatoires notamment les cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, des chimiokines, et des facteurs de protection de la bronchoconstriction comme le NO et la prostaglandine PGE2 (43). Elle exerce aussi une fonction métabolique, de dégradation de l'acétylcholine (acétylcholine estérase), de l'histamine (diamine oxidase), et de synthèse de neuropeptides (endopeptidase neutre). Sa destruction créée un déséquilibre entre agents broncho-constricteurs et bronchodilatateurs au profit des premiers (40). Les principales voies de signalisation impliquées dans la réponse aux agents pathogènes sont la voie des MAPKs, de NF- $\kappa$ B, d'AP-1, de STAT-1, STAT-6 et NF IL-6 (37, 44-46). Tableau III: principales molécules produites par la cellule épithéliale des voies aériennes en

réponse aux agents pathogènes\*

Médiateurs lipidiques	Protéines de la matrice extracellulaire
PGE2	Collagène I, IV
PGF <sub>2X</sub> , TXB2	Fibronectine, laminine, acide hyaluronique
LTC4, LTD4, LTE4	CD44
Eicosanoïdes dérivés du cytochrome P450	MMP-1, -2, -3
	MMP-9, matrylisine
Cytokines	TIMP-1, -2
IL-1, TNFα	
IL-5, IL-6, IL-11, IL-16, LIF	Médiateurs peptidiques
IL-10	Endothéline
Chimiokines	Molécules d'adhésion
IL-8, GRO-α, ENA-78	ICAM-1, fibronectine
RANTES	E, N, C-cadhérines
MIP-1a	
MCP-1,4	Intégrines
Eotaxine-1 et 2	Alpha-intégrines
	Béta-intégrines
Facteurs de croissance	-
TGF-β	Gaz
EGF	NO
PDGF	CO
GM-CSF, CSF-1, G-CSF	
IGF, bFGF	Autres
	Espèces réactives de l'oxygène

EGF: epidermal growth factor. RANTES: regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted

## C. Types d'agressions et stress oxydant au niveau des voies aériennes

De nombreux agents pathogènes des voies respiratoires ont été identifiés. Il s'agit pour l'essentiel des agents infectieux, des agents irritants de nature gazeuse ou chimique, de la fumée de tabac et des divers polluants particulaires atmosphériques le plus souvent générés par les activités anthropiques. Leur toxicité ou pathogénie s'exerce directement *via* leur pouvoir oxydatif, ou indirectement en stimulant les systèmes oxydants au contact de l'épithélium. Cette réponse oxydante peut-être intensifiée par la présence des cellules immunitaires au niveau de l'épithélium, notamment les polynucléaires neutrophiles et macrophages. Le stress oxydant est ainsi défini par l'existence d'un déséquilibre dans la balance oxydants/antioxydants, en faveur des agents oxydants au niveau extra- et/ou intracellulaire. Sa place est importante dans la physiopathogénèse de la plupart des maladies respiratoires (31, 48).

La majeure partie de la toxicité des ERO est liée à leur interaction avec les métaux de transition notamment le cuivre et le fer qui sont présents dans l'environnement biologique ou au niveau des sites catalytiques des enzymes selon la classique réaction de Fenton:

 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$ , suivie de la réaction :

 $\operatorname{Fe}^{3+} + \operatorname{O}_2^{-\bullet} \rightarrow \operatorname{Fe}^{2+} + \operatorname{O}_2$ 

En dehors des agents infectieux, de nombreuses sources de stress oxydant existent. Les principales sont la fumée de tabac, l'exposition à l'amiante, certains polluants atmosphérique (ozone, oxydes d'azote, paticules diesels), le paraquat (expérimental) et en pratique médicale l'exposition à une FiO2 élevée, c'est-à-dire l'hyperoxie.

### 1. Fumée de tabac

La littérature scientifique est particulièrement abondante sur les effets de la fumée de tabac au niveau de l'épithélium des voies aériennes. Ceci en raison de son impact en terme de santé publique mais aussi parce qu'elle représente un modèle de prédilection pour l'étude du stress oxydant (49).

La fumée de tabac contient un nombre d'ERO estimé à  $10^{15}$  par bouffée dans sa phase gazeuse qui est particulièrement instable, et environ  $10^{17}$  par gramme dans sa phase particulaire (50-52). Ces particules ont une taille moyenne entre 0,1 et 0,5 µm ce qui leur permet d'atteindre facilement le poumon distal. Il est estimé qu'environ 10 à 40 mg de ces particules se déposent au niveau des voies aériennes inférieures par cigarette fumée. Parmi les nombreuses substances identifiées dans la fumée de tabac (plus de 4000), beaucoup ont des propriétés antigèniques, cytotoxiques, mutagènes et/ou carcinogènes (53).

La phase particulaire semble ainsi responsable de la majeure partie de la toxicité de la fumée de tabac. En effet, la surface de ces particules retient des atomes de fer, qui proviennent surtout de l'organisme sous leur forme oxydée ferrique (Fe<sup>3+</sup>). Cette accumulation génère un stress oxydant local soutenu avec des effets pro-inflammatoires et

carcinogènes au niveau de la muqueuse (54). Ce mécanisme d'action pourrait expliquer la persistance du risque de cancer et de l'inflammation après sevrage du tabac ainsi que l'effet synergique et aggravant de l'association entre polluants particulaires, notamment tabac et amiante (55, 56).

Cependant, l'impact de la fumée de tabac n'est pas limité aux seuls fumeurs dans la mesure où la majorité des espèces réactives est générée à l'extrémité en combustion de la cigarette qui se retrouve dans la fumée environnante à une concentration allant jusqu'à 50 fois celle inhalée par le fumeur. Ceci explique les risques observés du tabagisme « passif » (57-59).

La réponse cellulaire à la fumée de tabac se fait en plusieurs étapes et implique essentiellement le contrôle du stress oxydant dans sa phase précoce, sans réponse inflammatoire patente (**figure 2**).

L'approche génomique fonctionnelle a permis ainsi de distinguer les évènements liés à l'exposition immédiate à la fumée de cigarette de ceux liés à l'exposition prolongée comme c'est le cas chez le fumeur (60). Dans le premier cas qui concerne la réponse précoce au stress oxydant, on observe dans la première heure une inhibition de l'apoptose et des MAPKs, suivie d'une phase intermédiaire au bout de quelques heures où sont impliquées les voies du stress protéique (protéines chaperons, système ubiquitine-protéasome), puis d'une phase de métabolisme des ERO et d'induction de gènes du remodelage tissulaire. Dans le second cas, il s'agit plutôt d'identifier des marqueurs d'exposition au tabagisme chronique, notamment la surexpression des gènes anti-oxydants, mais aussi des marqueurs de susceptibilité concernant le risque de progression vers la BPCO, l'emphysème ou le cancer (56, 61, 62). Des marqueurs d'emphysème sont ainsi identifiés avec une surexpression des gènes de synthèse de la matrice extracellulaire et de l'inflammation, une diminution des gènes liés à l'endothélium (63). Cette approche globale par l'identification précoce de nouveaux biomarqueurs de risque de cancer bronchique pourrait permettre d'optimiser le dépistage des fumeurs de risque à l'échelon individuel (64).





### 2. Hyperoxie

Les données de la littérature sur la réponse à l'hyperoxie sont nombreuses. Elles concernent tout d'abord la description clinique de ses effets nocifs de l'hyperoxie chez le nouveau-né et l'adulte (28). Certaines circonstances nécessitent d'augmenter la FiO2 afin de maintenir une hématose compatible avec la survie de l'organisme. Chez le nouveau-né, les FiO2 élevées sont utilisées dans le cadre de la prise en charge des détresses respiratoires, notamment du prématuré (maladie des membranes hyalines). Elles exposent à la dysplasie bronchopulmonaire (26). Cette approche thérapeutique qui est utilisée dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë chez l'adulte ne peut cependant être poursuivie sur une longue période sans entraîner de lésions tissulaires et une réponse inflammatoire intense (26, 28, 65). Les effets de l'hyperoxie au niveau cellulaire sont complexes et liés en partie à la

redondance entre les voies de signalisation concernées et leurs effets biologiques pleiotropiques.

Les premières études sur les effets de l'hyperoxie chez l'homme et l'animal sain remontent aux années 40 (66, 67). Au delà d'une FiO2 d'environ 60%, des symptômes respiratoires avec ou sans nausées sont ressentis, atteignant 80% des sujets après 12 à 16h d'exposition à une FiO2 proche de 1 (68). Les principaux symptômes observés sont une douleur rétrosternale majorée à l'inspiration (82%), une toux (54%), une congestion nasale (43%) et un mal de gorge (32%). Sur le plan fonctionnel respiratoire, la capacité vitale diminue significativement (de 400 ml à plus de 800 ml) dans 80% des sujets sous FiO2 > 0.5par rapport aux sujets sous air ambiant (68). Cet effet est expliqué en partie par la disparition de l'azote de l'air alvéolaire en présence d'O2 pur. L'azote ayant une faible solubilité, a la propriété de maintenir une certaine pression partielle qui favorise l'ouverture de l'alvéole : son absence entraîne l'atélectasie dite de dénitrogénation qui est d'autant plus fréquente, notamment lors d'une anesthésie générale dans les territoires à faible rapport V/Q (69, 70). Au niveau de la muqueuse on observe un œdème et une baisse de la clairance muco-ciliaire dans les 6 premières heures (71-73). Il n'est cependant pas observé d'altération des échanges alvéolocapillaires ni d'agression parenchymateuse notable pour des temps d'exposition allant jusqu'à 48h (73).

Les études mécanistiques chez l'animal objectivent des dommages au niveau endothélial, épithélial alvéolaire et une altération du surfactant. L'augmentation des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase n'est pas toujours retrouvée et dépend du type cellulaire (**annexe A**) (71, 74-77). Leur augmentation est observée pour une FiO2 modérément élevée, avec de plus une action protectrice vis-à-vis d'une exposition suivante à une FiO2 ou un stress oxydatif plus élevé (18). Par contre l'exposition immédiate à une forte FiO2 n'entraîne pas de réponse antioxydante suffisamment rapide pour protéger l'épithélium de la toxicité de l'hyperoxie (71, 74, 75, 77).

Si la réponse épithéliale au stress oxydant comme le peroxyde d'hydrogène conduit généralement à l'apoptose, on ne l'observe pas pour l'hyperoxie (78, 79) (**figure 3**). Cette distinction semble être médiée par différentes voies de signalisation, notamment l'activation précoce de NF $\kappa$ B, AP-1 et de certaines MAPKs comme p38 et JNK les unes étant proapoptotiques et les autres anti-apoptotiques (80, 81). En fait le type de mort cellulaire observé dépend du modèle animal et du type de cellule étudiée (82-84). Chez l'homme, on observe l'augmentation de marqueurs pro-apoptotiques mais le type de mort cellulaire est proche de la nécrose avec un gonflement du noyau et de la cellule évoquant une oncose (79, 85, 86). On observe un arrêt du cycle cellulaire médié par l'inhibiteur de kinases cyclinedépendant p21<sup>WAF/CIP1</sup> qui pourrait expliquer les anomalies de développement alvéolaire dans le contexte néonatal (87, 88). Un phénomène de tolérance à l'hyperoxie a été cependant rapporté comme étant lié à une augmentation de l'activité du complexe de la cytochrome oxydase Vb au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (89). Ainsi, il paraît possible d'atténuer la toxicité de l'hyperoxie par des approches pharmacologiques ciblées sur la chaîne respiratoire (89-91). Chez la souris, la surexpression d'IL-11 et du Leukemia inhibitor factor (LIF) confère une protection et améliore la survie cellulaire, sans entraîner de modification des principaux antioxydants (92, 93).





#### 3. Pollution atmosphérique

L'atmosphère est le seul milieu auquel l'homme ne peut se soustraire, à travers la respiration d'environ 15 000 L d'air par jour. La définition de la pollution atmosphérique donnée par le conseil de l'Europe en 1968 est assez large et évolutive : « il y a pollution atmosphérique lorsque la présence d'une substance étrangère ou une variation importante de la proportion de ses constituants est susceptible de provoquer un effet nuisible, compte tenu des connaissances scientifique du moment, ou de créer une gêne ». Une définition plus ciblée a été proposée dans la loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie de 1996 comme étant « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre

en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ». On peut ainsi distinguer les sources anthropiques des sources naturelles. Les sources anthropiques sont dominées par l'utilisation des énergies fossiles (trafic routier, transports aériens et maritimes), la pollution industrielle et les incinérateurs, l'agriculture, et les aérocontaminants à l'intérieur des locaux (gaz de combustion, composés organiques volatils de nombreux matériaux d'ameublement, fumée de tabac, radon, pneumallergènes, amiante...). Les sources naturelles concernent les éruptions volcaniques, les pollens, les orages (production d'oxydes d'azote) (94-97).

Les effets sur la muqueuse des voies aériennes dépendent de l'agent considéré (98). Quatre sont plus particulièrement surveillés qui permettent de calculer un indice de pollution de l'air appelé indice ATMO. Le dioxyde de soufre (SO2) entraîne une inflammation et une bronchoconstriction, son niveau est cependant beaucoup mieux contrôlé ces dernières décennies en France (99). Le dioxyde d'azote (NO2) qui est lié au trafic automobile est irritant notamment chez l'asthmatique et l'enfant (94). L'ozone (O3) est un gaz très irritant notamment chez l'asthmatique. Les particules fines dont la toxicité est d'autant plus grande que leur diamètre est plus petit (dépôt trachéo-bronchique entre 3-10  $\mu$ m de diamètre, alvéolaire quand inférieur à 3  $\mu$ m) sont dominées par les particules diesel. Ces particules ont une activité immunoadjuvante de l'immunité locale et sont en partie responsables de l'augmentation des manifestations allergiques et de l'asthme (100-102). Un des points communs à ces différents types d'agressions est de générer des ERO au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes, elles constituent ainsi un exemple typique de stress oxydant du quotidien (**figure 4**).

Figure 4: stress oxydant médié par les principaux polluants atmosphériques<sup>\*</sup>



\*: adapté d'après (103)

En utilisant une approche génomique et protéomique, un modèle de réponse séquentielle au stress oxydant généré par les particules diesel a été proposé (104). Celui-ci précise la place des voies de signalisation en fonction de l'intensité et/ou de la durée du stress initial. Ce modèle intégré est un bon exemple de l'apport de la biologie des systèmes à notre compréhension de ces réponses complexes (**figure 5**).

**Figure 5:** hiérarchisation de la réponse cellulaire au stress oxydant généré par les particules diesels<sup>\*</sup>



\*: adapté d'après (104)

# D. Place du stress oxydant dans la physiopathologie des bronchopathies chroniques

### 1. La BPCO

Le déséquilibre de la balance entre agents oxydants et systèmes antioxydants est un élément important dans la physiopathogénèse de la BPCO. Il entraîne l'inactivation de l'alpha-1 antitrypsine, principal inhibiteur de l'élastase des neutrophiles, et une réponse inflammatoire (105-109) (**figure 6**). Les sources principales d'ERO dans la BPCO sont exogènes avec la fumée de tabac, les polluants atmosphériques comme l'ozone, le dioxyde d'azote et les particules fines dont diesel. Elles proviennent aussi des macrophages et neutrophiles activés localement au sein de la muqueuse. Les enzymes antioxydantes intracellulaires sont exprimées à un faible niveau et non inductibles par le stress oxydant, tandis que les antioxydants extracellulaires comme la glutathion peroxidase sont augmentées (18).

Un nouveau mécanisme rendant compte de la réponse inflammatoire au stress oxydant a été proposé. Il fait intervenir le système histone acétylase/déacétylase (HAC/HDAC) sensible à l'équilibre redox (110). L'acétylation des histones permet de dérouler les séquences d'ADN qui sont ainsi accessibles aux facteurs de transcription de gènes notamment pro-inflammatoires. C'est la baisse d'activité de l'HDAC par le stress oxydant, notamment la fumée de tabac qui serait à l'origine de la réponse pro-inflammatoire (111). Ce mécanisme indépendant de l'activation de NF $\kappa$ B rend compte du phénomène de corticorésistance de la réponse inflammatoire chez le patient BPCO (112, 113). L'effet « anti-inflammatoire » bien connu de la théophylline mais dont les déterminants ne sont que partiellement compris serait en partie expliqué par l'induction de l'HDAC (114).

Pourtant si le stress oxydant est important dans la physiopathologie de la BPCO, les données concernant la protection de la fonction respiratoire par l'apport d'antioxydants comme le GSH, la N-acétylcystéine (NAC), ou les vitamines C et E n'ont pas démontré d'intérêt majeur (115) (116, 117).

Concernant les systèmes de défense innés, on observe une altération de la clairance muco-ciliaire en lien avec l'infiltration neutrophile. Leurs produits de sécrétion, notamment les sérines-protéases, altèrent les propriétés visco-élastiques du mucus et le battement ciliaire. La baisse du contenu en immunoglobuline A (IgA) explique en partie l'augmentation de susceptibilité du patient BPCO aux agents infectieux (118). Le mécanisme évoqué est une altération du récepteur pIg de la cellule épithéliale par l'élastase neutrophile et la protéinase-3 qui entraîne une baisse de la transcytose des Ig A. Ainsi l'altération de la clairance muco-ciliaire et de sécrétion des IgA tient une place importante dans la physiopathologie de la BPCO en instaurant un cercle vicieux propice à l'entretien de l'inflammation neutrophile et conduisant aux dommages de la muqueuse.

Les cellules épithéliales du patient BPCO sont une source importante de médiateurs inflammatoires notamment induits par la fumée de tabac (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF et IL-8 pour l'essentiel), de protéases, des facteurs de croissance Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), du TGF- $\beta$  et du récepteur à l'EGF (119). Ceci conduit à la prolifération des cellules basales de l'épithélium des voies aériennes et au développement d'une métaplasie malpighienne. Cependant si l'inflammation tient une place importante dans la pathogénèse de la BPCO, le fait que les antiinflammatoires comme la corticothérapie ne soient pas très efficace, à la différence de l'asthme, suggère un rôle prépondérant du stress oxydant (32, 104). Ceci est renforcé par l'augmentation de certains marqueurs de stress oxydant comme le

8-isoprostane exhalé chez le BPCO, qui est de plus augmenté lors d'une courte oxygénothérapie à faible débit (FiO2 à 0,28), traitement largement utilisé dans l'insuffisance respiratoire (120, 121).

De récentes études génomiques ont souligné l'augmentation d'expression des antioxydants chez des fumeurs comparés aux non-fumeurs (61). On observe de plus un lien entre l'augmentation d'expression des gènes de réponse au stress oxydant et la sévérité de la BPCO ainsi que la baisse des gènes impliqués dans l'angiogénèse en lien avec le degré des lésions d'emphysème (63). Ce phénotype de défense antioxydante est réversible dans les 2 ans suivant le sevrage tabagique, tandis que les gènes impliqués dans l'oncogenèse restent altérés, ce qui rend compte de la persistance du risque de cancer bronchique à distance du sevrage (56).

Figure 6: place du stress oxydant dans la BPCO<sup>\*</sup>



\*: adapté d'après (108, 115)

### 2. L'asthme

Les anomalies de l'épithélium bronchique chez l'asthmatique sont en partie liées à la fragilité du système jonctionnel serré (2, 122). Ceci favorise la pénétration des agents pathogènes de l'environnement qui vont ainsi pouvoir interagir directement avec les cellules inflammatoires présentes au sein de la muqueuse ainsi qu'avec les cellules dendritiques. Les particules diesel sont ainsi internalisées par les cellules dendritiques et entraînent un stress oxydant à l'origine de la suppression de la réponse Th1 au profit de la réponse pro-allergique Th2 (123). Les ERO et ERA sont augmentées ce qui aggrave les conséquences tissulaires et l'inflammation (17, 124, 125). Ainsi le stress oxydant intervient dans la physiopathologie de l'asthme, et représente un facteur d'exacerbation de la réponse inflammatoire (126).

La baisse des défenses anti-oxydantes, en particulier du système glutathion, confère aux cellules des voies aériennes de l'asthmatique une susceptibilité accrue au stress oxydant (127-129). Celui-ci est de plus intensifié lors de l'exposition à la pollution atmosphérique (100, 103, 130).

Au niveau des défenses innées, on observe une baisse de la clairance muco-ciliaire corrélée avec la sévérité de la maladie et qui contribue à la formation des bouchons muqueux (131). Les dérivés S-nitrosothiols qui représentent une forme protectrice de stockage des ERA et qui ont une action bronchodilatatrice, sont diminués chez l'enfant asthmatique (132). L'implication du système HAC/HDAC avec une augmentation de l'acétylation des histones pourrait favoriser l'expression des gènes pro-inflammatoires et expliquer en partie la corticorésistance chez l'asthmatique fumeur et dans les formes d'asthme sévère (133).

La déficience de la réponse interféron rend l'épithélium des voies aériennes de l'asthmatique plus sensible aux infections virales, en lui conférant une résistance à l'apoptose qui favorise la prolifération virale (134, 135). Plus récemment une analyse génomique effectuée sur un modèle murin d'asthme a souligné l'implication de la voie de signalisation STAT-6 et de l'arginase dans la régulation de la production de NO, des polyamines et du collagène (136). Ces médiateurs sont importants dans la régulation du tonus bronchique, de la prolifération cellulaire et du remodelage de l'épithélium.

La cellule épithéliale tient un rôle particulier dans l'orientation de la réponse inflammatoire locale et l'allergie par la production de la lymphopoïétine stromale thymique TSLP qui oriente l'activation des cellules dendritiques vers une réponse de type Th2 et la production de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, RANTES) (42, 122, 137). Le remodelage anormal de la muqueuse avec métaplasie épithéliale et hypersécrétion est médié par le récepteur tyrosine kinase EGF activé par la métalloprotéase A Disintegrin And Metalloproteinase ADAM-17 (138, 139). Son expression épithéliale est stimulée par le stress oxydant et lié à la modification des sécrétions de mucines ainsi qu'à la sévérité de l'asthme, ce d'autant qu'elle n'est pas modifiée par la corticothérapie (139-141).

La maladie asthmatique est cependant essentiellement caractérisée par l'inflammation éosinophile et l'efficacité des corticostéroïdes. Il n'apparaît donc pas primordial sur le plan thérapeutique de cibler les défenses antioxydantes. Cette approche pourrait cependant se révéler intéressante chez les asthmatiques sévères et/ou corticorésistants pour lesquels le stress oxydant occupe une place vraisemblablement plus importante.

### 3. La mucoviscidose

Une grande partie des anomalies observées au niveau de la muqueuse respiratoire de la mucoviscidose sont liées aux troubles ioniques secondaires à l'altération de la protéine CFTR. Ceux-ci sont à l'origine de la baisse de la phase sol et de l'altération de la clairance muco-ciliaire. La résultante est une obstruction des glandes bronchiques par des bouchons muqueux et une inflammation à neutrophile aboutissant à la formation des bronchectasies. Cette évolution est classiquement liée à la colonisation microbienne chronique de la muqueuse bronchique mais un état pro-inflammatoire intrinsèque en lien avec les troubles ioniques est identifié dès l'âge fœtal et préexiste aux premiers contacts avec les agents infectieux (142-145).

Une approche génomique a récemment souligné le rôle angiogénique des cellules épithéliales qui expriment les facteurs VEGF-A, VEGF-C,  $\beta$ FGF et le placenta growth factor (PIGF) (**figure 7**) (146). L'inflammation est particulièrement marquée dans la mucoviscidose, notamment par la colonisation microbienne chronique et l'infiltration à polynucléaires neutrophiles. Il existe une intense protéolyse avec augmentation des ERO et ERA qui aboutit à la nécrose des cellules épithéliales et au profond remodelage des voies aériennes (147).

Le rôle de CFTR dans le maintien de l'équilibre redox est important dans la mesure où il permet le transport transmembranaire du GSH (148). Ainsi on observe une diminution de l'efflux de GSH dans la mucoviscidose qui contribue à maintenir un état d'oxydation élevé à la surface des voies aériennes (149-151). Au niveau intracellulaire, il existe une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale responsable d'une majoration du stress oxydant (152). Ceci pourrait-être expliqué par une augmentation d'activité de la pompe Na/K ATPase basolatérale qui élève la consommation d'O2 ce qui aggraverait l'hypoxie cellulaire. Cette hypoxie favorise la production d'ERO et de HIF avec *in fine* activation de la cascade inflammatoire *via* NF- $\kappa$ B et MAPKs (153). Comparativement à des cellules épithéliales normales avec lesquelles on observe une apoptose en présence de *Pseudomonas aeruginosa*, la mutation de CFTR confère à la cellule épithéliale une résistance à l'apoptose liée à l'absence d'expression de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p21<sup>WAFI/CIP1</sup> et au remodelage de l'épithélium (154, 155).

Concernant la voie du NO, une baisse de sa concentration dans les voies aériennes a été rapportée dès le plus jeune âge avant même l'atteinte respiratoire clinique (156). Ceci suggère que l'altération de la production de NO est un évènement précoce qui rend compte de la susceptibilité accrue des voies aériennes du patient atteint de mucoviscidose vis-à-vis des agents viraux et autres pathogènes microbiens. Il a été ainsi montré que cette inaptitude était en rapport avec une atteinte élective de la voie STAT-1 qui entraîne l'absence d'activation de NOS2. Les voies NF- $\kappa$ B et de réponse à l'interféron comme PKR (dsRNA-activated protein kinase) semblent conservées (84, 157).





\*: adapté d'après (146)

### E. Systèmes de défense extracellulaire

### 1. Clairance muco-ciliaire

Le système muco-ciliaire représente une des premières barrières physiques au niveau des voies aériennes. La majorité des particules et agents infectieux inhalés sont retenus par le mucus qui repose sur le tapis ciliaire avant d'être évacué du système respiratoire dans un mouvement à sens unique allant des bronchioles distales jusqu'à la glotte. L'escalator mucociliaire progresse à une vitesse d'environ 10 mm par minute grâce au battement ciliaire parfaitement coordonné de 10 à 20 hertz. Celui-ci comprend trois phases: la première active et propulsive avec contact entre l'extrémité du cil et le tapis muqueux, la deuxième de retour à la position de départ, puis un temps de repos avant de débuter le cycle suivant. Les principaux déterminants du battement ciliaire sont la qualité du liquide dans lequel il évolue et le tapis muqueux qui le surplombe. Ainsi la hauteur de la couche liquide périciliaire d'environ 7  $\mu$ m à la base de l'épithélium appelée phase « sol » est-elle parfaitement régulée afin de permettre aux cils de n'être en contact avec la couche muqueuse que lorsqu'ils se contractent. Cette couche contient de nombreux éléments dont les substrats énergétiques et ioniques (liquide isotonique au plasma) indispensables à l'activité contractile, ainsi que du monoxyde d'azote.

Un certain nombre de pathologies respiratoires sont liées à un dysfonctionnement du système vibratile. Les anomalies touchent soit l'appareil ciliaire, soit la production du NO (qui accélère la clairance muco-ciliaire), soit la régulation de la quantité et de la qualité de la phase sol. C'est le cas en particulier des dyskinésies ciliaires et de la mucoviscidose. De manière plus générale, une altération de la clairance muco-ciliaire est aussi retrouvée dans des bronchopathies plus fréquentes comme l'asthme et la bronchopathie chronique obstructive (158).

### 2. Mucus, mucines et immunoglobulines

Le tapis muqueux de 7 à 70  $\mu$ m de hauteur représente la phase « gel » de l'équipement muco-ciliaire. Sa viscosité détermine la facilité avec laquelle les cils vont pouvoir le faire progresser à leurs extrémités sans y rester collés. Les facteurs importants de sa viscosité sont notamment l'état d'hydratation (159) et sa composition en glycoprotéines de mucines (158, 160). Il est produit par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses.

On dénombre à ce jour 18 gènes de mucines exprimées dans les voies aériennes qui sont réparties en deux groupes: les mucines associées aux membranes (MUC1, MUC4 et MUC16) qui agissent comme récepteurs d'agents pathogènes couplés aux voies de signalisation intracellulaires, et les mucines sécrétées, beaucoup plus volumineuses, qui forment la phase gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC19). Elles sont responsables de l'humidification des voies aériennes, et constituent la première barrière de défense de l'hôte. Elles sont le support de la réponse immunitaire immédiate innée contre les pathogènes et les particules qu'elles retiennent et véhiculent en dehors du tractus respiratoire. La régulation de leur synthèse est principalement sous le contrôle de l'epidermal growth factor (EGF) et de son interaction avec son récepteur sur l'épithélium respiratoire (161). Une augmentation de

synthèse et de sécrétion de mucines est observée dans la plupart des bronchopathies inflammatoires chroniques, en lien avec les troubles ioniques, les agents infectieux (*P. aeruginosa, S. aureus*) et l'inflammation neutrophile locale (138, 158, 162). Si l'hypersécrétion est un phénotype classique de la réponse de l'épithélium à l'agression, son caractère délétère est avéré car elle participe à la formation des bouchons muqueux qui aggrave l'obstruction des voies aériennes, et augmente le risque d'exacerbation respiratoire (162, 163).

Les immunoglobulines A sécrétoires de la phase gel font partie des défenses de première ligne au niveau de l'appareil bronchique. Elles sont synthétisées par les lymphocytes B puis véhiculées à la surface par transcytose des cellules épithéliales. Leur rôle est pour l'essentiel de neutraliser les microorganismes (bactéries et virus), mais elles interviennent aussi en tant qu'immuno-modulateur de l'immunité acquise en contrôlant la réponse immunitaire notamment les phénomènes de tolérance (118, 164).

### 3. Systèmes antioxydants

L'environnement oxydant particulier du système respiratoire est finement contrôlé par un système de défenses antioxydantes à la fois extra- et intra-cellulaire (12, 165) (**tableau IV**). De nombreux travaux ont montré l'importance de ce système pour maintenir l'intégrité de l'épithélium respiratoire qui ne peut résister longtemps au stress oxydatif (18, 165).

On distingue les systèmes antioxydants en trois catégories. Les défenses primaires préviennent la formation d'ERO. Il s'agit essentiellement de la transferrine, de la lactoferrine et de la ceruloplasmine (ou ferroxydase) présentes dans les liquides extracellulaires. Elles agissent en captant le fer ce qui empêche son utilisation dans les réactions d'oxydation. Les défenses secondaires piègent et inactivent les ERO. On trouve dans cette catégorie des enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxidase (GPx), ainsi que de nombreuses molécules antioxydantes détaillées dans le tableau IV. Les défenses tertiaires interviennent pour éliminer ou réparer les molécules altérées par l'oxydation, essentiellement les protéines et l'ADN.

Un des plus importants systèmes de protection précoce est représenté par le GSH dont le ratio intracellulaire entre sa forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG) module l'activation de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire et antioxydante (65, 166). La place des défenses antioxydantes sera abordée en détail dans le contexte du chapitre V. Si leur rôle de protection de l'épithélium des voies aériennes est acquis, leur utilité en tant que thérapeutique pour contenir le stress oxydant et restaurer le déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants dans des pathologies comme l'asthme, la BPCO ou la mucoviscidose n'est pas établi (167).

Tableau IV: principaux antioxydants présents au niveau des voies aériennes\*

Catégorie	Structure	Localisation
Enzymes		
Catalase	Protéine à hème	Cytoplasme, peroxisome, FEC
Superoxyde dismutase	CuZn-SOD (SOD-1)	Cytoplasme
	Mn-SOD (SOD-2)	Mitochondrie
	Cu-SOD (EC-SOD)	FEC
Cycle du glutathion (GSH) :		
- GSH peroxidase	Protéine à sélénium	Cytoplasme, mitochondrie et FEC
- GSH réductase	Dimère	Cytoplasme et mitochondrie
Hème oxygénase	HO-1, HO-2 (hème)	Cytoplasme
G6PD et 6-PGDH	Enzyme à NADP	Cytoplasme et mitochondrie
Composés liposolubles		
Vitamine E (α-tocophérol)		Membranes et FEC
β-carotène	Précurseur de la vitamine A	Membranes et tissus
Bilirubine	Catabolisme de l'hème	Tissus et sang
Composés hydrosolubles		
Vitamine C (ac. ascorbique)		Fluides intra- et FEC
Acide urique	Base purine oxydée	Fluides intra- et FEC
Glutathion	Tripeptide	Fluides intra- et FEC
Lactoferrine, transferrine		Fluides intra- et FEC
Céruloplasmine		Fluides intra- et FEC
Glucose	Hydrate de carbone	Fluides intra- et FEC
Cystéine	Acide aminé	Fluides intra- et FEC
Cystéamine	Acide aminé	Fluides intra- et FEC
Taurine	$\beta$ -amino-acide	Fluides intra- et FEC
Protéines de haut PM		
Mucines	Glycoprotéine	Voies aériennes
Albumine	Protéine	Fluides intra- et FEC

\* : adapté d'après (165). FEC : fluides extracellulaires

# F. Principales voies de signalisation impliquées dans la réponse de l'épithélium respiratoire à l'hyperoxie

L'étude de la réponse à l'hyperoxie est complexe car la cellule épithéliale, en tant que barrière physique, est la cible directe de l'hyperoxie, mais aussi la source d'un certain nombre d'ERO et d'ERA. Chacun de ces stimuli exerce des effets sur une série de voies de signalisation qui ont un certain degré de chevauchement ce qui explique que l'on retrouve des similitudes de réponse en fonction des différents agents oxydants comme la fumée de tabac, les fibres d'asbeste (qui sont un modèle de stress oxydant), les particules diesels et l'hyperoxie. Les effets observés peuvent être distingués en 4 catégories selon qu'ils concernent la mort cellulaire, la réponse au stress, la prolifération ou l'inflammation (168).

### 1. Voie des MAP kinases

La plupart des agents oxydants entraînent la phosphorylation de la cascade des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs) via la dimérisation et activation du récepteur membranaire EGF (169). Ces médiateurs sont très sensibles à l'équilibre entre les kinases et phosphatases qui régulent leur voie. Elles interviennent dans la réponse précoce au stress oxydant. On distingue trois voies majeures: les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERKs), les kinases c-Jun-NH2-terminal (JNKs) et les kinases p38. Si des similitudes existent dans les réponses à différents stress oxydants, la fumée de tabac active les 3 voies, tandis que l'hyperoxie et les fibres d'asbeste activent préférentiellement les voies ERKs au niveau épithélial respiratoire. Les médiateurs en aval appartiennent essentiellement à la famille des facteurs de transcription AP-1 (familles c-Fos et c-Jun), ainsi que NF- $\kappa$ B, qui régulent de nombreuses fonctions dont la prolifération et la différentiation cellulaire, la réponse au stress et l'inflammation. Ce qui détermine l'évolution de la cellule vers l'apoptose ou la prolifération dépend de l'intensité de la réponse ERK par les différents stimuli et le nombre de voies stimulées (**figure 8**).

Figure 8: mécanismes d'activation des MAPKs et d'AP-1 par le tabac et les fibres d'asbeste<sup>\*</sup>



\*: adapté d'après (169)

### 2. Voie impliquant NF-ĸB

NF-κB est un facteur de transcription redox sensible impliqué dans la plupart des réponses inflammatoires. Au repos, il est couplé à la protéine inhibitrice I-κB et maintenu dans le cytoplasme. Les premières étapes de l'activation de NF-κB passent par la phosphorylation de la sous-unité I-κB favorisée par le stress oxydant, qui entraîne l'ubiquitination d'I-κB puis sa dégradation par le protéasome. NF-κB ainsi libéré va pouvoir gagner le noyau cellulaire et activer de nombreux gènes, notamment des CK pro-inflammatoires et des protéines de la phase aigue de réponse au stress (**tableau V**). Son activation et ses effets dépendent cependant de nombreux facteurs dont le type de stimulus, le type cellulaire et son environnement. Au niveau de l'épithélium des voies aériennes, les ERO seules ne semblent ainsi pas suffisantes pour entraîner son activation (170, 171). Celle-

ci est obtenue par la synergie entre plusieurs stimuli comme l'hyperoxie, le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (172).

Les interactions de NF- $\kappa$ B avec d'autres facteurs de transcription ajoute un degré supplémentaire de régulation au niveau transcriptionnel. L'effet pouvant être synergique (fixation des 2 facteurs de transcription sur le même promoteur) ou transactivateur (positif lorsque la fixation d'un facteur de transcription est facilitée par NF- $\kappa$ B, ou négatif dans le cas contraire) (173). Une interaction type transactivation positive est possible entre NF- $\kappa$ B et AP-1 qui permettrait une plus grande sélectivité dans la réponse transcriptionnelle (174). La réponse en terme de protection et/ou tolérance au stress oxydant n'est pas univoque, car si l'activation de NF- $\kappa$ B a un rôle protecteur anti-apoptotique (175), l'augmentation de GSH intracellulaire empêche la dégradatation d'I- $\kappa$ B et l'activation de NF- $\kappa$ B, ce qui permet d'atténuer les effets délétères de la réponse inflammatoire (171, 176, 177).

Tableau V: principaux gènes régulés par NF-κB

Cytokines	Interféron
ΤΝFα, ΤΝFβ	IFN-β
IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12,	
	Molécules d'adhésion
Chimiokines	ICAM-1, VCAM-1
IL-8, Gro- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	E-sélectine
MIP-1a	
MCP	Intégrines
	Alpha-intégrines
Facteurs de croissance	Béta-intégrines
GM-CSF, G-CSF	
	Autres
Protéines de la phase aigue	NOS
Protéine C réactive (CRP)	PLA2
LPS binding protein	Cyclooxygénas-2

### 3. Voie impliquant AP-1

Cette famille de facteurs de transcription est particulièrement sensible aux modifications de l'équilibre redox environnant (178, 179). Sa place précoce en tant que

facteur de la réponse immediate (immediate early genes - IEGs) à de nombreux stimuli en fait une voie d'intérêt dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la différentiation cellulaire, l'apoptose, les défenses innées et la réponse inflammatoire (180).

Les principaux stimuli d'AP-1 sont les MAPKs (notamment phosphorylation par ERKs), les fibres d'asbeste et le stress oxydant (180, 181). La famille de protéines AP-1 est constituée d'un domaine de fixation à l'ADN qui lui permet de se fixer à des séquences consensus appelées éléments de réponse antioxydants (antioxidant response element - ARE) présents au niveau de nombreux promoteurs (182). La partie plus fonctionnelle est le domaine leucine-zipper qui leur permet d'interagir avec de nombreuses protéines en modulant la réponse AP-1 qui est fonction de l'hétérodimère formé et de l'environnement cellulaire (180).

C-Fos et c-Jun sont les principaux membres de l'hétérodimère AP-1. Ils sont présents à des niveaux variables en fonction des types cellulaires. Le niveau de c-Fos est en général très bas et variable selon les lignées de cellules cancéreuses pulmonaires (183, 184). Après stimulation, on obtient un pic d'ARNm à 15-30 min puis un retour à l'état de base en 2h. Mais il existe de nombreuses modifications post-transcriptionnelles qui rendent compte des effets pleïotropes d'AP-1. On observe ainsi un phénomène d'autorégulation positive avec c-Jun et négative avec c-Fos (185). Si la place d'AP-1 dans la physiopathologie de nombreuses maladies respiratoires est acquise, de nombreuses différences existent quant à ses effets. Ceci met en lumière l'importance des types de cellules impliquées, des facteurs modulateurs environnementaux et phénomènes de transactivation entre voies de signalisation ainsi que la chronologie d'intervention de chacun d'eux. L'approche globale de ces réponses par la génomique fonctionnelle et la protéomique devrait permettre de mieux préciser la séquence des évènements et les cibles critiques dans ces réponses complexes.

## V. Contexte et objectifs du travail

L'étude des mécanismes de la réponse de l'épithélium des voies aériennes à l'agression est particulièrement complexe. Il s'agit d'un sujet à fort impact qui reste une préoccupation constante de la communauté scientifique et médicale avec de nombreux enjeux de santé publique. Une meilleure compréhension de ses dysfonctionnements nourrit en effet l'espoir d'améliorer le dépistage des pathologies respiratoires par l'identification de
marqueurs précoces de risque et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de mieux contrôler leur évolution.

J'ai commencé à travailler sur ce thème par l'étude des effets de la pollution atmosphérique, notamment les particules diesels sur l'épithélium des voies aériennes. Cellesci sont en partie responsables de la recrudescence des maladies allergiques et respiratoires dont l'asthme depuis plusieurs décennies. Leur effet s'exerce notamment en initiant un stress oxydant cellulaire à l'origine de la réponse inflammatoire. Les types de cellules concernées sont en particulier les cellules épithéliales des voies aériennes et les cellules de Langerhans intra-épithéliales. Ces dernières ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunoallergique, dont les déterminants sont à la fois liés aux facteurs paracrines libérés par la cellule épithéliale (notamment le GM-CSF), et le stress oxydant intracellulaire généré après l'internalisation des particules diesels dans le cytoplasme. Elles ne semblent cependant pas suffisantes pour altérer les défenses antimicrobiennes, du moins sur un modèle de macrophage infecté par *Mycobacterium bovis in vitro*. Ces premiers travaux sont regroupés dans les **annexes B à E**.

J'ai poursuivi dans cette thématique au sein du laboratoire de pathobiologie du Pr. Serpil Erzurum à la Cleveland Clinic Foundation par l'étude des effets de l'hyperoxie sur les cellules épithéliales des voies aériennes. Le mécanisme de la toxicité de l'hyperoxie est le plus souvent étudié sur des modèles animaux ou sur des cultures de lignées cellulaires *in vitro*. Ces approches précisent l'implication des voies de signalisation présentées au chapitre F sur la survie cellulaire, la prolifération, la réponse au stress (168, 176, 177). Elles soulignent la complexité des effets de l'hyperoxie avec des différences notables selon les modèles étudiés qui ne facilitent pas notre compréhension. Ceci est en partie lié aux nombreuses interactions entre voies de signalisation, l'existence d'un certain chevauchement entre elles et à la redondance des effets des médiateurs impliqués (176, 177, 186).

Il était difficile jusqu'à l'avènement récent de la génomique fonctionnelle d'approcher le caractère dynamique et intégré de la réponse cellulaire à l'hyperoxie par rapport à l'approche classique qui consiste à examiner la place de certaines voies indépendamment les unes des autres. Ainsi l'étude de la biologie des systèmes par une analyse bioinformatique qui est actuellement standardisée, permet de hiérarchiser et mieux appréhender la place des différents systèmes biologiques au niveau cellulaire et de l'organisme. Mon premier travail propose une approche globale transversale des voies impliquées au niveau transcriptionnel par l'hyperoxie au niveau de la cellule épithéliale bronchique humaine *in vivo*, sans hypothèse mécanistique a priori. L'intérêt majeur de l'étude génomique est qu'elle ne nécessite que peu d'ARN et de prélèvement cellulaire. Cette perspective rend possible l'exploitation de petits prélèvements peu invasifs réalisés *in vivo* chez l'homme et peu modifiés. Ceci ouvre l'accès à une quantité d'information sans précédent, d'autant plus pertinente qu'elle se rapproche au plus près des conditions *in vivo*. Outre l'amélioration des connaissances que cette technologie nous apporte, elle permet de mieux identifier l'importance et le rôle clé de certains médiateurs. Ceux-ci représentent un enjeu considérable pour la recherche et le développement de nouveaux marqueurs de toxicité et de cibles d'intérêt thérapeutique (61, 63, 187-189).

Le stress oxydant étant étroitement lié à la production d'ERA, mon travail s'est ensuite focalisé sur l'étude de la régulation d'expression de la NOS2 au niveau épithélial respiratoire sur un modèle de culture cellulaire *in vitro*. La NOS2 dont la régulation est essentiellement transcriptionnelle, est dépendante des facteurs de transcription sensibles à l'équilibre redox comme NF-kB, STAT-1 et AP-1 (190). Des travaux du laboratoire d'accueil avaient confirmé l'importance de c-Fos et de STAT-1 dans l'activation de NOS2 ainsi que l'interaction entre les voies AP-1 et JAK/STAT-1 (191). Dans ce contexte et en utilisant la technologie de l'interférence ARN, j'ai testé l'hypothèse que le facteur de transcription redox-sensible c-Fos tient un rôle clé dans cette réponse.

## VI. Mécanismes de la réponse épithéliale respiratoire à l'hyperoxie chez l'homme *in vivo*

## A. Contexte et enjeu

L'épithélium respiratoire s'est adapté à l'environnement gazeux oxydatif avec lequel il est en contact permanent grâce à la présence de tout un arsenal extracellulaire de défenses antioxydantes. Celui-ci lui permet de maintenir les systèmes antioxydants intracellulaires à un niveau relativement bas afin de contrôler le degré du stress oxydant et de ses conséquences sur l'homéostasie tissulaire. Cette particularité le rend cependant particulièrement vulnérable dès l'instant que la barrière muco-ciliaire est altérée. Cette situation se rencontre dans trois types de situation. Tout d'abord sur une muqueuse respiratoire normale soumise à une forte pression environnementale lors d'une exposition chronique à des agents toxiques comme certains polluants atmosphériques gazeux (ozone, oxydes d'azote) ou particulaires (fibres d'asbeste, particules diesels), la fumée de tabac et les infections. La deuxième situation est celle où la muqueuse est fragilisée par différentes anomalies intrinsèques de la fonction muco-ciliaire, du système de défenses antixoydantes ou de la réponse immunitaire. Les pathologies concernées sont essentiellement les dyskinésies ciliaires, la mucoviscidose, les déficits immuns variables et l'asthme. La dernière situation concerne une muqueuse fragilisée par une première agression qui est exposée à une FiO2 élevée (FiO2 > 0,5) dans le but de maintenir une hématose compatible avec la survie de l'organisme. Cette condition se rencontre dans le cadre du syndrome de détresse respiratoire secondaire à des pneumopathies de cause diverses avec hypoxémie sévère.

# B. Intérêt de l'approche fonctionnelle génomique dans l'étude intégrée de la biologie des systèmes

Le raisonnement en physiologie s'est profondément modifié avec les données fournies par l'étude des génomes et les bouleversements technologiques qui l'ont accompagné, définissant l'ère du postgénome. L'approche « classique » en physiologie consistait à étudier une fonction (exemple : réponse au stress oxydant) puis d'en préciser les mécanismes au niveau protéique (rôle du glutathion, des enzymes antioxydantes...). Le support génétique n'étant souvent qu'une hypothèse de travail accessoire. Le raisonnement adopté ici est de passer d'une vision globale d'une fonction pour en préciser les déterminants à l'échelon cellulaire et moléculaire : ayant identifié une fonction, on peut apporter une explication physiopathologique par des voies plus ou moins détournées à sa dérégulation dans une maladie donnée (stress oxydant responsable d'un déficit en anti-protéases et lésions d'emphysème ; diminution de la superoxyde dismutase et majoration des effets du stress oxydant dans l'asthme ; baisse du glutathion, majoration du stress oxydant et susceptibilité accrue aux agents infectieux dans la mucoviscidose...) (29, 30, 192).

L'approche fonctionnelle génomique analyse simultanément l'ensemble des gènes exprimés par un type cellulaire ce qui permet d'avoir une vision intégrée et non parcellaire de sa fonction. Ainsi, à partir d'une maladie ou d'une condition donnée on précise par une approche d'expression différentielle (le plus souvent par comparaison avec une situation normale), non pas le gène impliqué comme c'est le cas de la génétique inverse (exemple de la mucoviscidose et CFTR), mais l'ensemble des gènes dérégulés. Cette puissante approche génomique permet de préciser le rôle de nombreux gènes dans diverses fonctions, en particulier les phénomènes de transrégulations (193). Ceci est rendu possible grâce au séquençage du génome entier, et sa classification ontologique unifiée (voies biologiques, fonctions moléculaires, et composants de la cellule) (194, 195). De nombreux outils bio-informatiques ont été proposés pour automatiser une partie de cette analyse à grande échelle afin d'en distinguer les principales voies et gènes impliqués dans la condition étudiée (196-201). L'étape finale consiste à valider les nouvelles hypothèses posées à partir de l'analyse du transcriptome au niveau protéique pour expliquer la/les dysfonctions. Cette approche est particulièrement utile pour étudier l'aspect dynamique d'une réponse biologique en précisant la place relative des différentes voies impliquées et leur chronologie. Elle est actuellement largement diffusée dans l'étude de nouveaux marqueurs pronostiques et de réponse aux traitements notamment en oncologie humaine (202-207).

Nous avons ainsi utilisé pour la première fois chez l'homme sain l'approche génomique fonctionnelle dans l'étude des effets de l'hyperoxie sur l'épithélium des voies aériennes *in vivo* (**figure 9, tableau VI**).

Figure 9: principales étapes du protocole d'étude



33 volontaires sains $(28 \pm 1 \text{ an})$	21% O2	100% O2
		$(14,8 \pm 0,2 h)$
Fibroscopie		
Trachéobronchite	0%	24/33 (73%)
(rougeur, œdème, hyperhémie)		
Spirométrie		
VEMS (% réf.)	$102\pm2$	$102\pm2$
CV (% réf.)	$97\pm2$	$97 \pm 2$
VEMS/CVF (%)	$106 \pm 1$	$107 \pm 1$
CPT (% réf.)	$96 \pm 2$	$96\pm2$
DLCO (% réf.)	$96\pm3$	$90 \pm 3$
Gazométrie artérielle		
PaO2 (kPA)		$68 \pm 0,7$
PaCO2 (kPa)		$4,8 \pm 0,1$
pH		$7,42 \pm 0,1$
Brosse		
Nombre total de cellules (10 <sup>6</sup> )	$16\pm 2$	$20\pm2$
Nombre de cellule / brosse (106)	$1,1 \pm 0,3$	$1,5\pm0,1^{\dagger}$
C. épithéliales (% du nombre total)	$88\pm2$	$84\pm2$
- ciliées (% C. épithéliales)	76 ± 1	78 ± 1
- sécrétoires	$4,2\pm0,4$	<i>3,8</i> ± <i>0,3</i>
- basales	<i>12,9</i> ± <i>0,8</i>	$12,4\pm0,6$
- autres	6,5 ± 0,6	5,3 ± 0,6
Neutrophiles	$7,5 \pm 1,7$	$11 \pm 2$
Eosinophiles	$0,3\pm0,1$	$0,4 \pm 0,1$
Macrophages	$2,7 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3$
Lymphocytes	$1,1 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,4$

**Tableau VI:** caractéristiques des sujets sains avant et après exposition à l'hyperoxie<sup>\*</sup>

\* : adapté d'après (71). † : P < 0.03 vs 21% O2

## C. Manuscrit 1

<u>Arnaud Chambellan</u>, Paul Cruickshank, Patrick McKenzie, Steven B. Cannady, Katalin Szabo, Suzy A. A. Comhair, and Serpil C. Erzurum. Gene Expression Profile of Human Airway Epithelium Induced by Hyperoxia *In Vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 35: 424-435

## Gene Expression Profile of Human Airway Epithelium Induced by Hyperoxia In Vivo

Arnaud Chambellan, Paul J. Cruickshank, Patrick McKenzie, Steven B. Cannady, Katalin Szabo, Suzy A. A. Comhair, and Serpil C. Erzurum

Institut du Thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France; and Departments of Pathobiology, Pulmonary, Allergy, and Critical Care Medicine, The Head and Neck Institute, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio

Hyperoxia leads to oxidative modification and damage of macromolecules in the respiratory tract with loss of biological functions. Given the lack of antioxidant gene induction with acute exposure to 100% oxygen, we hypothesized that clearance pathways for oxidatively modified proteins may be induced and serve in the immediate cellular response to preserve the epithelial layer. To test this, airway epithelial cells were obtained from individuals under ambient oxygen conditions and after breathing 100% oxygen for 12 h. Gene expression profiling identified induction of genes in the chaperone and proteasome-ubiquitin-conjugation pathways that together comprise an integrated cellular response to manage and degrade damaged proteins. Analyses also revealed gene expression changes associated with oxidoreductase function, cell cycle regulation, and ATP synthesis. Increased HSP70, protein ubiquitination, and intracellular ATP were validated in cells exposed to hyperoxia in vitro. Inhibition of proteasomal degradation revealed the importance of accelerated protein catabolism for energy production of cells exposed to hyperoxia. Thus, the human airway early response to hyperoxia relies predominantly upon induction of cytoprotective chaperones and the ubiquitin-proteasome-dependent protein degradation system to maintain airway homeostatic integrity.

Keywords: airways; gene expression; hyperoxia; proteasome; ubiquitin

Oxygen, one of the most abundant elements in our world, is essential for the oxidation of organic compounds to generate the energy needed to sustain life. Under ambient conditions, reactive oxygen species (ROS) are generated at a low level in lung cells during aerobic metabolism. To minimize the oxidant injury that is a consequence of aerobic life, the human lung is endowed with an integrated antioxidant system, which detoxifies reactive products (1-4). However, excessive ROS may overwhelm the antioxidant system and result in damage to major cellular components, including membrane lipids, proteins, carbohydrates, and DNA (1, 5-8). The pathophysiologic consequences of this injury may include cell death, and tissue inflammation and damage. This is particularly evident during conditions of increased oxygen exposure for medical therapy (4, 9, 10). The bronchial epithelium is particularly vulnerable to the effects of airborne oxidative stress as the moist mucosal surface of the airway is in direct contact with the environment (11). Hyperoxia leads to oxidant injury in the respiratory tract, which is manifest as acute tracheobronchitis with edema and decrease in mucocili-

(Received in original form July 8, 2005 and in final form May 4, 2006)

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 35. pp 424-435, 2006

ary clearance (12, 13). Oxidative damage of proteins and loss of biological function is one defined end-point of hyperoxic injury (1, 5-8). In the past, significant attention has focused on clarifying the role of antioxidant enzymes such as superoxide dismutases, catalase, or glutathione peroxidases in mitigating airway damage resulting from hyperoxia (6, 7, 12, 14, 15). Studies show that exposure to lower levels of hyperoxia can lead to upregulation of antioxidant defenses, which are protective in subsequent high-level (> 95%) oxygen exposure (1). However, most studies also show that in response to immediate exposure to > 95% oxygen, antioxidant enzymes are expressed at low levels, and are unable to upregulate rapidly enough to protect against injury (6, 7, 12, 15). In this context, we hypothesized that in the absence of increased protection against oxidative injury, clearance pathways for oxidatively damaged proteins may have a central role in the early response of cells to maintain the homeostatic integrity of the epithelial layer. Substantial evidence indicates that the ubiquitin-proteasome system is responsible for degrading altered proteins in the cytoplasm, nucleus, and endoplasmic reticulum of eukaryotic cells (16). Using a functional genomic approach, we analyzed the mRNA levels of human bronchial epithelial cells obtained by brushing at bronchoscopy from healthy volunteers before and after 12 h exposure to >95% oxygen. Genes related to proteasome ubiquitin-dependent protein catabolism, cell cycle, or with an oxidoreductase activity were identified as primary early responses to in vivo hyperoxia. In complementary studies, the induction of chaperones, ATP synthesis, and increased ubiquitination was confirmed in human airway epithelial cells exposed to hyperoxia in vitro.

## MATERIALS AND METHODS

## Study Population and Exposure to Hyperoxia In Vivo

To evaluate human bronchial epithelial cell hyperoxia-related gene expression in vivo, healthy nonsmoking volunteers were studied. All had normal histories, physical examinations, chest X-ray, and spirometry. Exclusion criteria included prolonged exposure to second-hand smoke at home or work; exposure to environmental dusts or toxic agents known to cause pulmonary disease; a history of recurrent episodes of breathlessness, chest tightness, cough, and/or sputum production; human immunodeficiency virus infection; and a history of respiratory infection in the previous 6 wk (7, 12). Volunteers underwent fiberoptic bronchoscopy with cytology brushings from the right main stem bronchus to obtain bronchial epithelial cells at room air (group normoxia). They returned 2 wk later and were exposed at > 95% oxygen for 12 h by a full, tight-fitting mask, after which they immediately underwent a bronchoscopy for sampling of bronchial epithelial cells (group hyperoxia) as previously described (7, 12, 17). In addition, other healthy volunteers underwent bronchoscopy to collect bronchial epithelial cells for culture with exposure to normoxia and hyperoxia in vitro. The study was approved by the Institutional Review Board, and written informed consent was obtained from all volunteers.

## Preparation of RNA and Microarray Hybridization

Normal bronchial epithelial cells were obtained by cytology brushings from second- and third-order bronchi as previously described (12).

This study was supported by Al70649, HL60917, and M01 RR018390 from the National Center for Research Resources. A.C. was supported by grants from the Collège des Professeurs de Pneumologie.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Serpil C. Erzurum, M.D., Chair, Department of Pathobiology, Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute, 9500 Euclid Ave/NC22, Cleveland, OH 44195. E-mail: erzurus@ccf.org

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2005-0251OC on May 11, 2006 Internet address: www.atsjournals.org

Total RNA from fresh human bronchial epithelial cells was isolated by the Guanidium Thiocyanate-Cesium Chloride (GTC-CsCl) gradient method, and first subjected to formaldehyde-agarose gel electrophoresis to confirm its integrity. Samples showing degradation of ribosomal RNA by visual inspection under ultraviolet light were discarded. Total RNA (8 µg) was converted into double-stranded cDNA with the Super-Script II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) using an oligo(18)<sub>24</sub> primer containing a T7 RNA polymerase promoter (Genset, La Jolla, CA). cDNAs were purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The cDNA was used as a template for synthesis of the biotinylated cRNA transcript using the BioArray RNA transcript labeling kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). cRNAs were purified from an in vitro transcription reaction using RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). After fragmentation into  $\approx 200$  bp by alkaline treatment (200 mM tris-acetate, pH 8.2/500 mM potassium acetate/ 150 mM magnesium acetate), biotinylated cRNA was hybridized to the test chip as specified by Affymetrix; when satisfactory, 15µg of the labeled cRNA were hybridized overnight onto the Affymetrix HG-U133A GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA), which contained 22,283 human transcripts. After hybridization, each array was washed and stained according to the Affymetrix protocol EukGE-WS2v4, and scanned (GeneArray scanner G2500A; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). The methodology used in our study fulfilled the Microarray Gene Expression Data Society (MGED) Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) guidelines (www.mged.org/Workgroups/ MIAME/miame.html).

## Microarray Data Acquisition and Preprocessing

From data image files, gene transcript levels were determined using algorithms from the Microarray Analysis Suite version 5.1 software (Affymetrix). Based on the detected *P* value, a single weighted mean expression level for each gene was obtained, as well as the absolute call (designated "Present," "Marginal," or "Absent"), indicating if the transcript was reliably detected using a one-sided Wilcoxon signed-rank test. Data was scaled from each array to normalize the results for interarray comparisons by correcting the mean intensity for each array (top and bottom 2% of genes excluded) to a set target intensity of 3700. Arrays were assessed for several quality control measures, including the absence of any significant artifacts, the detection *P* value < 0.05 (called "Present") for the bacterial genes spiked into the hybridization mix, the 3'/5' ratio of the intensity for  $\beta$ -actin and GADPH, the percent of genes detected as "Present" in each array. Finally, probe sets designated as "Absent" were filtered out in all arrays.

## **Microarray Data Analysis**

The raw data, normalized using the GeneSpring software (Silicon Genetics, Redwood City, CA), was performed as follows: (1) per microarray sample, by dividing the raw data by the 50th percentile of all measurements; and (2) per gene, by dividing the raw data by the median of the expression level for the gene in all samples. All further analyses were performed on the 9,787 normalized genes from 8 chips. The gene annotations for each probe set were updated with the latest NetAffx HG-U133A annotation file (09-16-2005) at: http://www.affymetrix. com/support/technical/byproduct.affx?product=hgu133-20 (19). Assessment of genes with significant change was performed using the GeneSpring software, by calculating the P values using the Welch t test. This analysis was done on the 9,787 genes from 8 chips. Genes were assumed to be significantly upregulated or downregulated if the calculated P value was < 0.05. The mean value of expression for a given gene in hyperoxia and normoxia was used to determine the fold change in a gene expression between the two conditions. Hierarchical clustering of the genes among samples from individuals in normoxia and in hyperoxia was performed by a Pearson correlation (uncentered) similarity metric and average linkage clustering using the GeneSpring software tools applying Eisen's methodology (20). Selected genes were subjected to an intensive search to identify biological function and associated regulatory pathways. Genes were classified based on the Gene Ontology Consortium (21) obtained through the NetAffx server (available at www.netaffx.com), public information from GenBank (www.ncbi.nlm. nih.gov/Genbank/index.html), and SOURCE search (http://genomewww5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch) for biological process. To identify functional categories that were modulated by hyperoxia, we used the GOMINER software developed by Zeeberg and coworkers, which gives a P value for Gene Ontology (GO) categories that are enriched in significantly modulated genes (22).

## Cell Culture and In Vitro Hyperoxia

BET-1A cells, a human bronchial epithelial cell line transformed by SV-40 T antigen (23), was cultured in a serum-free LHC-9 medium consisting of LHC-8 medium (Biofluids, Rockville, MD), 2.75 M epinephrine, 0.33 nM retinoic acid, 25 U/ml penicillin, 25 µg/ml streptomycin, and 25 µg/ml fungizone (Invitrogen), on plates precoated with coating medium containing 29 µg/ml collagen (Vitrogen, Palo Alto, CA), 10 µg/ml bovine serum albumin (Biofluids, Camarillo, CA), and 10 µg/ml fibronectin (Calbiochem, La Jolla, CA). Primary human airway epithelial cells (HAEC) obtained by bronchial brushing from healthy volunteers were cultured in serum-free Lechner and LaVeck media (LHC8) on plates precoated with coating media as above (24). Primary HAEC cultures of passages 0-2 were used in experiments. HAEC or BET-1A were placed in a humidified incubator chamber (MIC-101; Billups-Rothenburg, Del Mar, CA), and the chamber inlet port connected to a source of pure oxygen infused at 5 liters/min. Oxygen concentration was monitored at the outlet port, and when oxygen was > 98% in the chamber, the gas source was disconnected and inlet and outlet ports tightly clamped. The chamber was maintained in an incubator at 37°C for the duration of the exposure, and the oxygen monitored at the end of the exposure. At end of exposures of up to 24 h oxygen levels were 98  $\pm$  2%. After exposure, the cells were rinsed three times with phosphate-buffered saline and harvested for RNA and protein extracts.

To evaluate the effect of hyperoxia on ubiquitination of proteins,  $50 \mu M$  proteasome inhibitor Ac-Leu-Leu-nLeu-al (ALLN; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was added before hyperoxia to block proteasome degradation.

## Northern Blot Analysis

Total RNA from cells was extracted by the GTC ([4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0], 0.5% sarkosyl, and 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol)-CsCl gradient method and evaluated by Northern blot using a [<sup>32</sup>P]-labeled Heat Shock Protein 70 (HSP70) probe (25, 26) and [<sup>32</sup>P]-labeled 18S ribosomal RNA as a control. The blots were then subjected to autoradiography and the HSP70 bands quantified relative to 18S ribosomal RNA using a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

#### Western Blot Analysis

BET-1A cells were harvested in an ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 7.9), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 5 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 200 µM sodium orthovanadate (NaOV), and 20 µg/ml aprotinin (24, 27). Cell lysates (70 µg/lane) were separated by electrophoresis on 15% SDS-PAGE HCl gel and then electrophoretically transfered onto a nitocellulose membrane or onto Immuno-Blot PVDF Membrane (0.2 µm; Bio-Rad, Hercules, CA). The membrane was blocked with 5% nonfat milk or 5% bovine serum albumin (BSA; Biosource, Rockville, MD), and incubated overnight with primary antibodies. Antibodies included monoclonal anti-ubiquitin antibody P4D1 (Santa Cruz Biotechnology), the rabbit polyclonal cleaved caspase-8 antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), the mouse monoclonal anti-\beta-actin antibody AC-15 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and the secondary antibody was conjugated to horseradish peroxidase. The detection of signal was performed with enhanced chemiluminescent system (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL).

## Measurement of Intracellular ATP Concentration

Whole cell protein extracts from BET-1A cells were harvested as described above. ATP concentration within lysates was detected using the ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, Boston, MA). Values were normalized for protein concentrations of the lysate.

## RESULTS

# Clinical Assessment of Healthy Volunteers and Biological Samples

Global characteristics of healthy volunteers included average age of  $27 \pm 2$  yr, 3 females, and all were white. The major epithelial cell types obtained by brushing at bronchoscopy included ciliated, secretory, basal, and undifferentiated cells, and a small number of inflammatory cells as previously reported (7). A total of six individuals were analyzed by microarray. Two chips, representing paired RNA from one volunteer under normoxia and hyperoxia, displayed a poor microarray quality score and were not used in analyses. Of the remaining five individuals, RNA was degraded in one of the five under normoxia, and in another one of five under hyperoxia. Thus eight chips representing five individuals, with three of the five individuals having paired data before and after hyperoxia, were of good quality and used in analyses (Table 1).

## **Global Analysis of Gene Expression Profiles**

Based on the selection of genes called "Present," and those found in at least three of four chips in each condition (normoxia or hyperoxia), a total of 9,787 genes were identified in the final set of analyzed genes. Based on the Welch t test, we identified 135 genes (1.4% of the total genes) significantly modulated by hyperoxia-that is, 97 up-regulated genes and 38 down-regulated genes (Tables 2 and 3). Fold change of modulated genes was modest: 6% of these genes displayed on average  $\pm$  60% variation in hyperoxia versus normoxia, 19% displayed  $\pm$  40–60% variation, 58% displayed  $\pm$  20–40% variation, and 17% of the genes had < 20% variation. Consequently, the *P* value for each gene from the Welch t test was obtained without any correction for false discovery rate (Figure 1). The effects of hyperoxia were also assessed through the complementary approach of global analysis of gene expression by the clustering method. This approach identified individuals rather than the hyperoxia exposure within the whole set of 9,787 genes (Figure 2A). Hyperoxia exposure was discriminated by gene expression profile when the subgroup of genes for analyses was selected upon the P value <0.05 (i.e., the set of 135 significantly modulated genes; Figure 2B). To mitigate any difficulty with false detection, we focused on the functional categories according to the Gene Ontology (GO) denomination rather than on the modulation of specific genes by themselves. Functional analysis was extrapolated through the GO categories for each gene, with the aid of the GOMINER software (22) (Table 4). This approach identified the involvement of several groups of genes with particular known molecular functions and biological processes and thus helps the

understanding of the complex integrated hyperoxia-induced cell response (Figures 3A and 3B). Categories of genes involved in protein modification were predominantly identified, especially genes with oxidoreductase activity and those involved in ubiquitination. There was also induction of genes involved in ATP synthesis. Of note, a group of genes with unknown function was also identified. Some of these, however, belong to well-defined categories such as the ubiquitin-dependent protein catabolism for PSMD9 or protein ser/thr/tyr kinase activity for LIMK2; the grouping shown is inherent to the GO classification.

# Selected Pathways and Categories of Interest from the Functional Analysis

Antioxidants, redox-related genes, and glutathione metabolism. Antioxidant enzymes including the superoxide dismutases (SOD), catalase, glutamylcysteine ligase (GCL), or glutathione peroxidases (GPx) were not significantly modulated by hyperoxia (Table 5). The functional analysis identified genes with oxidoreductase activity instead (Table 4). This group includes alcohol dehydrogenases especially involved in the metabolism of lipid peroxidation products, suggesting a pivotal role of redox homeostasis in hyperoxia response. The glutathione metabolism category was not identified by functional analyses. However, genes related to glutathione/thiol metabolism were significantly modulated in the gene expression analysis, such as glutaredoxin 2 (GLRX2) and alcohol dehydrogenase 5 (ADH5). GLRX2 catalyzes the glutathione-dependent reduction of disulfides and glutathione-mixed disulfides in the mitochondrion (18, 28), whereas ADH5, a ubiquitous protein widely distributed in mammals, acts as a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, controlling intracellular levels of S-nitrosoglutathione, S-nitrosylated proteins, and the metabolism of lipid peroxidation products (29, 30). Together these enzymes contribute to cellular redox homeostasis.

Ubiquitination and protein catabolism pathway. The ubiquitindependent protein catabolism and protein modification categories were the foremost biological process identified by the functional analysis using the GOMINER approach (Table 4, Figure 3). Among the genes identified in this category were proteasome subunit  $\alpha$ 1 (PSMA1), ubiquitin-conjugating enzyme E2E1 (UBE2E1), ubiquitin-conjugating enzyme E2L3 (UBE2L3), ubiquitin-specific protease 24 (USP24), and PSMD9 (Table 3).

Genes involved in the response to stress and inflammation. Chaperones from the heat shock 70-kD (HSP70) and 40-kD (HSP40) family were induced by hyperoxia; that is, heat shock 70-kD protein 5-glucose-regulated protein (HSPA5), which is the only heat shock from the endoplasmic reticulum in the set of 9,784 genes, and DnaJ (HSP40) homolog subfamily B member

Name	Background < 100	Noise < 5	Scale Factor*	%P <sup>†</sup>	3′/5′ β-actin < 2	3'/5' GAPDH < 2
1-normoxia	59	2.5	13.4	42	2.5	1.6
2-normoxia	89	3.8	4.4	52	1.2	0.9
2-hyperoxia	80	3.3	4.2	54	1.3	1.1
3-normoxia	100	4.2	6.1	46	1.4	1,0
3-hyperoxia	93	3.9	3.6	54	1.2	1,0
4-normoxia	70	3.1	6.1	53	1.0	0.9
4-hyperoxia	84	3.5	10.6	46	1.2	0.8
5-hyperoxia	81	3.6	8.2	50	1.4	0.9
Mean (70)	82 (13)	3.5 (0.5)	7.1 (3.4)	50 (4)	1.4 (0.5)	1 (0.2)

TABLE 1. EVALUATION OF THE QUALITY FILTER CRITERIA IN MICROARRAY CHIPS

Definition of abbreviation: GAPDH, glyceraldehyde phosphate deydrogenase.

\* Scaling factor of the mean intensity for each array to a set target intensity of 300.

<sup>†</sup> Percent of genes detected as Present by the Microarray Suite 5.1 software.

TABLE 2.	GENES	DOWN-REGULATED	IN	AIRWAY	EPITHELIUM	WITH	HYPEROXIA	IN	VIVO
----------	-------	----------------	----	--------	------------	------	-----------	----	------

Affymetrix ID	Accession No.	Symbol	Gene	Ratio*	P Value <sup>†</sup>
221904_at	NM_144635	MGC21688	Hypothetical protein MGC21688	0.73	$2.5  imes 10^{-3}$
219001_s_at	NM_024345	MGC10765	Hypothetical protein MGC10765	0.66	$3.4  imes 10^{-3}$
221774_x_at	NM_017569	FAM48A	Family with sequence similarity 48, member A	0.64	$3.7  imes 10^{-3}$
32091_at	NM_014655	KIAA0446	KIAA0446 gene product	0.81	7.2×10 <sup>-3</sup>
204676_at	NM_015421	DKFZP564K2062	DKFZP564K2062 protein	0.67	$1.2 \times 10^{-2}$
204252_at	NM_001798	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	0.72	$1.3  imes 10^{-2}$
212083_at	NM_144582	TEX261	Testis expressed gene 261	0.85	$1.3  imes 10^{-2}$
200856_x_at	NM_006311	NCOR1	Nuclear receptor co-repressor 1	0.61	$1.6  imes 10^{-2}$
204180_s_at	NM_014007	ZNF297B	Zinc finger protein 297B	0.80	$1.7  imes 10^{-2}$
206115_at	NM_004430	EGR3	Early growth response 3	0.40	$1.8  imes 10^{-2}$
213816_s_at	NM_000245	MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	0.67	$1.9  imes 10^{-2}$
201860_s_at	NM_000930	PLAT	Plasminogen activator, tissue	0.64	$1.9  imes 10^{-2}$
219801_at	NM_030580	ZNF34	Zinc finger protein 34 (KOX 32)	0.69	$2.1  imes 10^{-2}$
215246_at	NM_016648	HDCMA18P	HDCMA18P protein	0.77	$2.3  imes 10^{-2}$
203934_at	NM_002253	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	0.75	$2.5  imes 10^{-2}$
201668_x_at	NM_002356	MARCKS	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0.83	$2.7 \times 10^{-2}$
37433_at	NM_004671	PIAS2	Protein inhibitor of activated STAT2	0.64	$2.7 \times 10^{-2}$
201270_x_at	NM_015332	KIAA1068	KIAA1068 protein	0.84	$2.8  imes 10^{-2}$
206533_at	NM_000745	CHRNA5	Cholinergic receptor, nicotinic, $\alpha$ polypeptide 5	0.72	$2.9  imes 10^{-2}$
214801_at	NM_145034	LOC163590	AF464140	0.66	$3.0  imes 10^{-2}$
216396_s_at	NM_004879	EI24	Etoposide induced 2.4 mRNA	0.78	$3.0  imes 10^{-2}$
209594_x_at	NM_002784	PSG9	Pregnancy-specific β1-glycoprotein 9	0.78	$3.0  imes 10^{-2}$
217156_at	NM_000182	HADHA	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), $\alpha$ subunit	0.66	3.1×10 <sup>-2</sup>
219685_at	NM_021637	FLJ14084	Hypothetical protein FLJ14084	0.73	$3.2 \times 10^{-2}$
210653_s_at	NM_000056	BCKDHB	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, $\beta$ polypeptide (maple syrup urine disease)	0.79	$3.2 \times 10^{-2}$
217866_at	NM_024811	FLJ12529	Pre-mRNA cleavage factor I, 59-kD subunit	0.86	$3.5  imes 10^{-2}$
213058_at	AK092338	LOC283585	Transcribed locus, weakly similar to XP_375099.1 hypothetical protein LOC283585	0.63	$3.6  imes 10^{-2}$
214699_x_at	NM_015610	DKFZP434J154	WIPI49-like protein 2	0.72	$3.6  imes 10^{-2}$
217682_at	NM_014117	PRO0149	PRO0149 protein	0.80	$3.6  imes 10^{-2}$
205741_s_at	NM_001392	DTNA	Dystrobrevin, $\alpha$	0.72	$3.9  imes 10^{-2}$
218862_at	NM_024701	ASB13	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 13	0.82	$4.1 \times 10^{-2}$
214119_s_at	NM_000801	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12 kD	0.68	$4.1 \times 10^{-2}$
219889_at	NM_005479	FRAT1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	0.81	$4.2 \times 10^{-2}$
207805_s_at	NM_002813	PSMD9	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	0.79	$4.4 \times 10^{-2}$
214080_x_at	NM_002743	PRKCSH	Protein kinase C substrate 80K-H	0.82	$4.4 \times 10^{-2}$
214035_x_at	AK131084	LOC399491	LOC399491 protein	0.65	$4.6  imes 10^{-2}$
205550_s_at	NM_004899	BRE	Bain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	0.80	$4.7 \times 10^{-2}$
212864_at	NM_003818	CDS2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	0.80	$4.9 \times 10^{-2}$

\* Hyperoxia/normoxia ratio of the median.

<sup>†</sup> Welch *t* test performed to determine significant genes on the filtered set of 9,787 genes.

12 (DNAJB12). This confirms previous reports of increase of HSP70 at the mRNA level in airway epithelial cells exposed to acute hyperoxia (6). There was no evidence of an increase in genes involved in the immune response or the acute-phase in-flammatory response within 12 h of exposure to hyperoxia.

*Cell cycle–related genes.* The GOMINER functional analysis suggested a state of cell cycle arrest. The main alterations of molecular function identified were the protein phosphatases, especially with tyrosine phosphatase activity—for example, dual specificity phosphatase 7 (DUSP7), protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 13 (PTPN13), cell division cycle 14 homolog A (CDC14A), and tensin-like SH2 domain-containing 1 (TENS1) (Table 4, Figure 3). This was reinforced by the identification of genes involved in phosphorus metabolism, especially protein dephosphorylation and the regulation of DNA replication, that is, the significant decrease in cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), which is involved in the late phase of G1-S transition. These findings suggest that cell cycle arrest may be an adaptive early response to cellular stress.

## In Vitro Hyperoxia

*Increased ubiquitination of proteins in BET-1A cells.* To confirm the involvement of ubiquitin-dependent protein catabolism induced by hyperoxia at the RNA level, transformed airway epi-

thelial BET-1A cells were exposed to hyperoxia *in vitro*. We used proteasome inhibitor ALLN at 50  $\mu$ M to quantitate the total level of ubiquitination occurring over time. At this concentration there is no evidence of cell toxicity, as reported by other studies using ALLN (31, 32). Here, cells displayed a low level of ubiquitinated proteins at baseline, which increased rapidly in a time-dependent manner in response to hyperoxia exposure compared with room air exposure (Figure 4).

Increased expression of HSP 70 mRNA in BET-1A cells and HAEC. Previous study showed that upregulation of HSP70 specifically protected a lung epithelial cell line against hyperoxia by attenuating hyperoxia-mediated lipid peroxidation and ATP depletion (33). Here, primary and transformed airway epithelial cells exposed to hyperoxia *in vitro* confirmed upregulation of HSP70 mRNA by Northern analysis by 24 h of exposure (Figure 5).

Adverse effects of proteasome inhibition on ATP levels and activation/cleavage of caspase 8. To investigate the role of increased protein catabolism in cells acutely exposed to hyperoxia, airway epithelial cells were exposed to hyperoxia in the presence or absence of ALLN. No evidence of cell toxicity was observed with ALLN, which is consistent with previous studies using human airway epithelial cells (data not shown) (31, 32, 34). Total protein concentrations of cell lysates were similar in cells without ALLN and exposed to ALLN in the presence or absence of

## TABLE 3. GENES UP-REGULATED IN AIRWAY EPITHELIUM WITH HYPEROXIA IN VIVO

Affymetrix ID	Accession No.	Symbol	Gene	Ratio*	P Value <sup>†</sup>
219933_at	NM_016066	GLRX2	Glutaredoxin 2	1.57	$1.8  imes 10^{-3}$
201177_s_at	NM_005499	UBA2	SUMO-1 activating enzyme subunit 2	1.34	$5.8  imes 10^{-3}$
206020_at	NM_004232	SOCS6	Suppressor of cytokine signaling 6	1.36	$6.1  imes 10^{-3}$
219767_s_at	NM_005111	CRYZL1	Crystalline, zeta (quinone reductase)-like 1	1.26	8.0×10 <sup>-3</sup>
213000_at	NM_015358	ZCWCC3	Zinc finger, CW-type with coiled-coil domain 3	1.53	8.1×10 <sup>-3</sup>
205288_at	NM_003672	CDC14A	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (S. cerevisiae)	1.78	$8.6 \times 10^{-3}$
201801_s_at	NM_004955	SLC29AT	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	1.31	$8.9 \times 10^{-3}$
200608_s_al	NIVI_006265		Storal C4 mothyl avidasa lika	1.29	$9.3 \times 10^{-3}$
209140_at 211746_x_at	NM 148976	PSMA1	Proteasome (prosome macronain) subunit alpha type 1	1.22	$9.9 \times 10^{-2}$
213375 s at	NM 052818	CG018	Hypothetical gene CG018	1.46	$1.0 \times 10^{-2}$
204449 at	NM 005388	PDCL	Phosducin-like	1.59	$1.1 \times 10^{-2}$
203827 at	NM_017983	FLJ10055	Hypothetical protein FLI10055	1.37	$1.1 \times 10^{-2}$
212388_at	XM_371254	USP24	Ubiquitin specific protease 24	1.41	$1.1 \times 10^{-2}$
212510_at	NM_015141	KIAA0089	KIAA0089 protein	1.36	$1.3  imes 10^{-2}$
203855_at	NM_014969	KIAA0893	KIAA0893 protein	1.21	$1.4  imes 10^{-2}$
201816_s_at	NM_001483	GBAS	Glioblastoma amplified sequence	1.29	$1.5 \times 10^{-2}$
221182_at	NM_025063	FLJ23550	Hypothetical protein FLJ23550	1.29	$1.5 \times 10^{-2}$
212929_s_at	NM_001005751	LOC387680, FLJ10824	Similar to KIAA0592 protein hypothetical protein FLJ10824	1.30	$1.6 \times 10^{-2}$
201803_at	NM_000938	POLRZB	Polymerase (28) II (DNA directed) polypeptide B, 140 kD	1.16	$1.7 \times 10^{-2}$
209448_at	NM_006410		HIV-1 Tat interactive protein 2, 30 kD	1.17	$1.8 \times 10^{-2}$
211935_5_al 208678_at	NM_002271	NPIND3 ATD6V/1F1	ATPase H+ transporting lysosomal 31 kD V1 subunit E isoform 1	1.49	$1.9 \times 10^{-2}$
200070_at 217851 s at	NM 016045	C20orf45	Chromosome 20 open reading frame 45	1.52	$2.0 \times 10^{-2}$
208788_at	NM_021814	ELOVL5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids	1.25	$2.1 \times 10^{-2}$ $2.1 \times 10^{-2}$
201784 s at	NM 014267	SMAP	Small acidic protein	1 49	$2.2 \times 10^{-2}$
65493 at	NM 022070	ABC1	Amplified in breast cancer 1	1.44	$2.2 \times 10^{-2}$
200775 s at	NM 002140	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1.56	$2.3 \times 10^{-2}$
213530 at	BC022977	RAB3GAP	RAB3 GTPase-activating protein	1.16	$2.4 \times 10^{-2}$
213246_at	XM_058628	C14orf109	Chromosome 14 open reading frame 109	1.36	$2.4 \times 10^{-2}$
217853_at	NM_022748	TENS1	Tensin-like SH2 domain containing 1	1.44	$2.4  imes 10^{-2}$
208848_at	NM_000671	ADH5	Alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	1.69	$2.4  imes 10^{-2}$
208638_at	NM_005742	TXNDC7	Thioredoxin domain containing 7 (protein disulfide isomerase)	1.31	$2.4  imes 10^{-2}$
212819_at	NM_016114	ASB1	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	1.62	$2.4  imes 10^{-2}$
215884_s_at	NM_013444	UBQLN2	Ubiquilin 2	1.43	$2.5  imes 10^{-2}$
212543_at	XM_166300	AIM1	Absent in melanoma 1	1.14	$2.5  imes 10^{-2}$
208736_at	NM_005719	ARPC3	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa	1.18	$2.7 \times 10^{-2}$
204201_s_at	NM_006264	PTPN13	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)	1.26	$2.7 \times 10^{-2}$
207483_s_at	NM_018448	TIP120A	TBP-interacting protein	1.25	$2.7 \times 10^{-2}$
208857_s_at	NM_005389	PCMTT	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase	1.32	$2.7 \times 10^{-2}$
219800_s_at	NM_024838		Inreonine synthase-like I (bacterial)	1.78	$2.8 \times 10^{-2}$
212519_at	NM_003341	UBEZEI CEntri 4	Obiquitin-conjugating enzyme EZE I (UBC4/S nomolog, yeast)	1.29	$2.8 \times 10^{-2}$
220495_5_al	NIVI_024713		2' phosphoadoporing 5' phosphosulfate synthese 1	1.30	$2.8 \times 10^{-2}$
209045_at	NM 005347	HSPA5	Heat shock 70-kD protein 5 (alucose-regulated protein 78 kD)	1.22	$2.9 \times 10^{-2}$
218333 at	NM 016041	F-I ANa	Carcinoma-related gene	1.50	$2.9 \times 10^{-2}$
217737 x at	NM 016407	C20orf43	Chromosome 20 open reading frame 43	1.16	$2.9 \times 10^{-2}$
202872 at	NM 001695	ATP6V1C1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C, isoform 1	1.48	3.0×10 <sup>-2</sup>
213848_at	NM_001947	DUSP7	Dual specificity phosphatase 7	1.30	$3.0  imes 10^{-2}$
	NM_015176	KIAA0483	KIAA0483 protein	1.35	$3.0  imes 10^{-2}$
212698_s_at	NM_144710	SEPT10	Septin 10	1.25	$3.1  imes 10^{-2}$
201676_x_at	NM_148976	PSMA1	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	1.17	$3.1  imes 10^{-2}$
206262_at	NM_000669	ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	1.74	$3.1  imes 10^{-2}$
203181_x_at	NM_182691	SRPK2	SFRS protein kinase 2	1.60	$3.1  imes 10^{-2}$
211760_s_at	NM_003762	VAMP4	Vesicle-associated membrane protein 4	1.21	$3.2  imes 10^{-2}$
200979_at	NM_000284	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	1.26	$3.2 \times 10^{-2}$
201443_s_at	NM_005765	ATP6AP2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	1.30	$3.2 \times 10^{-2}$
209273_s_at	NM_030940	HBLD2	HESB like domain containing 2	1.33	$3.3 \times 10^{-2}$
212936_at	INIVI_U32U42		ΠΥΡΟΙΠΕΙΙCAI PROTEIN DKFZP364D1/2	1.41	$3.5 \times 10^{-2}$
212041_S_at	DCUZ1/14	7171072 7NIE222	Zing finger protein 223	1.39	$3.3 \times 10^{-2}$
222010_5_dl	NIN 001770	21NF323	CD58 antigen (lymphocyte function associated antigen 2)	1.02	$3.3 \times 10^{-2}$
201021 s at	NM 006870	DSTN	Destrin (actin denolymerizing factor)	1.40	$3.6 \times 10^{-2}$
210968 s at	NM 020532	RTN4	Reticulon 4	1 19	$3.7 \times 10^{-2}$
209174 s at	NM 017730	FLI20259	FLI20259 protein	1.35	$3.7 \times 10^{-2}$
202868 s at	NM 006627	POP4	Processing of precursor 4. RNase P/MRP subunit (S. cerevisiae)	1.21	3.7 × 10 <sup>-2</sup>
201592_at	NM_003756	EIF3S3	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa	1.24	3.7×10 <sup>-2</sup>
	NM_133259	LRPPRC	Leucine-rich PPR-motif containing	1.24	$3.8  imes 10^{-2}$
203773_x_at	NM_000712	BLVRA	Biliverdin reductase A	1.49	$3.8 imes10^{-2}$

TABLE 3. (C	ontinued)
-------------	-----------

Affymetrix ID	Accession No.	Symbol	Gene	Ratio*	P Value <sup>†</sup>
203218_at	NM_002752	МАРК9	Mitogen-activated protein kinase 9	1.47	3.8×10 <sup>-2</sup>
209004_s_at	NM_012161	FBXL5	F-box and leucine-rich repeat protein 5	1.18	$3.8  imes 10^{-2}$
202049_s_at	NM_005095	ZNF262	Zinc finger protein 262	1.29	$3.8  imes 10^{-2}$
213940_s_at	NM_015033	FNBP1	Formin binding protein 1	1.47	3.9×10 <sup>-2</sup>
200992_at	NM_006391	IPO7	Importin 7	1.28	3.9×10 <sup>-2</sup>
215440_s_at	XM_043653	BEXL1	Brain expressed X-linked-like 1	1.41	3.9×10 <sup>-2</sup>
202474_s_at	NM_005334	HCFC1	Host cell factor C1 (VP16-accessory protein)	1.27	$4.0  imes 10^{-2}$
221637_s_at	NM_024099	MGC2477	Hypothetical protein MGC2477	1.34	$4.0  imes 10^{-2}$
200684_s_at	NM_003347	UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	1.38	$4.1  imes 10^{-2}$
219751_at	NM_024860	FLJ21148	Hypothetical protein FLJ21148	1.39	$4.1  imes 10^{-2}$
202854_at	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	1.30	$4.1  imes 10^{-2}$
209340_at	NM_003115	UAP1	UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1	1.26	$4.2 \times 10^{-2}$
209034_at	NM_006813	PNRC1	Proline-rich nuclear receptor coactivator 1	1.94	$4.2 \times 10^{-2}$
200780_x_at	NM_000516	GNAS	GNAS complex locus	1.31	$4.3  imes 10^{-2}$
200941_at	NM_001537	HSBP1	Heat shock factor binding protein 1	1.09	$4.3  imes 10^{-2}$
212956_at	XM_093895	KIAA0882	KIAA0882 protein	1.27	$4.3  imes 10^{-2}$
201200_at	NM_003851	CREG	Cellular repressor of E1A-stimulated genes	1.44	$4.4  imes 10^{-2}$
218065_s_at	NM_020644	C11orf15	Chromosome 11 open reading frame 15	1.19	$4.6  imes 10^{-2}$
202865_at	NM_001002762	DNAJB12	DnaJ (HSP40) homolog, subfamily B, member 12	1.27	$4.6  imes 10^{-2}$
202193_at	NM_005569	LIMK2	LIM domain kinase 2	1.24	$4.6  imes 10^{-2}$
217731_s_at	NM_021999	ITM2B	Integral membrane protein 2B	1.74	$4.6  imes 10^{-2}$
206158_s_at	NM_003418	ZNF9	Zinc finger protein 9	1.27	$4.7  imes 10^{-2}$
209005_at	NM_012161	FBXL5	F-box and leucine-rich repeat protein 5	1.36	$4.7  imes 10^{-2}$
209063_x_at	NM_006451	PAIP1	Poly(A) binding protein interacting protein 1	1.17	$4.8  imes 10^{-2}$
212017_at	AL137406	LOC130074	Hypothetical protein LOC130074	1.20	$5.0  imes 10^{-2}$
201202_at	NM_002592	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	1.33	$5.0  imes 10^{-2}$

\* Hyperoxia/normoxia ratio of the median.

<sup>†</sup> Welch *t* test performed to determine significant genes on the filtered set of 9,787 genes.

hyperoxia (all P > 0.7). To determine the functional consequence of blocking the proteasome pathway in terms of cell metabolism and cell death pathways, intracellular free ATP level was measured (35). Under hyperoxia, BET-1A cells increased intracellular ATP, which was consistent with the findings from the transcriptome analyses of human airway epithelium exposed to hyperoxia in vivo that identified upregulation of ATP synthesis as a significant biological pathway. However, the ALLN-pretreated cells exposed to hyperoxia were unable to increase the intracellular ATP level (Figure 6A). Since increased ATP is likely necessary to adjust cellular metabolism and homeostasis in stressed cells, the consequence in terms of cell death was evaluated by using caspase 8 cleavage as a marker of activation of cell death. Cleavage of caspase 8 was increased at 24 h and 48 h in hyperoxia-exposed BET-1A cells pretreated with ALLN, but not cells undergoing hyperoxia exposure only (Figure 6B). These results indicate that proteasome clearance of oxidantdamaged proteins is required for induction of energy production by the cell.

## DISCUSSION

Using gene expression profiling, we identified the early integrated response of the human bronchial epithelium after hyperoxia exposure *in vivo*. This situation frequently occurs during the treatment of acute respiratory distress syndrome in the adult and the newborn, and represents an example of oxidative stress, which is a common final pathway involved in the pathogenesis of many airway diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and cystic fibrosis (4). Although the source of the oxidative stress differs among environmental exposure in which the oxidants are present in the inhaled air (e.g., hyperoxia, air pollution, cigarette smoke) and inflammatory airway diseases in which the inflammatory cells recruited to the airways produce ROS, the airway response to oxidants appears generally similar (1). Consistent with two genomic studies of human airway cells after oxidant stress induced by cigarette smoke in vivo, hyperoxia leads to a greater number of genes up-regulated than downregulated (36, 37). This is in contrast to results from genomic analyses of whole lungs of mice exposed to hyperoxia using a similar approach to this study (38). This may be related to differences between human and murine gene responses, the use of whole murine lung tissue as opposed to our relatively pure bronchial epithelial cells obtained by brushing, or the use of different manufacturers' microarrays (36-38). Nevertheless, the fold change of responses in this study, that is, hyperoxia to normoxia ratio, for modulated genes was relatively low. One explanation may be the abundant protective levels of antioxidant scavenging molecules, including glutathione, in the extracellular epithelial lining fluid in vivo. This first barrier may attenuate the cellular epithelial oxidant stress in the first 12 h of hyperoxia exposure (1, 39).

Traditionally, complementary approaches were used to confirm individual genes identified in the gene expression analysis. Since the development of this powerful technology, the procedures for DNA microarrays have been carefully standardized from the design of the study to the extraction and treatment of the data to guarantee optimal confidence in the results (www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html) (21, 22, 40). Recent studies validated changes in modulated genes similar in direction and magnitude when compared with semiguantitative RT-PCR (38, 41, 42). The new strategies developed to improve the validity of the analysis focus on the identification of sets of genes instead of individual genes by themselves (43, 44). In this study, we used the same approach, assuming that a set of genes displaying coordinated expression level is involved in a functional pathway. This approach is particularly well suited toward understanding the inherent complexity of biological systems; that is, the concept of systems biology is founded on models translating the results of global functional genomics into a comprehensive understanding of how organisms are organized and operate (45).



**Figure 1.** Genes significantly different under conditions of hyperoxia versus normoxia in five patients for expression of 9,787 genes evaluated in bronchial epithelial cells. The *P* values were calculated for each gene called "Present" and found in at least three of the four microarrays in each condition using the Welch *t* test. Ordinate, *P* value for each gene; abscissa, geometric mean of values in normoxia and hyperoxia, that is,  $0.5 \times (\log_2 Nor + \log_2 Hyp)$  (68). Genes significantly overexpressed in hyperoxia are in *red*, and significantly underexpressed in hyperoxia in *green*.

Here, the inability of the bronchial epithelium to upregulate antioxidant enzymes including SOD1, SOD2, and catalase, is in accordance with previous studies showing a relatively low level of antioxidant mRNAs at baseline without any increase after 24–48 h of hyperoxia exposure in humans (7, 12, 15). The antioxidant enzyme response is similar to that of humans in murine lungs but different than in the rat (38, 46, 47). Interestingly, transgenic models with overexpression or mice deficient in these enzymes do not show evidence of an essential role of SOD and catalase in preventing hyperoxia injury in murine lungs (46). One of the protective antioxidant systems in the airway is glutathione, which neutralizes oxidants and inhibits oxidant-induced intracellular signal transduction, thus attenuating proinflammatory cellular responses (4). Human airway epithelial cell lines, including 16-HBE, BEAS-2B, NCI-H292, and A549, increase intracellular glutathione within hours of hyperoxia exposure in vitro (15, 48, 49). The mechanism for the glutathione increase may be related in part to a rapid, but transient, increase of glutamylcysteine ligase, the rate-limiting enzyme in *de novo* synthesis of GSH; intracellular levels increase 4 h after hyperoxia in vitro and return to basal levels by 12 h (50). In this study, changes in glutamylcysteine ligase mRNA were not found, but the airways were sampled after 12 h of hyperoxia, and earlier time of induction would not have been detected. However, other interacting components of the glutathione-antioxidant system, including  $\gamma$ -glutamyltransferase, glutathione peroxidases, and glutathione reductase, were not induced in this study, or in previous in vitro studies of primary human bronchial epithelial cells and bronchial epithelial cell lines exposed to hyperoxia (15, 24, 49-51). Other data support that upregulation of glutathione antioxidant systems are not requisite for defense against hyperoxia (25, 38, 52, 53). For example, glutathione peroxidase 1-deficient mice do not have increased sensitivity to hyperoxia (52, 53). Moreover, depletion of glutathione does not increase the sensitivity of BEAS-2B cells to hyperoxia (15). Taken together, enzymes of the glutathione antioxidant system do not appear to be one of the essential



*Figure 2.* Hierarchical clustering of all 9,787 genes (*A*), or the subset of 135 genes differentially expressed according to a *P* value below 0.05 between hyperoxia and normoxia (*B*). Gene and condition trees were generated by hierarchical clustering of genes called "Present" in at least three of the four microarrays using the Pearson correlation. N refers to normoxia, H to hyperoxia, with numbers identifying volunteers. Using all genes (*A*), clustering occurs by pairs; for example, N3 and H3 are paired normoxia and hyperoxia of Volunteer no. 3. Using the subset of genes (*B*), clustering is by normoxia and hyperoxia groups. Individuals N1 and H5 are unpaired conditions of normoxia and hyperoxia, respectively.

	Total*	Under*	Over*	P Value
Molecular Function				
Catalytic activity				
Nucleotidyl transferase activity	63	1	4	$4  imes 10^{-3}$
Protein tyrosine phosphatase activity	39	0	4	$4 imes 10^{-3}$
Protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	20	0	2	$4.2  imes 10^{-2}$
Ubiquitin conjugating enzyme activity	18	0	2	$3.5  imes 10^{-2}$
Oxidoreductase activity				
Acting on aldehyde oroxo group of donors	19	1	1	$4 imes 10^{-2}$
Formaldehyde dehydrogenase (glutathione) activity	1	0	1	$1.6  imes 10^{-2}$
Alcohol dehydrogenase activity	6	0	2	$4  imes 10^{-3}$
Transcription cofactor activity	134	2	4	$2.3  imes 10^{-2}$
Corepressor activity	46	1	2	$4  imes 10^{-2}$
Small GTPase binding	18	0	2	$3.5  imes 10^{-2}$
Ran GTPase binding	4	0	2	$2 imes10^{-3}$
Unknown	235	2	7	$1.5  imes 10^{-2}$
Biological Process				
Regulation of DNA replication	8	1	1	$7 imes10^{-3}$
Proteolysis during cellular protein catabolism	93	1	4	$1.8  imes 10^{-2}$
Ubiquitin-dependent protein catabolism	81	1	4	$1 \times 10^{-2}$
Protein import into nucleus, docking	13	0	2	$1.9  imes 10^{-2}$
Protein modification	679	5	13	$2.6  imes 10^{-2}$
Phosphorus metabolism	370	3	8	$3.9  imes 10^{-2}$
Protein amino acid dephosphorylation	67	0	4	$2.4  imes 10^{-2}$

# TABLE 4. GOMINER CATEGORIES OF GENES MODULATED BY HYPEROXIA IN HUMAN AIRWAY EPITHELIUM IN VIVO

\* Number of genes modulated by hyperoxia and number of genes in each category on U133 array. Over- or under-representation of functional categories according to the GO classification are determined by using Fisher's exact test. Categories containing more than two genes and a P value < 0.05 are represented.

early adaptive responses to *in vivo* hyperoxia at the transcriptional level.

Functional analyses suggest an early effect of hyperoxia is the inhibition of DNA replication and transcription together with increased phosphatases, which would lead to a decrease in the phosphorylation status of the cell, and a possible resultant protective growth arrest. This is consistent with previous studies in mammalian and human cells exposed to hyperoxia that show



*Figure 3.* Selected cellular pathways triggered by hyperoxia according to the significant biological processes (*A*) and the molecular functions (*B*) involved using the GOMINER approach. Upregulated genes are represented in *red* and down-regulated genes in *green. P* value of functional categories, using Fisher's exact test, are presented in *parentheses. See* tables for gene descriptions.

	TABLE 5.	MODULATION	OF	GENES	INVOLVED	IN	REDOX	REGULATION
--	----------	------------	----	-------	----------	----	-------	------------

Category	Description	Hyp/Nor ratio	P Value
Catalase and superoxide dismutase	Catalase	1.27	0.084
	Superoxide dismutase 1	1.05	0.683
	Superoxide dismutase 2	1.38	0.687
Glutathione metabolism	Glutathione peroxidase 1	1.51	0.35
	Glutathione peroxidase 4	1.12	0.613
	Glutathione peroxidase 2	0.92	0.798
	Glutathione peroxidase 3	1.03	0.74
	Glutathione-S-transferase A1	1.05	0.614
	Glutathione-S-transferase A2	1.30	0.298
	Glutathione-S-transferase A3	0.94	0.865
	Glutathione-S-transferase A4	1.17	0.502
	Glutathione-S-transferase M1	0.84	0.481
	Glutathione-S-transferase M2	0.94	0.808
	Glutathione-S-transferase M3	0.80	0.564
	Glutathione-S-transferase M4	0.73	0.122
	Glutathione-S-transferase M5	0.75	0.125
	Glutathione-S-transferase pi	0.98	0.963
	Glutathione-S-transferase subunit 13	1.09	0.636
	Glutathione-S-transferase theta 1	0.98	0.952
	Microsomal glutathione S-transferase 2	0.97	0.923
	Glutathione-S-transferase omega 1	1.38	0.389
	Glutathione synthetase	1	0.99
	Glutamate cysteine ligase (catalytic subunit)	1.11	0.328
	Glutamate cysteine ligase (modifier subunit)	1.17	0.217
	Glutaredoxin 2	1.57	0.002
	Glutaredoxin (thioltransferase)	1.38	0.118
Redox balance	Ferredoxin 1	1.28	0.252
	Ferredoxin reductase	1.11	0.656
	Peroxiredoxin 1	1.05	0.587
	Peroxiredoxin 2	1.00	1
	Peroxiredoxin 3	1.18	0.079
	Peroxiredoxin 4	1.34	0.396
	Peroxiredoxin 6	1.18	0.181
	Thioredoxin	1 24	0 387
	Thioredoxin 2	1.11	0.507
	Thioredoxin interacting protein	1 11	0.366
	Thioredoxin reductase 1	1.06	0.500
	Thioredoxin reductase 3	0.87	0.361
	Thioredoxin like 32kDa	1 1 5	0.301
	Thioredoxin-like 2	0.98	0.279
	Thioredoxin domain containing	1 16	0.032
	Thioredoxin domain containing	1.10	0.470
	Thioredoxin domain containing 4	1.04	0.001
	Thioredoxin domain containing 5	1.04	0.004
	Thioredoxin-related transmombrane protein 2	1 10	0.024
	Alcohol debydrogenase 1C	1.17	0.322
	Alcohol dobydrogonaso 5	1./4	0.03
	Alcohol debydrogopase 14	1.33	0.02
		0.90	0.792
	Alcohol dehydrogenase o	0.90	0.505
	Alconol denydrogenase /	1.22	0.442

a block of the G1 to S phase progression in the cell cycle mediated by an increase in CDK inhibitor  $p21^{WAFI/CIP1}$  within the first 12 h (8, 32, 54–57). Cell cycle arrest may provide time for repair of damage sustained under hyperoxia stress, and thus avoid the replication and propagation of potentially hazardous mutations (8, 32, 56, 57). This conjecture may be supported by the decrease in CdK2 and the increase expression of genes from the protein dephosphorylation category in our study (8, 57).

The induction of genes related to the proteasome, ubiquitinconjugation pathways, protein folding, and chaperone functions in this study suggests a carefully integrated and coordinated response to identify hyperoxia-related damaged proteins and perhaps direct them toward the protein catabolism pathway (5, 27, 58, 59). Early induction of heat shock proteins in response to hyperoxia is a well-known adaptive mechanism in the prevention of aggregation and repair of damaged cellular macromolecules, including oxidized proteins and lipids (58). Hyperoxia increases expression of HSP70 mRNA in primary bronchial epithelial cells in vitro (6), and HSP70 attenuates lipid peroxidation in the human airway epithelial cell line A549 exposed to hyperoxia (33). Here, upregulation of HSP70 was detected in response to hyperoxia in vivo and also confirmed in BET-1A and primary human airway epithelial cells exposed in vitro. Another important role of this molecular chaperone is to interact with the ubiquitin system (58). Ubiquitination is the process by which a polyubiquitin chain is added onto altered proteins, which allows the proteasome to recognize, bind, and unfold the ubiquitinated proteins, and subsequently digest them into small peptides (5, 26, 58, 60). Chaperones act as protein stabilizers, preventing aggregation of misfolded proteins before the ubiquitin-proteasome-dependent degradation pathway (58). Greater ubiquitination of proteins in cells exposed to hyperoxia was confirmed in vitro. Disturbance in the processing and degradation of proteins are implicated in the physiopathology of many diseases,



Figure 4. Ubiquitination of proteins in BET1A cells exposed to 100%  $O_2$  increases over time. Western blot shows increase in ubiquitination of proteins over time, with  $\beta$ -actin as control for protein loading. Graph shows average  $\pm$  SD of three independent experiments.

such as cystic fibrosis, which was recently confirmed using the same approach (32, 43, 61); hence the ability to upregulate ubiquitin-proteasome pathway is likely an essential defense to prevent tissue injury as a result of accumulation of damaged and misfolded proteins. In fact, the critical function of increasing protein clearance in hyperoxia was confirmed through measures of cellular ATP and activation of cell death pathways under conditions of inhibition of proteasomal degradation of proteins.

The ability of the cell to produce ATP in response to hyperoxia is a pivotal event in prevention of injury. An increase in glucose consumption and ATP production has previously been reported in the A549 lung cancer cell line exposed to hyperoxia (33, 62). In this study, genes involved in glycolysis were not induced *in vivo*, consistent with studies in mice exposed to hyper-



*Figure 5.* Time course of HSP70 mRNA expression in transformed bronchial epithelial cells (BET1A) and primary HAEC exposed to 100% O<sub>2</sub>. The representative Northern blot analysis of total 10µg RNA/lane demonstrates an increase of HSP70 at 24 h. Ribosome 18S is shown as control. Results are representative of four independent experiments.



**Figure 6.** (A) ATP levels in BET1A cells exposed to 100% O<sub>2</sub> over time with (*closed circles*) or without (*open circles*) ALLN pretreatment. Hyperoxia induces a significant and early increase of ATP in BET1A cells without ALLN pretreatment (\*P = 0.01). The use of ALLN prior to hyperoxia significantly reduces ATP levels within BET-1A cells. (*B*) Increased activation of cell death pathway in BET1A cells exposed to hyperoxia over time with ALLN pretreatment. Western blot shows an increase in cleaved Caspase 8 protein, with  $\beta$ -actin as control for protein loading. Results are representative of three independent experiments.

oxia and studies of human airway epithelial cells from individuals who smoke cigarettes (36, 38). However, hyperoxia and resultant oxidant stress may mediate effects on protein function through both transcriptional events and post-translational protein modifications. Protein tyrosine nitration, a selective and reversible process, occurs during oxidative stress, and leads to inactivation of proteins including enzymes in glycolysis and in the TCA cycle, resulting in inhibition of energy production (63). Functional genomic analysis in this study indicates that hyperoxia upregulates proteins involved in ATP production. This was confirmed by the marked and rapid induction of ATP levels in cells exposed to hyperoxia in vitro. The lack of increase of ATP, and the activation of caspase 8, with proteasome blockade suggests that degradation and clearance of proteins, is critical for the increase of ATP production and avoidance of cell death. Notably, the absence of apoptosis in cells exposed to hyperoxia in vitro was shown in previous studies of human airway epithelial cells, in which the occurrence of cell death occurs after days of exposure but appears more suggestive of necrosis (64, 65). This transcriptional signature of genes involved in ATP production (especially mitochondrial oxidoreductase activity genes) and genes involved in protein degradation (including ubiquitins) is shared among other diseases including cystic fibrosis (43) and muscular atrophy (66). These reports highlight the importance of the interaction between these pathways as a common cellular response to stress. In an in vitro model of human fibroblast exposure to oxidative stress, the accumulation of oxidatively modified proteins correlates with the inability of the cell to maintain intracellular ATP, with subsequent occurrence of necrosis, rather than apoptosis (67). The cell death, whether by necrosis or apoptosis, of human bronchial epithelium *in vivo* requires further studies.

In summary, human bronchial epithelial cells display small variations in gene expression after exposure to *in vivo* hyperoxia. The functional categories involved are suggestive of cell cycle arrest and induction of cytoprotective chaperones and the ubiquitin-proteasome-dependent protein degradation system. Involvement of genes with oxidoreductase activity likely contribute to maintenance of reduced glutathione and thiols that are critical for oxidant-scavenging capacity and energy production. These responses, which occur within 12 h of hyperoxia exposure *in vivo*, may be effective in preserving homeostatic integrity of the airway in the short term; however, under conditions of sustained oxygen exposure and/or chronic oxidative stress, they may not be sufficient to safeguard against injury of the airway.

**Conflict of Interest Statement:** None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgments: The authors thank the Gene Expression and Genotyping Facility of the Comprehensive Cancer Center at Case (CA43703).

#### References

- Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283:L246– L255.
- Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. Am Rev Respir Dis 1989;140:531–554.
- van der Vliet A, Cross CE. Oxidants, nitrosants, and the lung. Am J Med 2000;109:398–421.
- Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000;16:534–554.
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. FASEB J 1997;11:526–534.
- Yoo JH, Erzurum SC, Hay JG, Lemarchand P, Crystal RG. Vulnerability of the human airway epithelium to hyperoxia: constitutive expression of the catalase gene in human bronchial epithelial cells despite oxidant stress. J Clin Invest 1994;93:297–302.
- Comhair SA, Thomassen MJ, Erzurum SC. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O<sub>2</sub> or cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:350–354.
- Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF. Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:573–581.
- Carvalho CR, de Paula Pinto Schettino G, Maranhao B, Bethlem EP. Hyperoxia and lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 1998;4:300–304.
- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1723–1729.
- Comroe J. Oxygen toxicity: the effect of inhalation of high concentration of oxygen for 24 hours on normal men at sea level and at a simulated altitude of 18,000 feet. JAMA 1945;128:710–717.
- Erzurum SC, Danel C, Gillissen A, Chu CS, Trapnell BC, Crystal RG. In vivo antioxidant gene expression in human airway epithelium of normal individuals exposed to 100% O2. J Appl Physiol 1993;75:1256– 1262.
- Sackner MA, Landa J, Hirsch J, Zapata A. Pulmonary effects of oxygen breathing: a 6-hour study in normal men. Ann Intern Med 1975;82: 40–43.
- 14. Danel C, Erzurum SC, Prayssac P, Eissa NT, Crystal RG, Herve P, Baudet B, Mazmanian M, Lemarchand P. Gene therapy for oxidant injury-related diseases: adenovirus-mediated transfer of superoxide dismutase and catalase cDNAs protects against hyperoxia but not against ischemia-reperfusion lung injury. *Hum Gene Ther* 1998;9:1487– 1496.
- Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:286–292.
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:709–718.
- Erzurum SC, Lemarchand P, Rosenfeld MA, Yoo JH, Crystal RG. Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-

mediated transfer of the human catalase cDNA. *Nucleic Acids Res* 1993;21:1607–1612.

- Lillig CH, Berndt C, Vergnolle O, Lonn ME, Hudemann C, Bill E, Holmgren A. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:8168–8173.
- Liu G, Loraine AE, Shigeta R, Cline M, Cheng J, Valmeekam V, Sun S, Kulp D, Siani-Rose MA. NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res* 2003;31:82–86.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863–14868.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000;25:25–29.
- 22. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, *et al.* GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 2003;4:R28.
- 23. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 1988; 48:1904–1909.
- Comhair SA, Bhathena PR, Farver C, Thunnissen FB, Erzurum SC. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J* 2001;15:70–78.
- Wu BJ, Morimoto RI. Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6070–6074.
- Donati YR, Slosman DO, Polla BS. Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2571–2577.
- Kolodziejski PJ, Musial A, Koo JS, Eissa NT. Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12315–12320.
- Enoksson M, Fernandes AP, Prast S, Lillig CH, Holmgren A, Orrenius S. Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:774– 779.
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 2001;410:490–494.
- Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnelle D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:10957–10961.
- Gerber A, Heimburg A, Reisenauer A, Wille A, Welte T, Buhling F. Proteasome inhibitors modulate chemokine production in lung epithelial and monocytic cells. *Eur Respir J* 2004;24:40–48.
- 32. Boncoeur E, Tabary O, Bonvin E, Muselet C, Fritah A, Lefait E, Redeuilh G, Clement A, Jacquot J, Henrion-Caude A. Oxidative stress response results in increased p21(WAF1/CIP1) degradation in cystic fibrosis lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006;40:75–86.
- Wong HR, Menendez IY, Ryan MA, Denenberg AG, Wispe JR. Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *Am J Physiol* 1998;275:L836–L841.
- 34. Wu HM, Wen HC, Lin WW. Proteasome inhibitors stimulate interleukin-8 expression via Ras and apoptosis signal-regulating kinase-dependent extracellular signal-related kinase and c-Jun N-terminal kinase activation. Am J Respir Cell Mol Biol 2002;27:234–243.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997;57:1835–1840.
- Hackett NR, Heguy A, Harvey BG, O'Connor TP, Luettich K, Flieder DB, Kaplan R, Crystal RG. Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:331–343.
- Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, Palma J, Brody JS. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10143–10148.
- Perkowski S, Sun J, Singhal S, Santiago J, Leikauf GD, Albelda SM. Gene expression profiling of the early pulmonary response to hyperoxia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:682–696.
- Comhair SA, Lewis MJ, Bhathena PR, Hammel JP, Erzurum SC. Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals

with chronic beryllium disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;159: 1824–1829.

- Kaminski N, Friedman N. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. Am J Respir Cell Mol Biol 2002;27:125–132.
- Spira A, Beane J, Pinto-Plata V, Kadar A, Liu G, Shah V, Celli B, Brody JS. Gene expression profiling of human lung tissue from smokers with severe emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:601–610.
- Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, Gabrielson E, Garcia JG, Geoghegan J, Germino G, *et al.* Multiplelaboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods* 2005;2: 345–350.
- Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JGN, Guggino WB, Boyle MP. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:327–336.
- 44. Gruber MP, Coldren CD, Woolum MD, Cosgrove GP, Zeng C, Baron AE, Moore MD, Cool CD, Worthen GS, Brown KK, et al. Human lung project: evaluating variance of gene expression in the human lung. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;35:65–71.
- Strange K. The end of "naive reductionism": rise of systems biology or renaissance of physiology? *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C968– C974.
- 46. Waxman AB, Einarsson O, Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB, Johnston R, Homer RJ, Elias JA. Targeted lung expression of interleukin-11 enhances murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation. *J Clin Invest* 1998;101:1970– 1982.
- Ho YS, Dey MS, Crapo JD. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. Am J Physiol 1996;270:L810–L818.
- Rahman I, Mulier B, Gilmour PS, Watchorn T, Donaldson K, Jeffery PK, MacNee W. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. *Biochem Pharmacol* 2001;62:787–794.
- Ray S, Watkins DN, Misso NL, Thompson PJ. Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clin Exp Allergy* 2002;32: 571–577.
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Donaldson K, MacNee W. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;275:L80–L86.
- van Klaveren RJ, Demedts M, Nemery B. Cellular glutathione turnover in vitro, with emphasis on type II pneumocytes. *Eur Respir J* 1997;10: 1392–1400.
- Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY, Kleeberger SR. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:175–182.
- 53. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop

normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. J Biol Chem 1997;272:16644–16651.

- McGrath SA. Induction of p21WAF/CIP1 during hyperoxia. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;18:179–187.
- Corroyer S, Maitre B, Cazals V, Clement A. Altered regulation of G1 cyclins in oxidant-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells: accumulation of inactive cyclin E-DCK2 complexes. *J Biol Chem* 1996;271:25117–25125.
- O'Reilly MA, Staversky RJ, Watkins RH, Reed CK, de Mesy Jensen KL, Finkelstein JN, Keng PC. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:703–710.
- Helt CE, Staversky RJ, Lee YJ, Bambara RA, Keng PC, O'Reilly MA. The Cdk and PCNA domains on p21Cip1 both function to inhibit G1/S progression during hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L506–L513.
- Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895–899.
- Horibe T, Gomi M, Iguchi D, Ito H, Kitamura Y, Masuoka T, Tsujimoto I, Kimura T, Kikuchi M. Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. J Biol Chem 2004;279:4604– 4611.
- Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:79–87.
- Zeitlin PL, Gail DB, Banks-Schlegel S. Protein processing and degradation in pulmonary health and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:642–645.
- Allen CB, White CW. Glucose modulates cell death due to normobaric hyperoxia by maintaining cellular ATP. Am J Physiol 1998;274:L159– L164.
- Aulak KS, Koeck T, Crabb JW, Stuehr DJ. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286: H30–H38.
- Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Mantell L, Fein AM, Horowitz S. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271:15182–15186.
- Mantell LL, Lee PJ. Signal transduction pathways in hyperoxia-induced lung cell death. *Mol Genet Metab* 2000;71:359–370.
- 66. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004;18:39–51.
- Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1727–1731.
- Dudoit SD, Y. Y., Callow MJ, Speed TP. Statistical methods for identifying differently expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical Report #578. Stanford: Stanford University; 2000. p. 38.

## D. Discussion des résultats

L'analyse de transcriptome appliquée dans cette étude apporte une vision globale intégrée des mécanismes impliqués dans la réponse de l'épithélium à l'hyperoxie. Ces mécanismes sont complexes car les voies de signalisation impliquées sont nombreuses, ont un certain degré de redondance, et varient d'un type cellulaire à un autre. L'analyse étant limitée à la seule étape du transcriptome ne rend de plus pas compte des étapes suivantes de maturation et d'activation des protéines et ne permet pas d'approcher une fonction ou une voie de régulation de manière fine. L'importance de la localisation cellulaire des protéines régulatrices et des facteurs de transcription n'est pas abordée dans cette approche qui aborde l'ensemble du transcriptome de la cellule par l'utilisation des ARN totaux. Néanmoins, l'approche de génomique fonctionnelle permet de regrouper l'ensemble des gènes exprimés en fonction des voies auxquelles ils appartiennent et de préciser l'importance respective de chacune d'elles. Elle permet d'en identifier de nouvelles voies et en cela est un précieux outil pour orienter les recherches futures. Cette vision dynamique de l'organisation de la réponse à l'hyperoxie in vivo permet de hiérarchiser la place d'une voie et de sa cinétique de réponse par rapport aux autres, dans l'environnement épithélial bronchique normal chez l'homme, ce qui ouvre des perspectives d'intervention sur de nouvelles cibles précoces et spécifiques (201).

A partir de la série des 9787 gènes retenus après application de l'algorithme qualité d'Affymetrix, seuls 135 sont finalement différentiellement exprimés en utilisant le test statistique de Welch ce qui représente 1,4% de la série initiale (manuscrit 1, tableaux 2 et 3). Davantage de gènes sont sur-exprimés que sous-exprimés, ce qui est cohérent avec 2 études génomiques précédentes comparables qui ont évalué l'effet de la fumée de tabac sur l'épithélium bronchique (56, 61). Les ratios d'expression entre hyperoxie et normoxie (quantité de transcrit hyperoxie/normoxie) restent cependant peu élevés ou abaissés, ce qui témoigne d'une réponse cellulaire modeste, peu intense au niveau transcriptionnel dans les 12 premières heures suivant l'hyperoxie. Une explication pourrait être la protection qu'exerce la barrière muqueuse et antioxydante extracellulaire, notamment via le glutathion efficace dans un premier temps et neutralisant une partie du stress oxydant (18).

Pourtant on n'observe pas de dérégulation significative des principales enzymes du métabolisme du glutathion, ni de la superoxyde dismutase (SOD), ni de la catalase. Les

résultats sont variables en fonction des modèles d'étude pour ces principales enzymes antioxydantes, avec des similitudes entre les modèles humains et murins et différents chez le rat (71, 75, 77, 188, 208). Concernant la SOD et la catalase, leur place semble limitée dans cette réponse précoce, comme le démontre l'absence d'effet protecteur observé sur des modèles surexprimants la SOD ou la catalase (74, 209). Par contre, l'absence d'augmentation du glutathion contraste avec ce qui est rapporté dans des modèles de lignées cellulaires humaines *in vitro* (77, 171). Ceci est probablement lié au temps d'analyse de 12h retenu dans notre etude. En effet la cinétique de la glutamylcystéine ligase, qui est l'enzyme limitante de la synthèse du glutathion, est rapide (en quelques heures) mais transitoire (retour à la normale à 12h) (210). De plus la plupart des autres enzymes du métabolisme du glutathion ne sont pas modifiées dans des modèles de cultures primaires ou de lignées épithéliales bronchiques humaines *in vitro* (77, 210, 211). Ainsi il ne semble pas que les enzymes du métabolisme du glutathion, la SOD ni la catalase aient un rôle majeur dans la réponse précoce à l'hyperoxie *in vivo*.

L'identification de séries de gènes impliqués dans des fonctions cellulaires bien définies est un temps essentiel de cette approche de biologie des systèmes (193, 200, 212, 213) (**figures 10, 11**). Notre analyse objective une augmentation des phosphatases cellulaires au niveau transcriptionnel, qui suggère une diminution des processus de phosphorylation compatible avec un arrêt du cycle cellulaire (manuscrit 1, tableau 4). Ce résultat est cohérent avec les données sur culture *in vitro* qui démontrent un blocage précoce du cycle cellulaire à la phase G1/S médié par p21, le principal inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (87, 88).

**Figure 10:** fonctions cellulaires impliquées dans la réponse précoce à l'hyperoxie chez le sujet sain [selon GOMINER]. Valeur de P obtenue en utilisant le test de Fischer (entre parenthèses).



**Figure 11:** principales enzymes impliquées dans la réponse à l'hyperoxie chez le sujet sain [selon GOMINER]. Valeur de P obtenue en utilisant le test de Fischer (entre parenthèses).



L'analyse des principales voies impliquées dans l'orientation de la réponse précoce au niveau cellulaire identifie le système ubiquitine-protéasome (manuscrit 1, figure 3 et tableau 4). Ainsi l'altération des protéines par le stress oxydant nécessite une intégration précoce et coordonnée des systèmes de détection des protéines altérées, de réparation et de catabolisme. Il s'agit essentiellement des protéines du choc thermique et du système ubiquitine-protéasome (214-216). Nous avons ainsi confirmé l'augmentation d'expression d'HSP70 au niveau transcriptionnel à 12h d'hyperoxie *in vivo* et 24h *in vitro* (manuscrit 1, tableau 3 et figure 5). HSP70 a notamment la propriété d'atténuer la peroxydation des lipides secondaire au stress oxydant, de maintenir la conformation des protéines partiellement altérées (chaperons moléculaires) et d'interagir avec le système ubiquitine pour orienter la dégradation de celles qui ne peuvent être reconformées (215, 217).

De nombreux gènes de ce système sont retrouvés dans la série des gènes induits par l'hyperoxie et appartenant aux catégories fonctionnelles responsables du catabolisme des protéines (manuscrit, tableau 3, 4 et figure 3). Ceci est confirmé sur culture cellulaire *in vitro* avec une augmentation de l'ubiquitinylation des protéines cellulaires dans les heures suivant l'exposition à l'hyperoxie (manuscrit 1, figure 4). Une dysfonction dans la voie du catabolisme des protéines altérées et du système ubiquitine-protéasome a été rapportée dans certaines pathologies respiratoires comme la mucoviscidose et l'emphysème déficitaire en alpha 1-antitrypsine (218). La place de ces systèmes de défenses précoces semble donc centrale dans le maintien de l'homéostasie protéique et cellulaire.

Un des point crucial de cette réponse à l'hyperoxie semble être l'aptitude de la cellule à produire de l'ATP qui est indispensable à la fonction du protéasome et de la protéine chaperon HSP70 (219). Ainsi une augmentation de la glycolyse en réponse à l'hyperoxie est rapportée dans le modèle A549 (220), mais non retrouvé dans un modèle murin ou après exposition à la fumée de tabac chez l'homme (61, 188). Il est possible que cet effet soit médié par la production de dérivés réactifs nitrés en réponse au stress oxydant, qui entraîne la nitration de résidus tyrosine au niveau de sites actifs de certaines protéines de la glycolyse et du cycle de krebs qui conduirait à la diminution de la production d'ATP (221). Notre analyse génomique retrouve ainsi une surexpression d'un certain nombre de gènes à activité oxydo-réductase (notamment mitochondriaux) impliqués dans la production d'ATP. Nous avons confirmé l'augmentation précoce d'ATP sur un modèle *in vitro* en utilisant une technique par luminescence particulièrement sensible (ATPlite, PerkinElmer utilisant le couple luciférine/luciférase). La synthèse d'ATP est en fait variable dans le temps, le taux à 24h d'hyperoxie revenant à l'état de base. Peu de données sont disponibles au delà de 24h, mais une étude sur la même lignée montre que la capacité de synthèse d'ATP est dépendante du maintien de la concentration de glucose dans le milieu (220). L'absence de synthèse d'ATP après blocage du protéasome est contemporain de l'activation de la caspase 8, ce qui est cohérent avec une évolution vers l'apoptose (manuscrit 1, tableaux 3 et 4, figure 3 et 6). Ainsi le maintien de la synthèse d'ATP et du système ubiquitine-protéasome en réponse à l'hyperoxie permet la survie cellulaire et l'absence d'apoptose, qui serait en parti liée au blocage du facteur induisant l'apoptose AIF par HSP70 (222). C'est ce qui est observé dans de nombreuses études utilisant un temps précoce d'exposition à l'hyperoxie, l'évolution vers une mort cellulaire ne survenant qu'après plusieurs jours suggérant davantage un mécanisme de nécrose que d'apoptose (79, 186). Les mécanismes et voies métaboliques impliqués dans l'augmentation d'ATP restent à cependant à préciser, notamment la place de l'ubiquitination dans ce processus.

Ainsi cette étude souligne l'importance de l'arrêt précoce du cycle cellulaire en réponse à l'hyperoxie qui permet aux mécanismes de contrôle de la qualité des protéines et de la production d'ATP de restaurer l'homéostasie cellulaire au niveau de la cellule épithéliale bronchique *in vivo* chez l'homme. Ces phénomènes sont intimement liés à l'équilibre redox et impliquent de nombreux gènes à activité oxydo-réductase. Leur rôle est de maintenir les principaux antioxydants comme le glutathion et les résidus thiols dans un état réduit qui protège efficacement contre le stress oxydant et permet le maintien du métabolisme énergétique cellulaire. Cependant l'absence d'augmentation des enzymes antioxydantes confère une relative fragilité à l'épithélium des voies aériennes dont les premiers mécanismes de protection sont insuffisants pour maintenir l'homéostasie lors d'une exposition plus prolongée à l'hyperoxie, ce qui conduit la cellule vers une mort distincte de l'apoptose appelée par certains l'oncose (**figure 12**) (79).





# VII. Rôle de c-Fos dans l'expression de la NO synthase inductible au niveau de l'épithélium des voies aériennes

## A. Contexte et enjeu

L'environnement oxydatif présent au niveau des voies aériennes génère des espèces radicalaires particulièrement instables et réactives, dont l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote (NO). Ce dernier permet de détoxifier une partie des ERO en les transformant en espèces dérivées de l'azote qui constituent à leur tour un stress d'une autre nature appelé nitrosant (10, 11). L'anion superoxyde particulièrement agressif est neutralisé et transformé en peroxynitrite (ONOO) moins toxique, qui altère cependant un certain nombre de protéines en interagissant avec leurs résidus tyrosine formant les dérivés nitrotyrosines. Ainsi dans des conditions d'augmentation du stress oxydant et de synthèse du NO (comme dans l'asthme) on assiste à l'augmentation de ces composés (124). L'environnement oxydatif conduit également à la formation précoce de nitrites (NO2<sup>-</sup> et NO2<sup>-</sup>) qui peuvent secondairement réagir avec les résidus tyrosine des protéines (dérivés nitrotyrosines), et de nitrates (NO3<sup>-</sup>) non toxiques. La présence des résidus thiols sur les molécules antioxydantes conduit à la formation de dérivés S-nitrosothiols (principalement S-nitrosoglutathion) à un stade plus tardif, qui constituent un réservoir non toxique de dérivés réactifs de l'azote et qui ont des propriétés bronchodilatatrices (223, 224). Une augmentation anormale des dérivés Snitrosothiols est ainsi observée dans l'asthme sévère, la mucoviscidose et la BPCO (132, 224). Ainsi, si le NO fait partie de l'arsenal des molécules de la défense antioxydante, ses dérivés réactifs ont des propriétés biologiques qui rendent compte de ses effets délétères notamment dans l'asthme où ils ont un rôle important dans l'origine de l'inflammation (225, 226).

Les effets du NO au niveau des voies aériennes sont de différentes natures. C'est un important régulateur du tonus musculaire bronchique et vasculaire pulmonaire. Il stimule la sécrétion des mucines et agit sur la clairance muco-ciliaire par ses effets sur le battement ciliaire, est impliqué au niveau du système immunitaire en modulant la réponse inflammatoire, et possède des effets bactéricides et tumoricides (19, 227). Sa synthèse endogène est sous le contrôle des NO synthases qui convertissent la L-arginine en NO et

citrulline dans une réaction faisant intervenir une molécule d'oxygène et le NADPH. Plusieurs isoformes sont présentes dans la muqueuse des voies aériennes. Les NOS1 et NOS3, parfois appelées constitutionnelles, ont été initialement identifiées dans les neurones et les cellules endothéliales respectivement. Leur activité dépend du taux de calcium intracellulaire en se fixant sur la calmoduline et entraîne la formation de NO de l'ordre de la picomole. La NOS2 est inductible dans de nombreux types cellulaires par les cytokines et contient une unité calmoduline ; elle permet la formation de concentrations nanomolaires de NO à des taux de calcium intracellulaires de repos (21). Il existe cependant une synthèse constitutive de NO par la NOS2 au niveau épithélial respiratoire (228). C'est essentiellement cette isoforme qui est impliquée dans les mécanismes de défenses de l'épithélium des voies aériennes et dans la physiopathologie de l'asthme ou de la mucoviscidose (225, 226, 228-231).

La régulation de l'expression de la NOS2 est complexe et essentiellement transcriptionnelle (232-234). Elle est sous le contrôle d'éléments de réponse aux cytokines (73) et de facteurs de transcriptions sensibles à l'équilibre redox comme AP-1 (notamment l'hétérodimère c-Fos/c-Jun), NF- $\kappa$ B (principalement activé par l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ ), et les sites de fixation activés par l'IFN- $\gamma$  (GAS) (180, 190, 232, 235). L'IFN- $\gamma$  seul est suffisant pour induire l'expression de NOS2 au niveau de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques chez l'homme *in vitro* ce qui souligne l'importance de la voie JAK/STAT-1 dans cette réponse (169, 236). Il a ainsi été montré qu'une altération de cette voie est le mécanisme principal responsable de la susceptibilité accrue aux infections virales et de la baisse du NO rencontré dans la mucoviscidose (84, 237). De plus, la même équipe a rapporté l'importance de l'interaction entre les voies AP-1 et JAK/STAT-1, par l'intermédiaire de l'hétérodimère c-Fos/STAT-1 (191). Sa présence est nécessaire à l'activation optimale par l'IFN- $\gamma$  via la fixation sur GAS à proximité d'un site AP-1 situé entre 5 et 9 kilobases sur le promoteur de NOS2. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse du rôle pivot de c-Fos dans la réponse de NOS2 au stress oxydant (**figure 13**).

Figure 13: place de c-Fos dans les principales voies d'activation de la NOS2



## **B.** Résultats préliminaires

L'identification des séquences optimales pour l'interférence ARN contre c-Fos a été le premier temps du travail. Nous sommes partis de la séquence ARNm de c-Fos (GenBank Accession No. NM\_005252) (**figure 14**) et avons suivi les recommandations de plusieurs sociétés de biotechnologie pour cette étape dont Oligoengine (<u>http://www.oligoengine.com</u>) et Ambion (<u>http://www.ambion.com</u>). Nous utiliserons le plasmide pSUPER permettant d'obtenir des transfections stables (238). Les clones transfectés par pSUPER contenant la séquence ARN interférence c-Fos sont appelés FOSi, ceux contenant pSUPER et une séquence ARN interférence aléatoire (même composition en oligonucléotides que pour FOSi mais dans un ordre aléatoire) sont utilisés comme contrôle et appelés FOSscr.

Figure 14: séquences ARN interférence de c-Fos retenues pour la construction des plasmides FOSi



Après obtention et purification des plasmides FOSi, nous avons effectué un contrôle par séquençage. Dans la mesure où les séquences duplex d'ARN interférence générées par cette technologie peuvent induire une activation du système interféron (239), nous avons vérifié l'absence d'expression de gènes induits par les interférons de type I, notamment p56, IRF-1 et STAT-1 sur le pool cellulaire transfecté par les séquences ARNi 177 et 795. On observe l'induction de p56 uniquement après stimulation par l'association IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  et TNF $\alpha$  (**figure 15**).

**Figure 15:** western blot de p56 sur extrait protéique total (contrôle positif : lignée 293T surexprimant c-Fos après transfection par le plasmide pRSV-c-Fos). CK : IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  et TNF $\alpha$ 



Pour sélectionner les clones qui présentent le niveau d'expression de c-Fos le plus faible, nous avons effectué une série de western blots sur extrait protéique total. L'anticorps le plus couramment utilisé est l'anticorps polyclonal de lapin sc-52 (Santa Cruz Biotechnology) qui présente comme inconvénient de réagir avec d'autres épitopes, conduisant à de nombreuses bandes non spécifiques. Un exemple de résultat représentatif obtenu avec cet anticorps dans la lignée A549 est donné dans la **figure 16** en le comparant à un anticorps du même type (No. 4384) plus récent proposé par la compagnie Cell Signaling Technology.





**A.** Anticorps 4384 (Cell Signaling Technology): peu de bandes non spécifiques sont observées, avec une stimulation transitoire et optimale de c-Fos 6h après IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  et TNF $\alpha$ . **B.** Anticorps sc-52 (Santa Cruz Biotechnology) sur différents clones FOSi obtenus après transfection de la séquence c-Fos ARNi 177

Comme illustré dans la **figure 17**, les clones transfectés obtenus après sélection par traitement à la néomycine expriment des taux variables de c-Fos à l'état basal. Nous ne retiendront que ceux qui présentent le ratio c-Fos/ $\beta$ -actin le plus bas, notamment le clone 8.

Figure 17: expression de c-Fos selon les clones sélectionnés en utilisant la séquence c-Fos ARNi 177



Conjointement à cette étude mécanistique ciblée, nous avons effectué une analyse pangénomique sur les clones FOSi et son contrôle (FOSscr). Plusieurs situations ont été testées : la réponse à 4h et 16h d'IFN- $\gamma$ , dépendant de la voie JAK/STAT, et la réponse à 4h de TNF $\alpha$ , activant la voie NF- $\kappa$ B. Les résultats préliminaires sont présentés en **annexe F** et n'ont pas à ce jour fait l'objet d'une publication.

## C. Manuscrit 2

<u>Arnaud Chambellan</u>, Rachel Leahy, Weiling Xu, Paul J. Cruickshank, Allison Janocha, Katalin Szabo, Steven B. Cannady, Suzy A.A.Comhair, and Serpil C. Erzurum.Pivotal role of c-Fos in nitric oxide synthase 2 expression in airway epithelial cells. Nitric Oxide 2009; 20: 143-149

Nitric Oxide 20 (2009) 143-149

Contents lists available at ScienceDirect

## Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox



Arnaud Chambellan<sup>a,b,c,d</sup>, Rachel Leahy<sup>d</sup>, Weiling Xu<sup>d</sup>, Paul J. Cruickshank<sup>d</sup>, Allison Janocha<sup>d</sup>, Katalin Szabo<sup>d</sup>, Steven B. Cannady<sup>d</sup>, Suzy A.A. Comhair<sup>d</sup>, Serpil C. Erzurum<sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes F-44000, France

<sup>b</sup> Université de Nantes, Nantes F-44000, France

<sup>c</sup> CHU Nantes, laboratoire d'explorations fonctionnelles, Nantes F-44000, France

<sup>d</sup> Department of Pathobiology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, 9500 Euclid Ave/NC22, Cleveland, OH 44195, USA

e Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Respiratory Institute, Cleveland Clinic, 9500 Euclid Ave/NC20, OH 44195, USA

## ARTICLE INFO

Article history: Received 16 May 2008 Revised 4 December 2008 Available online 24 December 2008

Keywords: Nitric oxide synthase c-Fos Activator protein-1 RNA interference

## ABSTRACT

The regulation of nitric oxide synthase 2 (NOS2) in airway epithelial cells plays a key role in the innate host response to a wide variety of microbial agents and also participates in the generation of pathologic airway inflammation. Among the important signalling cascades that direct NOS2 gene expression are nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )/signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1). Previous studies suggest activator protein-1 (AP-1), in particular c-Fos component of AP-1, influences NOS2 expression. We investigated the effect of c-Fos modulation using RNA interference siRNA on NOS2 gene expression. A549 cells stably transfected with a plasmid overexpressing a c-Fos siRNA construct (FOSi) resulted in a decrease of NOS2 protein inducibility by IFN  $\gamma$ . In contrast, classical IFN  $\gamma$  inducible signal transduction pathways interferon regulated factor-1 (IRF-1) and pSTAT-1 were activated at a similar magnitude in FOSi and control cells. DNA–protein binding assays showed that c-Fos binding was present in wild type cells, but reduced in FOSi clones. FOSi clones had activation of NF $\kappa$ B detectable by DNA–protein binding assays, which may have contributed to a decrease of NOS2 expression. Overall, these studies indicate that c-Fos is a requisite and specific component for inducible NOS2 expression.

This study was supported by Grant HL60917 from National Institutes of Health. A.C. was supported by grants from the French Cystic Fibrosis Association "Vaincre la Mucoviscidose" (VLM).

## Introduction

The airway epithelium is continuously exposed to a wide variety of airborne infectious agents and particulate matter. The ability to maintain epithelial homeostasis and integrity depends largely on innate host regulation of defense mechanisms by the epithelial cells in the airway [1]. Nitric oxide (NO) production by the airway epithelial cells is a critical component of the host defense armamentarium of the airway [2–4]. NO has proinflammatory and immunomodulatory effects and is synthesized in airway epithelial cells by the inducible nitric oxide synthase (NOS2) [5,6]. NO and reactive nitrogen species (RNS) have been implicated in a wide variety of homeostatic and pathophysiological processes, such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and cystic fibrosis (CF) [1,7–9]. Investigations have identified some of the mediators and signaling pathways that direct NOS2 expression.

\* Corresponding author. Address: Department of Pathobiology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, 9500 Euclid Ave/NC22, Cleveland, OH 44195, USA. Fax: +1 216 636 0104.

E-mail address: erzurus@ccf.org (S.C. Erzurum).

In general, expression of NOS2 is regulated at the transcriptional level; the 5' flanking region of the gene has binding sites for cytokine-responsive elements and redox-sensitive transcription factors such as activator protein-1 (AP-1), nuclear factor  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) and IFN  $\gamma$ -activated sites (GAS) [3,10–12]. IFN  $\gamma$  alone is sufficient for induction of the NOS2 gene in primary human airway epithelial cells, but DNA sites other than GAS are required for IFN  $\gamma$  activation of the NOS2 promoter [10,13]. Previous study suggests that c-Fos interacts with signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1) in binding to the GAS element close to an AP-1 site located at 4.9 kb upstream of the transcription start site of NOS2 and is required for maximal promoter induction [14]. In this context, we hypothesized that c-Fos is a pivotal checkpoint in the IFN/STAT1 signalling pathway to NOS2 expression in airway epithelium. To test this, stable c-Fos knockdown airway epithelial cells created using RNA interference against c-Fos were evaluated for NOS2 expression and regulation of NO synthesis.

## **Experimental procedures**

## Construction of pSUPER plasmid expressing c-Fos siRNA

To knock-down expression of c-Fos, several 19-nucleotides (-nt) targeting sequences of c-Fos mRNA (GenBank Accession No.



<sup>1089-8603/\$ -</sup> see front matter  $\odot$  2009 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.niox.2008.12.004

NM005252) were designed according to the manufacturer's instructions (OligoEngine, Inc., Seattle, WA) [15]. They included c-Fos177RNAi (target sequence CTTCATTCCCACGGTCACT-nt 177–195), c-Fos498RNAi (target sequence GCGGAGACAGACCAACTAG-nt 498–516), c-Fos795RNAi (target sequence GACCGAGCCACTATGACC-nt 795–813), and a scrambled version of c-Fos177RNAi (GTCTCAACCCCTCGTATCT). A BLAST analysis was performed to ensure that there was no significant sequence homology with other human genes. All 64 oligonucleotides, containing the unique 19-nt target in both sense and antisense orientation, 9-nt spacer sequence (hairpin), BglII enzyme site at 5' end and HindIII enzyme site at 3' end (Fig. 1A), were synthesized by Integrated DNA Technology, Inc. (IDT, Coralville, IA). Forward and reverse 64-nts were annealed and cloned into downstream of H1 promoter of pSU-PER.neo vector system. All constructs were verified by sequencing.

## Cell culture and stable transfection

A549 cells (ATCC, Manassas, VA), an epithelial cell line derived from human lung adenocarcinoma, were cultured in MEM (Invitro-

gen, Carlsbad, CA) with 10% heat-inactivated FCS, 1% penicillin/ streptomycin and 1% L-glutamine. IFN- $\gamma$  was a gift from Genentech (South San Francisco, CA) and used at 10<sup>4</sup> U/ml. Recombinant human IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were purchased from Biosource (Camarillo, CA) and used at 0.5 ng/ml and 10 ng/ml respectively. A549 cells were transfected with the plasmid constructs for 8 h at 30% confluence using Lipofectamine Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. They were split at day 1 and diluted in fresh medium. From day 2 to day 14, cells were washed with PBS and incubated with selection medium containing 600 µg/ml G418 sulfate (Mediatech, Inc., Hendon, VA). After two weeks in selective medium, approximately 50 clones of each plasmid construct were picked and expanded separately in culture plates containing fresh medium with G418. Stable transfection clones expressing c-Fos siRNA were analyzed by Western blot and immunofluorescence to select clones with knockdown effect on c-Fos expression. All sequences were tested for c-Fos protein expression and the c-Fos177RNAi sequence (Fig. 1A) was finally kept for further analysis. We then synthesized a scrambled sequence of c-Fos siRNA (named c-Fos177scrRNAi) containing the same oligonu-





**Fig. 1.** (A) Structure of the 64-mer DNA chemically synthesized oligonucleotide containing the unique 19-nt sequence to c-Fos mRNA (red: sense, blue: antisense) and the predicted transcript against c-Fos generated from c-Fos 177RNAi/pSUPER.neo plasmid. (B) Western blot of immunoprecipitated c-Fos. Expression shows a decrease of c-Fos in A549 cells stably transfected by c-Fos 177RNAi/pSUPER.neo plasmid (FOSi) as compared to scrambled clone FOSscr. 293T cell line transfected with pRSV-c-Fos over-expression construct was used as positive control for c-Fos (+ ctrl). Results are representative of three different gels. (C–H) Cytokine (CK including IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) stimulation of FOSi cells (G and H) have less nuclear localization of c-Fos as compared to FOSscr (D and E). c-Fos antigen detection by immunofluorescence staining is in green (C, D, F, and G) and nuclei identified by DAPI positive staining in blue (E and H). Results are representative of three or more separate experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

cleotide content as c-Fos177RNAi but in a random order to use as control. Clones transfected by c-Fos177RNAi/pSUPER.neo vector and c-Fos177scrRNAi/pSUPER.neo vector were further named FOSi clones and FOSscr clones respectively.

## Western blot analysis

Whole cell protein extracts from A549 cells were prepared as previously described [14,16]. Proteins (70 µg/lane) were separated by electrophoresis on 15% SDS–PAGE HCl gel and transferred to nitrocellulose membrane or onto Immuno-Blot<sup>™</sup> PVDF Membrane (0.2 µm, Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Primary antibodies (Ab) used included anti-c-Fos, anti-IRF-1, anti-STAT-1, anti-MHC-I, anti-p50, anti-p65 Ab (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-NOS2 polyclonal Ab NO53 (Merck, Rahway, NJ) and mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal Ab AC-15 (Sigma–Aldrich, St Louis, MO). The secondary Ab was conjugated with horseradish peroxidase (GE Healthcare, Piscataway, NJ). The detection of signal was performed with enhanced chemiluminescent system ECL (GE Healthcare).

#### Immunoprecipitation

A549 cells were lysed with nonreducing lysis buffer as previously described [14]. The whole cell lysis was incubated with anti-c-Fos antibody overnight (Cell Signaling, Danvers, MA), followed by Protein G-Sepharose (Amersham Laboratories, Arlington Heights, IL) to extract the immunoblobulins. The captured beads were washed and boiled in denaturing, nonreducing buffer then analyzed by Western blot as described above, using a second anti-c-Fos antibody (Santa Cruz). To ensure equal protein loading, the whole cell lysates were further analyzed by western analyses for the presence of  $\beta$ -actin.

## Immunofluorescence

Cells were grown on cover slides in 6-well plates. They were incubated in medium with 1% FCS and then stimulated with cytokine mixture (CK), containing  $10^4$  U/ml IFN- $\gamma$ , 0.5 ng/ml IL-1  $\beta$  and 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 24 h. Cells were then washed with PBS and fixed for 30 min with ice-cold acetone/methanol (1:1). After fixation, cells were blocked with 2% fetal bovine serum (FBS) for 30 min, incubated with rabbit anti-c-Fos Ab (Santa Cruz Biotechnology) in PBS/2% FBS for 30 min at room temperature and then incubated with Alexa Fluor 488 (green) conjugated anti-rabbit IgG Ab A21441 (Invitrogen) in PBS/2% FBS for 1 h at room temperature. The slides were mounted with Vectashield mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Labs, Burlingame, CA), sealed and analyzed by confocal laser-scanning microscopy (TCS-40; Leica Microsystems, Cambridge, UK).

#### Electrophoretic mobility shift assay

Whole cell extract was prepared as previously described [14,17,18]. Oligonucleotides used in EMSA included the NOS2 AP-1u site (5'-GCCAGCT<u>TGAGTCA</u>CACTCCA-3' and the NOS2 GAS site (5'-CGGGCGT<u>TTCCAGTAA</u>AAATC-3') synthesized by Operon (Alameda, CA) and then end-labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP by polynucleotide kinase [14,17,18]. NF $\kappa$ B site (5'-AGTTGA<u>GGGGACTTTCCC</u>AGGC-3') was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Underlined sequences represent the consensus elements for AP-1, GAS and NF $\kappa$ B. To specifically identify AP-1, GAS binding-factor, and NF $\kappa$ B proteins in binding complexes, rabbit anti-c-Fos, p50 or p65 polyclonal Ab (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-STAT-1 polyclonal Ab [17,19], or nonimmune rabbit IgG (Biodesign, Saco, ME) was added to the binding reaction mix.

## Nitrite and nitrate in the supernatant

To evaluate NO synthesis, total nitrite and nitrate (NOx) concentrations in the culture supernatants were measured using chemiluminescence as previously described [20]. Briefly, total NOx was converted to NO by a saturated solution of VCl<sub>3</sub> in 1 M HCl, and NO generated was detected by the Sievers NOA 280i (GE Analytical Instruments, Boulder, CO). Sample NOx concentration was determined by adding 20  $\mu$ l of cell supernatant to the reaction vessel. All samples were measured in triplicate and the NOx concentrations were determined by interpolation using authentic standards of nitrate.

## Statistical analysis

Statistical comparisons were performed using JMP<sup>®</sup> statistical software, version 7.0 (SAS Institute, Cary, NC). For NOx measurements, data were expressed as fold increase from baseline levels, and comparison between groups was analyzed using the one way ANOVA. All pairwise were analyzed with the Tukey test. Relationships were considered statistically significant when P < 0.05.

## Results

# c-Fos protein expression is decreased in A549 cells stably transfected with c-Fos siRNA plasmid vector

Whole cell extracts were evaluated at baseline for c-Fos expression by western blot on every clone stably transfected with pSU-PER.neo plasmid containing c-Fos177RNAi (Fig. 1A), c-Fos498RNAi or c-Fos795RNAi sequences. For further analysis, we selected clones stably transfected with pSUPER.neo plasmid containing c-Fos177RNAi (named FOSi) which displayed approximately 40% decrease of c-Fos expression (FOSscr 0.52 ± 0.28; FOSi



**Fig. 2.** Decreased NOS2 AP-1 binding in FOSi. EMSA of the NOS2 AP-1-binding activity in extracts from A549, FOSi, and FOSscr cells after exposure to CK or TNFα for 3 h using the radiolabeled NOS2 AP-1u oligonucleotide. c-Fos and c-Jun antibodies were added to identify binding proteins (lanes 3 and 4). The arrow indicates supershift of the binding complex by anti-c-Fos Ab (lane 3). The autoradiograph is representative of two separate experiments.

 $0.33 \pm 0.17$ ) compared to c-Fos177scrRNAi (named FOSscr) (Fig. 1B). The phase contrast microscopy appearance of clones was comparable to A549 cells (data not shown). Cytokine induction of c-Fos nuclear trans-localization was reduced substantially in FOSi cells as compared to FOSscr or A549 wild type cells (Fig. 1C–H).

## c-Fos binding to NOS2 AP-1 site is reduced in FOSi

To evaluate the NOS2 AP1 binding activity of lysates from FOSi cells stimulated with CK, EMSA was performed using duplex oligonucleotides from the AP-1 site of the human NOS2 promoter region (from -5574 to -4909 bp) (GeneBank Accession No. AF017634). Fig. 2 shows the presence of DNA binding activity at baseline in A549 and FOSscr which increases after CK stimulation but not with TNF $\alpha$  stimulation alone. In contrast, DNA binding was diminished in FOSi cells under all three conditions. The AP-1 binding activity present in CK stimulated FOSi is attributable to c-Fos binding as shown by the supershift in Iane 3. Thus, the FOSi had reduction of c-Fos protein, nuclear translocation and DNA binding.

#### Loss of NOS2 expression in FOSi

We previously reported that c-Fos is involved in NOS2 expression [14]. Here, CK stimulation induced NOS2 expression in A549 and FOSscr cells, whereas FOSi cells had decreased NOS2 protein expression as shown in different clones (Fig. 3A). The c-Fos knockdown did not affect STAT-1, phospho-STAT-1 (pSTAT-1), or interferon-related factor-1 (IRF-1) (Fig. 3B). This indicates that the interferon system was not activated by the siRNAs [21].

## Impairment of NO production by FOSi

The functional consequence of c-Fos silencing on NO production in response to cytokine stimulation (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) was evaluated. The cells were incubated in serum free medium overnight, with or without CK for 24 h. The supernatant was collected for the measure of end products of NO in solution, nitrate and nitrite (NOx). The basal level of NOx in A549, FOSscr and FOSi were similar. CK stimulation led to increase of NOx production by FOSscr cells but not in FOSi (Fig. 3C). A549 cells produced NOx at levels similar to those previously published [17,22].

#### pSTAT-1 binding to NOS2-GAS is preserved in FOSi

We previously reported a physical interaction between c-Fos and STAT-1 after IFN $\gamma$  activation of cells [14]. The STAT-1/c-Fos heterodimer binds at the GAS that is in proximity to the AP-1 site, 4.9 kb upstream of the NOS2 transcriptional start site. To evaluate the impact of c-Fos knockdown on binding of pSTAT-1 to the GAS element of the NOS2 promoter, EMSA was performed using extracts from A549, FOSi, and FOSscr cells that were exposed to IFN $\gamma$ for 30 min. Phospho-STAT–GAS binding in FOSi was similar to that observed in A549 and FOSscr. Supershift of the binding complex was noted with anti-STAT-1 and anti-c-Fos Ab (Fig. 3D). Thus, reduction of NOS2 expression in FOSi was not necessarily related to less binding at the GAS element, or loss of c-Fos from the binding complex.

## Consequence of AP-1 impairment on NFkB activition in FOSi

NFκB was also evaluated in the FOSi [10,11]. A549, FOSi and FOSscr cells were exposed to TNFα for 30 min. The whole cell extract was evaluated in EMSA with the radiolabeled consensus NOS2 NFκB sequence. Unexpectedly, NFκB–DNA binding was strongly increased in FOSi, suggesting an effect of c-Fos knockdown

on NF $\kappa$ B activation (Fig. 4A). The presence of p50 and p65 in the DNA-protein binding complex was confirmed by supershift using anti-p50 and anti-p65 Ab (Fig. 4A). Western analysis identified a slight increase of p50, but not p65 protein in FOSi cells (Fig. 4B). Since redox is a major regulator of NF $\kappa$ B activation, we also evaluated the redox sensitive Bcl-2 protein expression. Bcl-2 was induced in FOSi at baseline and was similar after CK expression. These findings suggest c-Fos knockdown modified redox in the cell which was associated with abrogation of NOS2 induction (Fig. 4B).

## Discussion

Targeting c-Fos using RNA interference successfully reduced c-Fos expression, retards nuclear translocation, and inhibits DNA binding. As hypothesized, the knockdown of c-Fos resulted in a decrease in NOS2 gene induction and NO synthesis in cytokine–stimulated lung epithelial cells. NOS2 expression is primarily regulated at the transcription level, and the decrease in NOS2 in the FOSi was related to less c-Fos/c-Jun heterodimer binding to the NOS2 AP-1u site. However, STAT1–GAS binding was not affected and c-Fos was detectable within the STAT1–GAS binding complex. Thus, reduction of NOS2 expression in FOSi was not related to less binding at the GAS element, or loss of c-Fos/STAT1 interaction.

The expression and regulation of NOS2 in airway epithelial cells is closely related to activation of transcription factors, including the JAK/STAT-1, NFκB and AP-1 signal transduction pathways [10,11,13,18,23,24]. In primary human airway epithelial cells, IFN $\gamma$ alone induces NOS2 in vitro highlighting the central role of this pathway in NOS2 induction [25]. Moreover, inhibition of IFN-IAK/ STAT pathway blocks NOS2 expression in A549 cells [23]. Promoter analyses of the NOS2 gene also identify that mutations of NFkB sites result in about 85% decrease of promoter activity with cytokine stimulation [10]. While STAT1 and NFkB have been clearly identified as important signal transduction pathways to NOS2 gene expression [18,23-25], the role of AP-1 in NOS2 expression has not been extensively studied. Mice genetically deficient in c-Fos do not have abnormality in lung growth or development, but the model was not specifically evaluated for NOS2 induction or host defense [26]. An antisense strategy against c-Fos suggested that induction of NOS2 following cytokine stimulation is dependent upon c-Fos [14]. Here, even though a level of c-Fos persists in FOSi, it appears that lowering its level is sufficient to abrogate translocation and DNA binding at AP-1 sites and reduce NOS2 induction. The fact that reduction of c-Fos is adequate to diminish NOS2 expression supports the concept that multiple transcription factor interactions are involved in the NOS2 gene regulation. On the other hand, previous study showing that c-Fos over-expression does not increase NOS2 expression suggests a permissive effect of c-Fos [14].

One potential mechanism for near complete loss of AP-1-DNA binding in the FOSi, despite the presence of c-Fos protein, is that a modulation of the intracellular redox homeostasis occurs in response to a reduction of the c-Fos protein [27]. AP-1 binding activity depends on the redox state of the c-Fos and c-Jun proteins. Reversible redox modification of cysteine residues located in the basic DNA binding domain of c-Fos and c-Jun by redox factor 1 (ref-1) or thioredoxin has been shown to be a critical event in the AP-1-mediated responses [27–29]. It is possible that the redox or phosphorylation status of the remaining c-Fos impairs its nuclear localization even in the presence of protein in the cytoplasm. FOSi cells had greater NFkB binding complex of the NOS2-NFkB DNA consensus oligonucleotide. To our knowledge, this is the first demonstration that knockdown of c-Fos increases NFKB activation. AP-1 and NFkB are both redox-sensitive transcription factors. There is an increase in Bcl-2 expression in FOSi cells, which supports an altered redox state, since Bcl-2 induction occurs in response to increased intracellular oxidative milieu [30]. In vivo


**Fig. 3.** (A) Reduction of NOS2 protein expression in FOSi. After 24 h exposure to CK, NOS2 is induced in A549 and FOSscr clone, but reduced in two FOSi clones. Results shown are representative of three separate experiments. (B) Western blot of IRF-1, pSTAT-1 and STAT-1 expression. After 24 h stimulation by TNF $\alpha$  or IFN $\gamma$  or cytokine mix (CK: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ), levels of expression were similar among FOSi and FOSscr and A549. pSTAT-1 was induced by IFN  $\gamma$  or CK exposure. Results shown are representative of three separate experiments. (C) Decreased NOx production by FOSi cells after 24 h CK stimulation (IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ). Results are presented as fold increase of NO production over baseline (means ± SD of 15 measures in three separate experiments). (D) NOS2–GAS binding activity using radiolabeled NOS2 GAS in A549, FOSi, and FOSscr cells after exposure to IFN $\gamma$  for 30 min. Anti-STAT-1 (lanes 3, 8, and 14), anti-c-Fos (lanes 4, 9, and 15), anti-c-Jun antibodies (lanes 5, 10, and 16), and nonimmune rabbit IgG (lanes 11 and 17) were added to the binding reactions to identify the presence of proteins in the binding complex. The supershift of the binding complex is observed with STAT-1 (arrow a) and c-Fos (arrow b). The autoradiograph is representative of two separate experiments.



**Fig. 4.** (A) NOS2–NF $\kappa$ B binding activity in A549 and FOSi cells after exposure to TNF $\alpha$  for 3 h using the radiolabeled NF $\kappa$ B binding consensus oligonucleotide. The supershift of the binding complex was observed with p65 (lanes 3, 7, and 12) and p50 Ab (lanes 4, 8, and 13) (arrows a and b, respectively). Increased NF $\kappa$ B binding activity was present in the FOSi cells induced by TNF $\alpha$ . The autoradiograph is representative of three separate experiments. (B) Expression of p50, p65 and Bcl-2 in FOSi cells as compared to FOSscr and A549 cells. iNOS expression in the FOSi clone following CK stimulation was significantly reduced, whereas Bcl2 is increased at baseline and after CK stimulation in FOSi compared to FOSscr.

studies indicate that NF $\kappa$ B and Bcl-2 increase in transgenic mice with alterations in redox homeostasis [31]. The greater NF $\kappa$ B activation may also participate in abrogation of NOS2 induction. Binding of STAT-1 to the NOS2 promoter region that contains the critical GAS element is competitive with NF $\kappa$ B due to proximity of a NF $\kappa$ B binding site. Thus, if c-Fos knockdown is associated with activation of NF $\kappa$ B, accessibility of the STAT-1 to the GAS site may be limited and affect NOS2 transcription [10,23]. Similarly, even if STAT-1 binding to GAS occurs in the NOS2 promoter, the inability of the c-Fos to bind to the AP-1 site may influence the tertiary structure imposed by the multiple DNA–protein interactions and hence impede transcription. Conversely, lesser NOS2 expression may contribute to the greater NF $\kappa$ B–DNA binding activation since NO induces S-nitrosation of p50 and its DNA binding but with less ability to transactivate gene expression [32–34].

There are limitations to the study. We used a stable transfection RNAi technology against c-Fos to obtain long-term and higher intracellular concentrations of siRNAs, which allows the study of clones for a longer time in different conditions compared to the antisense or transient transfection approach [15]. Although this is a powerful and valid approach for studying the signal transduction pathways, the efficiency of silencing depends in part on the RNAi sequence designed and the variability of expression among clones. In fact, variability in NOS2 inhibition was seen among FOSi clones. Despite this, clones displayed inhibition of cytokine-stimulated NOS2 expression providing reassurance that c-Fos gene silencing was the cause [35]. RNAi may activate the interferon system. Since regulation of NOS2 is modulated by IFNs, this may have confounded our experiments. However, the lack of IFN inducible genes expression in FOSi clones provides reassurance that IFN was not significantly activated [21].

The expression of NOS2 is pivotal to lung health as shown by susceptibility to infections in murine models deficient in NOS2, and in human conditions associated with loss of NOS2 expression [36,37]. For example, cystic fibrosis airways lack NOS2 expression due to impairment of STAT1 activation [36], and the decrease in STAT-1 and NOS2 is linked to an increase in viral replication and bacterial colonizations [37,38]. This study expands our understanding of the regulation of the innate host response and may offer strategies to augment host defense of the airway, or inhibit the excessive inflammatory processes in disease.

#### References

- V.L. Kinnula, Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases, Thorax 60 (8) (2005) 693–700.
- [2] P.F. Bove, A. van der Vliet, Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation, Free Radic. Biol. Med. 41 (4) (2006) 515–527.

- [3] W. Xu et al., Role of epithelial nitric oxide in airway viral infection, Free Radic. Biol. Med. 41 (1) (2006) 19–28.
- [4] D.J. Stuehr, Mammalian nitric oxide synthases, Biochim. Biophys. Acta 1411 (2-3) (1999) 217–230.
- [5] S.A. Comhair, S.C. Erzurum, Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 283 (2) (2002) L246–L255.
- [6] F.L. Ricciardolo et al., Nitric oxide in health and disease of the respiratory system, Physiol. Rev. 84 (3) (2004) 731–765.
- [7] I. Rahman, I.M. Adcock, Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD, Eur. Respir. J. 28 (1) (2006) 219–242.
- [8] A.M. Cantin et al., Antioxidants in cystic fibrosis Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11–12 2003, Free Radic. Biol. Med. 42 (1) (2007) 15–31.
- [9] A.A. Andreadis et al., Oxidative and nitrosative events in asthma, Free Radic. Biol. Med. 35 (3) (2003) 213–225.
- [10] J. Marks-Konczalik, S.C. Chu, J. Moss, Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor κB-binding sites, J. Biol. Chem. 273 (35) (1998) 22201–22208.
- [11] B.S. Taylor et al., Multiple NF-κB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene, J. Biol. Chem. 273 (24) (1998) 15148–15156.
- [12] S.P. Reddy, B.T. Mossman, Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 283 (6) (2002) L1161–L1178.
- [13] S.C. Chu et al., Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters, Biochem. Biophys. Res. Commun. 248 (3) (1998) 871–878.
- [14] W. Xu et al., STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 285 (1) (2003) L137–L148.
- [15] T.R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, Science 296 (5567) (2002) 550–553.
- [16] A. Chambellan et al., Gene expression profile of human airway epithelium induced by hyperoxia in vivo, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 35 (4) (2006) 424–435.
- [17] F.H. Guo et al., Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis, J. Immunol. 164 (11) (2000) 5970–5980.
- [18] K. Uetani et al., Central role of double-stranded RNA-activated protein kinase in microbial induction of nitric oxide synthase, J. Immunol. 165 (2) (2000) 988–996.
- [19] S.J. Haque et al., Roles of protein-tyrosine phosphatases in Stat1 alpha-mediated cell signaling, J. Biol. Chem. 270 (43) (1995) 25709–25714.
  [20] R.A. Dweik et al., Nitric oxide synthesis in the lung, Regulation by oxygen
- through a kinetic mechanism, J. Clin. Invest. 101 (3) (1998) 660–666. [21] C.A. Sledz et al., Activation of the interferon system by short-interfering RNAs.
- [21] C.A. Sledz et al., Activation of the interferon system by short-interfering RNAs, Nat. Cell. Biol. 5 (9) (2003) 834–839.

- [22] F.H. Guo et al., Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (17) (1995) 7809–7813.
- [23] R.W. Ganster et al., Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-κB, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (15) (2001) 8638–8643.
- [24] M.E. de Vera et al., Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (3) (1996) 1054–1059.
- [25] F.H. Guo et al., Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators, J. Clin. Invest. 100 (4) (1997) 829–838.
- [26] Z.Q. Wang et al., Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos, Nature 360 (6406) (1992) 741–745.
- [27] C. Abate et al., Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro, Science 249 (4973) (1990) 1157–1161.
- [28] D.A. Diamond et al., Redox factor-1 (Ref-1) mediates the activation of AP-1 in HeLa and NIH 3T3 cells in response to heat shock, J. Biol. Chem. 274 (24) (1999) 16959–16964.
- [29] D. Nikitovic, A. Holmgren, G. Spyrou, Inhibition of AP-1–DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos, Biochem. Biophys. Res. Commun. 242 (1) (1998) 109–112.
- [30] C.A. Barlow et al., Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells, Apoptosis 13 (5) (2008) 681–692.
- [31] L.E. Gomez-Quiroz et al., Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis, J. Biol. Chem. 283 (21) (2008) 14581-14589.
- [32] J.R. Matthews et al., Inhibition of NF-κB DNA binding by nitric oxide, Nucleic Acids Res. 24 (12) (1996) 2236–2242.
- [33] L. Connelly et al., Biphasic regulation of NF-KB activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide, J. Immunol. 166 (6) (2001) 3873– 3881.
- [34] K. Ckless, A. van der Vliet, Y. Janssen-Heininger, Oxidative-nitrosative stress and post-translational protein modifications: implications to lung structurefunction relations. Arginase modulates NF-κB activity via a nitric oxidedependent mechanism, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 36 (6) (2007) 645–653.
- [35] D.H. Kim, J.J. Rossi, Strategies for silencing human disease using RNA interference, Nat. Rev. Genet. 8 (3) (2007) 173-184.
- [36] S. Zheng et al., Impaired innate host defense causes susceptibility to respiratory virus infections in cystic fibrosis, Immunity 18 (5) (2003) 619–630.
- [37] T.J. Kelley, M.L. Drumm, Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells, J. Clin. Invest. 102 (6) (1998) 1200–1207.
- [38] S. Zheng et al., Impaired nitric oxide synthase-2 signaling pathway in cystic fibrosis airway epithelium, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 287 (2) (2004) L374–L381.

### **D.** Discussion des résultats

L'utilisation de la technologie de l'interférence ARN (240) ciblée sur le facteur de transcription c-Fos apporte des éléments nouveaux quant à la compréhension des mécanismes qui régulent l'expression de la NOS2 au niveau épithélial respiratoire. L'obtention de clones stablement transfectés par le plasmide pSUPER s'est révélée plus difficile que prévu pour plusieurs raisons. D'abord le niveau d'expression relativement faible de c-Fos rend la détection de ces variations notamment son abaissement assez délicate. Ensuite la grande variation des WB en fonction des clones nous obligea à constituer une banque de 50 clones pour chaque séquence c-Fos siRNA (clones FOSi) ce qui fut assez long et fastidieux. Enfin, seule une des 3 séquences s'est avérée intéressante en terme d'effet ARN interférent, ce qui est assez fréquent avec ce type de technologie. Une explication pour expliquer le peu de variation observée vient probablement du fait que la sélection s'est faite sur le niveau d'expression de c-Fos sur extrait protéique total, ce qui renseigne sur le pool global de c-Fos mais non sur son état d'activation ni sa compartimentalisation notamment nucléaire. Ce choix était fondé sur l'attente d'un effet plus marqué de l'interférence ARN que nous aurions alors observé sur le pool total de c-Fos. Enfin, la détection de c-Fos au niveau protéique s'est révélée difficile en raison de l'absence d'anticorps permettant une identification aisée et spécifique sur western blot. On peut aussi discuter le choix de l'utilisation du plasmide pSUPER qui depuis la publication princeps n'a fait l'objet que de peu d'études publiées (238), et le choix de la lignée épithéliale respiratoire A549. Ces faits limites l'extrapolation de nos résultats aux conditions physiologiques in vivo.

Néanmoins, nous avons pu isoler quelques clones dont l'expression de c-Fos était diminuée d'environ 30 à 50%, notamment en immunofluorescence au niveau nucléaire par comparaison à des clones contrôles obtenus après transfection par un ARNi de la même composition en nucléotides que pour les clones FOSi mais dans un ordre aléatoire (FOSscr) (manuscrit 2, figure 1C-H). Le résultat le plus reproductible quell que soit le clone FOSi est le niveau d'expression de NOS2 fortement abaissé voir totalement inhibé comparé à FOSscr (manuscrit 2, figure 3A). Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle la présence de c-Fos est un élément clé dans la réponse transcriptionnelle de NOS2. Nous précisons son mécanisme au niveau fonctionnel par la baisse de fixation du complexe AP-1 constitué notamment de c-Fos au niveau de sa séquence consensus sur le promoteur de NOS2, alors que celui-ci est présent dans A549 et les clones FOSscr, et reste inductible après stimulation par l'association IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (manuscrit 2, figure 2). Cependant c-Fos reste

présent dans le complexe c-Fos/STAT-1 fixé sur la séquence consensus GAS suite à la stimulation par l'IFN- $\gamma$  (manuscript, figure 3D) ce qui témoigne de l'utilisation possible de c-Fos dans le maintien d'autres voies de signalisation préférentielle comme JAK/STAT-1.

La production de NO indirectement évaluée par le dosage des nitrites et nitrates du surnageant est altérée dans FOSi comparé à A549 et FOSscr. En fait une compensation inattendue de l'expression de NOS2 est observée par l'activation de la voie NF-κB dans FOSi surtout au niveau de la fixation du complexe sur sa séquence consensus (manuscrit 2, figure 4B), qui réduit probablement l'impact de l'altération de la réponse AP-1 dans l'expression de NOS2.

Cette étude souligne l'importance et la complexité des mécanismes de régulation croisés entre les voies de signalisation AP-1, JAK/STAT-1, et NF- $\kappa$ B pour l'expression de NOS2. La place de NF- $\kappa$ B est confirmée en accord avec les études réalisées sur le promoteur de NOS2 qui rapportent 85% de diminution d'expression lors de mutations des sites NF- $\kappa$ B (232). Un mécanisme d'inhibition compétitive entre NF- $\kappa$ B et AP-1 pour l'accès à leur site consensus à proximité l'un de l'autre pourrait expliquer une partie de l'absence de fixation du complexe AP-1 sur son site (235).

Le principal message de notre étude est d'avoir précisé le rôle de levier qu'occupe AP-1 vis-à-vis des 2 autres principales voies NF-kB et JAK/STAT-1. Ce résultat est de même nature que l'utilisation de la stratégie antisens contre c-Fos par la même équipe (191). Ainsi baisser le niveau d'expression de c-Fos suffit à altérer la fixation de AP-1 sur le promoteur de NOS2 et son activation. A l'opposé une stratégie de surexpression de c-Fos n'entraîne pas d'augmentation d'expression de NOS2 (191). Dans la mesure où AP-1 est dépendant de l'état redox cellulaire, il est possible que l'abolition du complexe au niveau de sa séquence consensus malgré la présence d'une certaine quantité de protéine c-Fos, soit liée à une maturation de la protéine avec modification réversible des résidus cystéines dépendant de l'état redox et nécessaire à sa fonction (178). Ceci est conforté par l'augmentation de Bcl2 au niveau de FOSi (manuscrit 2, figure 4B), qui est un marqueur de milieu oxydatif (241). Ces résultats doivent être confirmés au mieux par une approche sur culture primaire épithéliale pour préciser l'intérêt de cibler c-Fos dans le contrôle de NOS2 en réponse au stress oxydant, qui pourrait permettre d'atténuer la composante de stress nitrosant et la réponse inflammatoire dans des pathologies comme l'asthme. Enfin, sa place dans l'altération d'expression de NOS2 dans la mucoviscidose reste à préciser.

L'étude génomique complémentaire n'est actuellement pas finalisée (**annexe F**). Nous n'avons obtenu de résultats que pour une expérimentation ce qui est insuffisant pour mener correctement l'analyse fonctionnelle. Néanmoins les principaux messages chez FOSi comparé à FOSscr sont une baisse de la prolifération cellulaire, une augmentation de l'activité de phosphorylation et de synthèse d'ATP (témoignant d'un métabolisme cellulaire actif), une activité redox importante et une survie cellulaire qui semble améliorée (**annexe G**). Ainsi l'invalidation de c-Fos pourrait représenter un modèle de protection cellulaire. Ces résultats restent à confirmer sur le plan mécanistique. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer le gain sur la survie lors d'une exposition à l'hyperoxie dont on sait qu'elle entraîne sur ce type cellulaire la mort par nécrose en quelques jours.

# **VIII.** Conclusions et perspectives

L'approche génomique fonctionnelle appliquée à l'étude de la réponse épithéliale bronchique à l'hyperoxie a permis d'établir une liste des principaux gènes et voies de régulation impliqués. Elle donne une vision globale synthétique pertinente en approchant l'aspect dynamique et intégré de la biologie des systèmes. L'interprétation de l'ensemble de ces données doit cependant rester prudente, car elle ne concerne que l'étape transcriptionnelle. En effet à ce stade les mécanismes de maturation post-transcriptionnels ne sont pas pris en compte et le niveau du transcrit n'est qu'une étape de la fonction physiologique. Par contre, l'intérêt est d'approcher les phénomènes complexes de transrégulation entre les différentes voies en identifiant par le regroupement des gènes modulés les fonctions impliquées. Son atout majeur tient aussi dans la quantité des informations obtenues à partir d'un prélèvement, ce qui est particulièrement utile lorsqu'il s'agit de tissus humains en condition *in vivo*, pour lesquels le rapport entre la qualité de l'information scientifique et le caractère invasif des prélèvements doit-être optimal.

L'hyperoxie représente un modèle de stress oxydant pertinent car il est particulièrement pur comparé à celui généré par les agents pathogènes, pour lesquels se mêlent dans le même temps plusieurs types de réponses, notamment les réponses immunitaires innée et acquise. L'hyperoxie se distingue aussi d'autres types de stress oxydants comme la fumée de tabac ou la pollution car il s'agit alors d'un mélange complexe de différentes molécules ayant des effets distincts et dont les voies impliquées sont le plus souvent redondantes. Ainsi l'effet de l'hyperoxie sur l'épithélium bronchique humain in vivo semble à court terme relativement bien contrôlé. Peu de gènes sont en définitive dérégulés. Les gènes antioxydants restent non modifiés dans ce premier temps de la réponse qui reste dominée par un engagement de la cellule dans les voies de maintien du métabolisme énergétique, de l'homéostasie des protéines et du maintien de l'état redox intracellulaire. Le cycle cellulaire est à l'arrêt et on n'observe pas d'orientation vers l'apoptose ou la nécrose à ce délai précoce. La mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose est classiquement observée aux temps plus tardifs dans des modèles animaux ou sur des lignées épithéliales humaines. Sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchique humaines un mécanisme de mort cellulaire par oncose (gonflement nucléaire et cellulaire) distinct de l'apoptose et médié par NF-κB est décrit (86). De récents travaux chez la souris ont rapporté un rôle crucial de l'angiopoïétine-2 dans l'induction de la mort cellulaire épithéliale par nécrose. En son absence on observe une protection de la muqueuse respiratoire (242). Cette étude vient conforter la place importante des facteurs vasculaires dans le maintien de l'intégrité du parenchyme pulmonaire, comme déjà souligné par les modèles d'emphysème suite au blocage des récepteurs au VEGF (243). Le rôle de la réponse inflammatoire apparaît secondairement avec une intervention orchestrée des cytokines IL-1 puis IL-6 et IL-8, dont le retard d'expression observé chez l'animal nouveau-né par rapport à l'adulte est protecteur de l'œdème pulmonaire lésionnel induit par l'hyperoxie (176).

La distinction du compartiment respiratoire étudié est importante car elle répond à des problématiques différentes. Au niveau bronchique, l'agression va concerner des pathologies comme la BPCO, l'asthme, la mucoviscidose et le cancer bronchique. Au niveau alvéolaire il s'agit de pathologies comme l'ædème lésionnel dans le contexte des pneumopathies infectieuses ou d'inhalation, de l'emphysème et des pneumopathies interstitielles. Ce dernier compartiment implique outre l'épithélium respiratoire, la cellule endothéliale beaucoup plus exposée à l'environnement atmosphérique étant donnée la finesse de la membrane alvéolocapillaire. Le comportement en terme de réponse antioxydante est assez similaire au niveau bronchique et alvéolaire, avec un rôle important des premières étapes de gestion du stress oxydant. Les stratégies de protection à évaluer sont celles ciblées pour neutraliser la voie de Nrf2, qui entraîne un amélioration en terme de survie cellulaire, par une diminution de l'activité de la NADPH oxydase, des voies caspase 3, JNK, et ERK. La protection mitochondriale passe par le maintien d'un ratio GSH/GSSG optimal. Au niveau alvéolaire, les stratégies ciblées sur la cellule endothéliale, comme la neutralisation de l'angiopoiétine-2 sont probablement plus pertinentes. Il a été rapporté récemment que l'invalidation de la cavéoline, constituant principal des cavéoles qu'on retrouve au niveau des pneumocytes de type 1 et de la cellule endothéliale, protège de l'apoptose et de la mort cellulaire via l'augmentation de la survivine (244). Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour distinguer les voies précoces propres à chaque type de stress (fumée de tabac et hyperoxie pour l'essentiel) afin d'évaluer l'effet de leurs inhibiteurs sélectifs.

L'effet propre du stress nitrosant induit par l'hyperoxie et autres stress oxydants dans la survie cellulaire et la réponse inflammatoire reste à décrire. En effet ces deux types de stress particuliers à la vie organique aérobie sont interdépendants en raison de la régulation transcriptionnelle de la NOS2 médiée par le stress oxydant via NF-κB et AP-1. Il serait pertinent de préciser les interactions entre les voies NF- $\kappa$ B et AP-1, et d'en identifier les étapes clés. En effet le contrôle précoce de NOS2 par l'équilibre redox et notamment AP-1 permet d'entrevoir une possibilité d'intervention potentiellement protectrice en modulant la voie AP-1. Un meilleur contrôle des étapes précoces permettrait sans doute de contenir la réponse inflammatoire plus tardive à l'agression. A ce titre nous n'avons pas déterminé le comportement des clones FOSi vis-à-vis du stress oxydant. Il serait intéressant de poursuivre l'étude pour confirmer si la diminution de c-Fos confère un avantage en terme de survie cellulaire lors d'un stress oxydant comme l'analyse génomique préliminaire et des marqueurs pro- et anti-apoptotiques semblent le suggérer (**annexes F et G**).

# IX. Annexes

A. Synthèse des principales données sur les effets de l'hyperoxie selon les modèles expérimentaux

Réponse précoce (J1-2)	Antioxydants	Facteurs de transcription	Cycle cellulaire et apoptose	Stress	Références
16HBE	GSH pic H12	NFkB $\oslash$ à H24	Viabilité 82% (idem contrôle) Gonflement mitochondries	LDH normal à H24 <b>A</b> adhérence <i>PA</i> à H24 <b>A</b> IL-8	(1) (2)
A549	GSH pic H12 GSH pic H12 ⊅GCL à H4, normal à H12 Surexpression MnSOD entraîne ↘ adhérence et IL-8	NFkB Ø à H2 MikB à H24 et <b>J</b> NFkB (via TNFα)	Viabilité 98% Gonflement mitochondries Lésions ADN entraîne <b>⊅</b> ATR puis ATM, puis P <sup>ion</sup> H2AX, Chk1 et p53	LDH normal à H24 <b>A</b> adhérence <i>PA</i> à H24, <b>A</b> IL-8 Synergie TNFα-HO2	$\begin{array}{cccc} (1) \\ (2) \\ (3) \\ (5) \\ (2) \\ (2) \\ (3$
		<b>λ</b> NFkB rapide, mais pas MAPK <b>λ</b> NFkB par TNFα, maintenu par HO2	Protège de l'apoptose	JIL-8 (via NFkB, NF-IL-6)	(9)
BEAS-2B	MnSOD, CuZnSOD, CAT, GPx, GR Ø à H16-48 🍠 GSH de 55% à J1-2		Amortalité si surexp cav-1 (Ad)	ALDH à J3	(8) Jin Y, Dittehurch
			Aautophagosomes, LC3, Atg5 à H24 ▶prolifération et Ac-caspase 3 si LC3 bloqué par ARNi Asurvie à J2 Cyr61 et P <sup>ion</sup> Akt (surexp ou ARNi)		ATS 2008 Tanaka A, Pittsburgh, ATS 2008 et 2009 (9)
H1299 (surexp p21)			P21 protecteur en maintenant Bcl-X <sub>L</sub> et Mcl-1 qui inhibent Bax et Bak respectivement		Wu YM, Rochester, ATS 2008
HBEC	CuZn- et Mn-SOD, CAT bas et ∅ après HO2 <b>Ϡ</b> NOS2, GPx ∅				(10) (11)
HBEC: human bron. ATM: Ataxia Telar interférence. $\varnothing$ : no leukemia sequence 1	chial epithelial cells. GCL : glutamylcystéine ngiectasia Mutant. H2AX: histone (Ser139) m modifié. Atg5: autophagy related 5 homolc.	<ul> <li>ligase. PA: pseudomonas aeruginosa. HO2</li> <li>Chk1: checkpoint kinase 1. CAT: catal</li> <li>Dg. Cyr61: cyctein-rich angiogenic inducer</li> </ul>	2: hyperoxie. ATR: Rad3-related prelase. GPx: glutathion peroxidase. 61. H1299: human lung adenocarci	otein kinase, dépendant de la P <sup>io</sup> GR: glutathion reductase. ARN inoma p53-deficient. Mcl-1: mye	de p53. di: ARN sloid cell

A549 SAE (Clonetics) HBEC MnSOD maintenu via NFkB à H24 (protèg	Antioxydants Facteurs d	le transcription	Cycle cellulaire et apoptose	Mortalité	Références
SAE (Clonetics) HBEC MnSOD maintenu via NFkB À H24 (protèg			TUNEL (% apoptose) : 1,6±0,6 à J2 3±0,6 à J4 2,8±0,6 à J7	Bleu trypan (%) 1 ± 1 à J2 11 ± 7 à J4 69 ± 5 à J7	(12)
SAE (Clonetics) HBEC MnSOD maintenu via NFkB ANFkB à H24 (protèg		-	TNFR-I ∅ \textstyle="background-color: square;">TSP: AFas-caspase 8 (DISC) Acaspase 9 à H24 ABid, Bax, Bcl-XL à J2-3 Acyt C à J3	Bleu trypan (%) > 50 à J3 (> 96% nécrose)	(13)
HBEC MnSOD maintenu via NFkB ANFkB à H24 (protèg			Arrêt de synthèse d'ADN	20% apoptose à J2	(14)
	D maintenu via NFkB À H	124 (protège)	Caspase 3 et annexine V $\varnothing$ Pas d'apoptose	Bleu trypan (%): 33 à J3 60 à J4 90 à J5	(15)

SAE: human small airway epithelial cells. DISC: death inducing factor complex.

Modèles animaux	Antioxydants	Facteurs de transcription	Cycle cellulaire et apoptose	Stress	Mortalité	Références
Souris C57BL /6 (très sensible HO2)			++ apoptose ( <b>A</b> p53, bax, bcl-X, Fas) et nécrose		100% à J3-4 Idem si Fas- ou p53-déficient	(16)
Souris Tg LIF				IL6 à J3	100% survie vs 100% décès chez contrôle	(17)
Souris Tg IL11	CuZnSOD, CAT et GR idem ; légère <b>A</b> MnSOD, GPx et GSH		Aapoptose	<b>⊌</b> IL1, TNFα	Survie > 10j (Nœdème lésionnel)	(18)
Souris Ang2 <sup>-/-</sup>			⊾apoptose / nécrose	▲angiopoiétine	⊾œdème, inflammation, mortalité	(19)
Souris Cav1 <sup>-/-</sup>	Protection par <b>A</b> HO1 (in vitro et vivo)	AlkBa, Ap65 (extrait nucl)	<ul> <li>Mapoptose</li> <li>P<sup>ion</sup> Akt et survie</li> <li>ACyr61 extracell</li> <li>MCyr61 cytoplasme</li> <li>Mbcl-2, pSTAT3 et Mbax</li> </ul>			(20)
Souris Nrf2 <sup>-/-</sup>	AGPx2, NADPH oxydase chez contrôle			<b>A</b> IL6	Amortalité à J3 chez Nrf2 <sup>-/-</sup> AP21 idem Nrf2 <sup>-/-</sup> et contrôle	McGrath, ATS 2009
Souris Nrf2 <sup>-/-</sup> et Nrf2 <sup>+/+</sup> , infection VRS	> Lréponse antioxydante	AAP-1/ NFkB		<b>Δ</b> réponseIFNγ <b>L</b> clairance virale		(21)

Tg: transgénique.

Modèles animany	Antioxydants	Facteurs de transcrintion	Cvele cellulaire et anontose	Strees	Mortalité	Références
Souris Nox1 <sup>4-</sup> 3j HO2	CONTROL AND	nond south a section as	Laspase 3, JNK et P <sup>ion</sup> EKK		Mmortalité et ERO épith et endoth	Carnesecchi S, San Francisco, ATS 2009
Souris GGT <sup>enul</sup> (déficiente GGT)	AeNOS, NOx, 3-nitrotyrosine		Acaspase 3, cellules TUNEL +		<b>A</b> mortalité chez GGT <sup>em1</sup> vs contrôle	Klings ES, Boston, ATS 2008
Souris surexp SOC1 (AdV)		pas d'activation de NFkB et <b>D</b> p65			Asurvie après 4j et 80% survie à J6 ▲œdème lésionnel et inflammation	Kolliputi N, Boston, ATS 2009
Souris IRAK-M déficiente			++ apoptose		Nsurvie (décès à 36h). Absence de récupération après arrêt HO2 œdème lésionnel	Lyn-Kew KE, Ann Arbor, ATS 2009
Souris adulte exposée à HO2 en néonatal				Amacro, neutro, lympho AMCP-1 TNFα, IL1β, MIP1α idem Ctl	Amortalité à J14 après infection virus influenza A vs control Corrélé à inflammation	O'Reilly MA, Rochester, ATS 2008
MLE-12		<b>7</b> AP-1, p38, JNK à H16-24			nécrose	(22)
		<b>J</b> ERK1/2 à J3	<b>≯</b> cyt c, caspase 9-3, clivage PARP		apoptose	(23)
		<b>⊅</b> c-Fos et Jun à 30mn et H24 (constant avec H2O2)			protection par DN JNK à J3	(24)
PII souris			+ GM-CSF : API3K puis Pion Akt		Aapoptose si inhibiteur PI3K	Seedahmed EM, Salt Lake City, ATS 2009
nMuLi MRC5			<b>A</b> p21 à J3 médié par p53		Arrêt cycle cellulaire Arrêt développement poumon périph	(25)
PII rat (SV40)			≯p21 et ⊾CDK2 dépendant de TGFβ à H48		Arrêt cycle cellulaire	(26)
Rat poumon et PII 3j HO2					T3 intrapériton ou trachéal : Aclairance épith alv, effet direct sur rec mb alv Moed lésion, infl	(27)
Rat + endotox IV puis >95% O2	SOD, GPx, MDA $\varnothing$ entre faible endotox vs endotox élevée	NFkB, $kB\alpha \oslash$		TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL8, ICAM1 Ø		Yu S, Shi M, Beijing ATS 2008
Rat 1j HO2				+ 1 mois : NTNFα, TLR4, TTF-1, IL-6, IL-10 (baisse immunité humor) 为HSP27		Stenson E, ATS 2009
Rat 3j HO2				IL1β, IL8, TTF-1, TLR2-4, TNFα <b>A</b> à J3 (pro-inff) et <b>V</b> de 50% des ARNm à 1 mois		Shah S, ATS 2009
MLE: murine lung epithe	lial. DN: dominant négatif. P <sup>ion</sup> : pho.	sphorylation. ERO: espèces réactiv	ves de l'oxygène. nMuLi: normal mu e n e may M. n i Decenter Ac	urine epithelial liver cell.	MRC5: murine lung fibroblast. GGT: gamma-glutamy	yl transferase.

SOC-1: Suppressor of Cytokine Signaling-1 (membre de la famille SOCs et inhibiteur de la voie IL-6). IRAK-M: IL-1 Receptor Associated-Knase-M (inhibiteur des récepteurs Toll-Like impliqués dans l'inflammation induite notamment par la bléomycine).

## **Références :**

1. Rahman I, Mulier B, Gilmour PS, Watchorn T, Donaldson K, Jeffery PK, et al. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. Biochem Pharmacol. 2001 Sep 15;62(6):787-94.

2. Arita Y, Joseph A, Koo HC, Li Y, Palaia TA, Davis JM, et al. Superoxide dismutase moderates basal and induced bacterial adherence and interleukin-8 expression in airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Dec;287(6):L1199-206.

3. Rahman I, Bel A, Mulier B, Donaldson K, MacNee W. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. Am J Physiol. 1998 Jul;275(1 Pt 1):L80-6.

4. Franek WR, Horowitz S, Stansberry L, Kazzaz JA, Koo HC, Li Y, et al. Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells. J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):569-75.

5. Kulkarni A, Das KC. Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 May;294(5):L998-L1006.

6. Li Y, Zhang W, Mantell LL, Kazzaz JA, Fein AM, Horowitz S. Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. J Biol Chem. 1997 Aug 15;272(33):20646-9.

7. Allen GL, Menendez IY, Ryan MA, Mazor RL, Wispe JR, Fiedler MA, et al. Hyperoxia synergistically increases TNF-alpha-induced interleukin-8 gene expression in A549 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Feb;278(2):L253-60.

8. Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Aug;19(2):286-92.

9. Jin Y, Kim HP, Ifedigbo E, Lau LF, Choi AM. Cyr61 protects against hyperoxia-induced cell death via Akt pathway in pulmonary epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Sep;33(3):297-302.

10. Erzurum SC, Danel C, Gillissen A, Chu CS, Trapnell BC, Crystal RG. In vivo antioxidant gene expression in human airway epithelium of normal individuals exposed to 100% O2. J Appl Physiol. 1993 Sep;75(3):1256-62.

11. Comhair SA, Thomassen MJ, Erzurum SC. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O(2) or cigarette smoke. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Sep;23(3):350-4.

12. Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Mantell L, Fein AM, Horowitz S. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. J Biol Chem. 1996 Jun 21;271(25):15182-6.

13. Wang X, Ryter SW, Dai C, Tang ZL, Watkins SC, Yin XM, et al. Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. J Biol Chem. 2003 Aug 1;278(31):29184-91.

14. Jyonouchi H, Sun S, Abiru T, Chareancholvanich S, Ingbar DH. The effects of hyperoxic injury and antioxidant vitamins on death and proliferation of human small airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Sep;19(3):426-36.

15. Franek WR, Morrow DM, Zhu H, Vancurova I, Miskolci V, Darley-Usmar K, et al. NF-kappaB protects lung epithelium against hyperoxia-induced nonapoptotic cell death-oncosis. Free Radic Biol Med. 2004 Nov 15;37(10):1670-9.

16. Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF. Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Oct;19(4):573-81.

17. Wang J, Chen Q, Corne J, Zhu Z, Lee CG, Bhandari V, et al. Pulmonary expression of leukemia inhibitory factor induces B cell hyperplasia and confers protection in hyperoxia. J Biol Chem. 2003 Aug 15;278(33):31226-32.

18. Waxman AB, Einarsson O, Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB, Johnston R, et al. Targeted lung expression of interleukin-11 enhances murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation. J Clin Invest. 1998 May 1;101(9):1970-82.

19. Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, Zhu Z, Nedrelow JH, Chupp GL, et al. Hyperoxia causes angiopoietin 2mediated acute lung injury and necrotic cell death. Nat Med. 2006 Nov;12(11):1286-93.

20. Jin Y, Kim HP, Cao J, Zhang M, Ifedigbo E, Choi AM. Caveolin-1 regulates the secretion and cytoprotection of Cyr61 in hyperoxic cell death. Faseb J. 2009 Feb;23(2):341-50.

21. Cho HY, Imani F, Miller-DeGraff L, Walters D, Melendi GA, Yamamoto M, et al. Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Jan 15;179(2):138-50.

22. Romashko J, 3rd, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, et al. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells. Free Radic Biol Med. 2003 Oct 15;35(8):978-93.

23. Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp GL, Flavell RA, Choi AM, et al. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Mar;28(3):305-15.

24. Li Y, Arita Y, Koo HC, Davis JM, Kazzaz JA. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase pathway improves cell viability in response to oxidant injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Dec;29(6):779-83.

McGrath SA. Induction of p21WAF/CIP1 during hyperoxia. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Feb;18(2):179 87.

26. Corroyer S, Maitre B, Cazals V, Clement A. Altered regulation of G1 cyclins in oxidant-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells. Accumulation of inactive cyclin E-DCK2 complexes. J Biol Chem. 1996 Oct 11;271(41):25117-25.

27. Bhargava M, Runyon MR, Smirnov D, Lei J, Groppoli TJ, Mariash CN, et al. Triiodo-L-thyronine rapidly stimulates alveolar fluid clearance in normal and hyperoxia-injured lungs. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Sep 1;178(5):506-12.

# B. Les particules diesels peuvent-elles activer les cellules de Langerhans des voies aériennes ? Étude sur un modèle *in vitro*

<u>Chambellan A.</u> Les particules diesels peuvent-elles activer les cellules de Langerhans des voies aériennes ? Étude sur un modèle *in vitro*. Résumés des DEA 1998. Rev Mal Respir 1999 ; 16 : 243-244

<u>Chambellan A</u>, Boland S, Michel L, Marchal J, Grandsaigne M, Aubier M and Soler P. Diesel exhaust particles do not activate Langerhans cells *in vitro* (abstract American Thoracic Society, Atlanta 2002) 243

244

Méthodes : La première étape de l'étude a consisté en la mise au point du double marquage de MRP1 et de l'ADN des cellules fixées par l'éthanol afin de permettre l'analyse en cytométrie de flux. L'étape suivante a été l'étude d'une technique de suppression des cellules inflammatoires utilisant des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD45, réalisée à partir de suspensions cellulaires mixtes de cellules T47D et de cellules mononuclées du sang. Le double marquage de la suspension cellulaire a été réalisé avant et après séparation. L'étude des fragments tumoraux a été effectuée, après la dissociation mécanique des cellules.

*Résultats :* Les méthodes utilisées ont permis de réaliser une étude simultanée de MRP1, du contenu en ADN et du cycle cellulaire des cellules T47D et des 2 échantillons tumoraux. La protéine MRP1 est détectée au niveau des cellules T47D et des 2 tumeurs étudiées, son expression ne varie pas avec les phases du cycle cellulaire. La technique de séparation des cellules inflammatoires permet, à partir d'une suspension cellulaire mixte de 50 % de cellules T47D et de 50 % de cellules mononuclées, d'obtenir une suspension de 95% de cellules T47D.

*Discussion* : Les résultats obtenus permettent d'envisager à terme la réalisation d'études prospectives qui permettraient de comprendre le rôle exact joué par MRP1 dans la chimiorésistance clinique.

*Conclusion :* Les méthodes décrites sont réalisées sur des modèles *in vitro* et de façon préliminaire sur 2 tumeurs. Elles devront être validées sur un plus grand nombre de tumeurs.

#### Les particules diesel peuvent-elles activer les cellules de langerhans des voies aériennes ? étude sur un modèle *in vitro*

#### A. CHAMBELLAN

(travail réalisé sous la direction de P. SOLER) Unités INSERM 82 (Dr A. HANCE) et 408 (Pr M. AUBIER), Bichat

Introduction : la recrudescence des manifestations allergiques comme l'asthme ou les rhinites, observée ces dernières décades en milieu urbain, coïncide avec une hausse du trafic automobile, notamment diesel. Ces moteurs génèrent de fines particules qui une fois inhalées peuvent générer une réponse de type IgE-dépendante au niveau de la muqueuse des voies aériennes. Les cellules de Langerhans (CL), principales cellules présentatrices d'antigène intercalées entre les cellules de l'épithélium respiratoire, soulèvent un vif intérêt quant à leur rôle dans les réponses immuno-allergiques. Dans ce travail, les effets des particules diesel (PD) sur les CL ont été étudiés sur un modèle de culture *in vitro*.

Matériels et méthodes : les CL étaient issues de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ provenant de sang de cordon ombilical et maintenus en culture en présence de GM-CSF et de TNF $\alpha$ . Les cellules étaient exposées aux PD au 6<sup>e</sup> jour et analysées au 8<sup>e</sup> jour de culture. Cette analyse comprenait l'étude du devenir des PD par microscopie électronique, et de leur cytotoxicité appréciée par l'exclusion du bleu trypan ainsi que la mesure du taux de LDH relarguée dans le surnageant cellulaire. L'activation des CL était évaluée par l'étude de l'expression de différents marqueurs membranaires d'activation (HLA-DR, B7-1, B7-2, CD83, CD54) par immuno-cytochimie et cytométrie de flux.

*Résultats* : les PD sont internalisées par les CL dans de larges vacuoles cytoplasmiques, sans altérer la viabilité cellulaire. Dans tous les cas, l'évolution des différents marqueurs d'activation présents à la surface des CL n'est pas modifiée par rapport aux cultures contrôles.

Discussion : les CL issues d'un modèle de culture in vitro ne sont pas altérées ni activées de façon significative après exposition aux PD à des doses supra-physiologiques. Un contact direct des PD avec les CL est donc insuffisant pour rendre compte des effets immuno-allergiques observés in vivo. L'épithélium respiratoire pourrait jouer un rôle prépondérant dans ces réactions. A ce propos, des résultats récents obtenus au sein de l'unité démontrent que des lignées de cellules épithéliales bronchiques et/ou alvéolaires exposées aux PD sécrètent d'avantage de GM-CSF et d'IL1b, deux cytokines agissant en synergie sur la maturation des CL.

*Conclusion* : les PD ne sont pas suffisantes pour entraîner directement une activation des CL *in vitro*. Des études complémentaires portant sur les interactions entre CL et cellules épithéliales sont nécessaires pour préciser le mécanisme des réponses immuno-allergiques après exposition aux PD.

#### Contusions pulmonaires : toxicité de l'hémoglobine sur l'épithélium alvéolaire

#### C. CERF

(travail réalisé sous la direction de A. HARF et M.P. d'ORTHO). Unité INSERM 492 (Directeur S. ADNOT), Créteil

*A Introduction* : la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire après un traumatisme pulmonaire reste

POSTER À CONSULTER SUR LA THÈSE PAPIER

# C. Particules diesels et allergie: mécanismes cellulaires

<u>Chambellan A</u>, Crestani B, Soler P, Moreau J, Aubier M. Diesel Particles and Allergy : cellular mechanisms. Allerg Immunol 2000; 32: 43-8. Review

# DIESEL PARTICLES AND ALLERGY CELLULAR MECHANISMS

# Particules diesels et allergie : Mécanismes cellulaires

# A. Chambellan (1), B. Crestani (1), P. Soler (1), J. Moreau (1), M. Aubier (1)

# Summary

Urbain air pollutants, particularly diesel exhaust particles are now known to contribute to the increased prevalence of asthma and allergic rhinitis. Diesel exhaust particles act as adjuvants in the immune response and may lead to the enhancement of allergic inflammation. This was first suggested by epidemiological studies and now largely confirmed by numerous experimental studies in animals and humans. We review the different mechanisms involved, including effects on cytokine and chemokine production, as well as activation of different immune cells. We also discuss the metabolic and cellular activation pathways used by polycyclic aromatic hydrocarbons, allergens and their interaction with diesel particles which act in synergy in this immune response toward IgE production and induction of allergic inflammation.

**Key-words :** Diesel exhaust particles - Polycyclic aromatic hydrocarbons - Allergic - Inflammation - Airways.

# INTRODUCTION

n assiste depuis plusieurs décennies à une recrudescence des maladies allergiques, notamment les dermatites atopiques, les rhinites allergiques et l'asthme. L'influence de facteurs environnementaux naturels et anthropiques a été évoquée et de nombreux travaux épidémiologiques ont été depuis réalisés. Le rôle de la pollution atmosphérique a été ainsi précisé. L'intérêt est actuellement porté sur les relations existant entre les particules urbaines et la

# Résumé

La pollution atmosphérique urbaine, en particulier les particules diesels, contribuent à augmenter les manifestations allergiques des voies aériennes notamment la rhinite et l'asthme. Les particules diesels agissent en tant qu'agent adjuvant de la réponse immunitaire et conduisent au déve-loppement d'une réaction inflammatoire IgE-dépendante. Ce fait a été initialement suggéré par des études épidémiologiques et actuellement largement confirmé par de nombreuses études expérimentales menées chez l'animal et chez l'homme. Nous décrivons ci-après les différents mécanismes impliqués, incluant les effets des particules diesels sur la synthèse et la production de diverses cytokines et chémokines, ainsi que sur différents types cellulaires de la muqueuse des voies aériennes - cellules épi-théliale et immunitaire. Nous discutons ensuite des mécanismes d'interaction, de synergie d'action et d'activation existant entre particules, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pneumallergènes et muqueuse des voies aériennes dans cette réponse immuno-allergique médiée par les IgE.

**Mots-clés :** Particules diesels - Hydrocarbures aromatiques polycycliques - Allergie - Inflammation - Voies aériennes - Pollution atmosphérique.

recrudescence des symptômes respiratoires. Ces particules sont générées en grande partie par la circulation automobile, notamment les véhicules diesels. Les particules générées par ces moteurs à combustion incomplète ont un diamètre de l'ordre du micron ce qui leur permet d'atteindre les voies aériennes inférieures jusau'au compartiment alvéolaire où elles peuvent séjourner pendant plusieurs mois. De nombreuses études expérimentales ont caractérisé les effets biologiques des particules diesels (PD). Il faut se garder d'extrapoler les résultats de ces expériences à l'exposition humaine en milieu urbain dans la mesure où les conditions expérimentales ne reflètent que très approximativement la réalité. Elles apportent cependant des éléments de réflexion indispensables à la compréhension des mécanismes pouvant rendre compte des données

<sup>(1)</sup> Unité INSERM 408 - CHU Bichat, Claude Bernard - 46, rue Henri-Huchard - 75877 Paris Cedex 18.

épidémiologiques. Nous nous intéresserons exclusivement aux données concernant la réponse immunoallergique à l'exposition aux PD.

# LES PARTICULES DIESELS : ORIGINE ET COMPOSITION

Les PD représentent environ 40% de la pollution particulaire urbaine. Elles sont issues des moteurs de type diesel, dont le régime diffusionnel à combustion incomplète génère des suies sous forme de microsphères de carbone agrégées les unes aux autres avec un diamètre aérodynamique moyen de 100 nm. La grande surface d'exposition qu'elles présentent permet à de nombreuses molécules issues de la combustion incomplète d'y être adsorbées, au premier rang desquelles on trouve les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) des sulfates et des métaux lourds (schéma 1).



Schéma 1 : Schéma des particules diesels.

Leur petite taille ainsi que leur caractère hydrophobe leur permet d'atteindre facilement le compartiment alvéolaire des poumons où elles peuvent séjourner pendant plusieurs mois.

L'effet immuno-adjuvant des PD au niveau des voies aériennes est actuellement démontré tant chez l'animal que chez l'homme.

# EFFETS ATTRIBUABLES AUX DIFFÉRENTS CONSTITUANTS DES PD-INTERACTIONS PD-ALLERGÈNES

# **EFFET DES PARTICULES DE CARBONE**

Le noyau carboné en lui-même est capable d'entraîner une réponse IgE-dépendante, mais la nature des différents composés adsorbés à sa surface (notamment les HAP) est également déterminante en modulant l'intensité de la réponse. Après exposition intranasale de souris à différents types de particules inhalables de même diamètre, notamment des microsphères de carbone et des PD, la réponse IgE-spécifique après sensibilisation au pollen de cèdres ou à l'ovalbumine est significativement plus élevée avec les PD, les microsphères de carbone, qu'après allergène seul (1, 2). Toutefois la sécrétion par les cellules épithéliales bronchiques de cytokines tels que le GM-CSF et l'IL8 est significativement plus élevée en présence de PD qu'en présence de particules de carbone de même diamètre (3).

# EFFETS DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

L'exposition de différents types cellulaires à des HAP stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Que ce soit sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques, on

observe une sécrétion significativement augmentée de GM-CSF, d'IL8 et d'ICAM-1 soluble après exposition à des HAP extraits de PD (5). L'intensité de la réponse semble indiquer que les HAP sont les principaux composés responsables de l'effet immuno-adjuvant des PD (5).

Sur un modèle de culture primaire de cellules épithéliales nasales et d'éosinophiles humains, il a été montré que l'exposition à des HAP augmentait la dégranulation des éosinophiles ainsi que leur adhérence à l'épithélium (6). Avec le même type de modèle, on observe une augmentation d'expression de l'ARNm du récepteur de

l'histamine (H1R) après exposition à des HAP (7).

Les HAP potentialisent la réponse lgE-systémique aux allergènes inhalés. L'instillation intranasale de pyrène, d'anthracène, de fluoranthène et de benzo(a)pyrène chez la souris immunisée avec l'antigène JCPA (Pollen de cèdre du Japon) entraîne une augmentation significative des concentrations d'IgE-anti JCPA comparée à l'allergène seul (8). In vitro, on observe une augmentation de production d'IgE par des lymphocytes B humains exposés à des HAP. L'augmentation est maximale en présence d'IL4 et du ligand du récepteur CD40 par rapport aux cultures contrôles (9). De même, l'exposition de cellules mononucléées sanguines humaines à des HAP induit une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des chémokines IL8 et RANTES qui sont chimio-attractantes pour les polynucléaires neutrophiles et les éosinophiles (10). On dispose de quelques travaux sur la population monocytes-macrophages alvéolaires.

L'exposition de macrophages alvéolaires de rat aux PD entraîne une augmentation de sécrétion d'IL1, mais pas du TNF $\alpha$  (11). Ces effets sont médiés en partie par les quinones issues du métabolisme des HAP. Sur une lignée de macrophage humain (THP-1), on observe une augmentation d'expression de l'ARNm, mais pas de la sécrétion, de l'IL10 après stimulation par une quinone ; ce résultat n'est cependant pas retrouvé sur d'autres lignées (RAW 264.7) (12). L'expression membranaire de certaines molécules d'activation a été recherchée sur un modèle de macrophages péritonéaux de rat exposés à des HAP. On observe une augmentation d'expression de molécules de classe II du CMH ainsi que du CD80 (B7-1), étapes essentielles à l'obtention d'une stimulation lymphocytaire T efficace (13). Plus récemment, il a été montré que l'exposition de monocytes sanguins humains à des HAP augmente leur synthèse et la sécrétion d'IL8 et de RANTES, chémokines centrales dans l'afflux de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (10).

Ces résultats indiquent que les HAP stimulent la réponse IgE en agissant aux différentes étapes de la réponse immuno-allergique : cellule épithéliale, cellule présentatrice d'antigène, lymphocyte B et éosinophile.

# INTERACTIONS PD ET PNEUMALLERGÈNES

Les allergènes en suspension dans l'air ont pour la plupart un diamètre supérieur à 10 mm et ne peuvent atteindre le compartiment inférieur des voies aériennes. Cependant certains pollens contiennent des centaines de petits granules porteurs de motifs antigéniques divers qui sont libérés lors de l'éclatement des petits sacs de pollen, au décours d'une averse par exemple (14).

Des travaux ont montré qu'il existe des interactions entre PD et pneumallergènes. On trouve d'une part de nombreux allergènes adsorbés à la surface des PD, dont celui du chat (Fel d1) et ceux de pollen de graminées (15, 16). Les PD permettent à ces allergènes d'atteindre en plus grande quantité les territoires aériens les plus distaux et d'augmenter l'inoculum d'allergènes au contact de la muqueuse respiratoire. D'autre part, les interactions entre PD et allergènes entraînent une modification de conformation et du nombre de motifs antigéniques présentés par l'allergène, ce qui contribue à en augmenter l'immunogénicité (17).

# MÉCANISMES DE LA RÉPONSE IMMUNO-ALLERGIQUE

Les premières approches expérimentales ont été menées *in vivo* chez l'animal. L'injection intra-périto-

néale d'ovalbumine (OA) et de 10 mg de PD chez la souris BALB/c entraînait une réponse sérique IgE-spécifique qui était maximale en présence des deux composés (18). L'hypothèse selon laquelle les PD pourraient jouer un rôle immuno-adjuvant dans la réaction immuno-allergique était avancée.

### EFFETS DES PD SUR L'ÉPITHÉLIUM DES VOIES AÉRIENNES

Les cellules épithéliales humaines nasales et respiratoires sont capables d'endocyter les PD, de les véhiculer dans des vacuoles cytoplasmiques et de les relarguer à leur pôle basal (figure 1). On n'observe pas d'effet cytotoxique direct même pour des doses élevées de PD (3). Toutefois une altération des battements ciliaires et du système de jonctions intercellulaires, notamment les gap-junction, est notée (4, 19). Ces altérations pourraient faciliter la pénétration des allergènes au sein de la muqueuse des voies aériennes.



Figure 1 : Internalisation des PD (r) par des cellules épithéliales bronchiques, au sein de vacuoles intracytoplasmiques (v) ; pôle apical (a), pôle basal (b), mitochondrie (m) - Microscopie électronique (d'après 3, avec permission).

En utilisant des lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines puis des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, le rôle central de l'épithélium dans la genèse de la réponse immunoallergique a été précisé. On observe une augmentation de synthèse (via NF-KB) et de sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL8 et le GM-CSF en réponse aux PD, ainsi qu'une augmentation de l'ICAM-1 soluble (20, 4). La polarité de l'épithélium est importante, il a été ainsi montré, sur un modèle en double chambre de cellules épithéliales bronchiques (lignée BEAS-2B), que la sécrétion d'IL8 n'était obtenue que lors de l'exposition du pôle apical des cellules épithéliales aux PD (5).

Cependant il est important de préciser que la composition des PD a nettement évolué ces dernières années. En effet, les progrès technologiques réalisés sur la motorisation diesel, la qualité des gazoles ainsi que les procédés de catalyse et de filtres à particules mis au point ont considérablement diminué la quantité de rejets particulaires et d'HAP adsorbés à leur surface (tableau 1). Les véhicules diesels "nouvelle génération" émettent dix fois moins de PD, ce qui les ramène à un niveau comparable en terme d'émissions particulaires aux véhicules à essence. De récentes études indiquent ainsi que la réponse inflammatoire des voies aériennes générée par ces nouvelles PD est notablement plus faible qu'avec les PD de première génération (figure 2) (3).

	Non catalysé	Catalysé
Pyrène	59,8	33,6
Benzo(e)pyrène	19,2	12,6
Benzo(a)pyrène	9,7	3,9
Benzo(b)fluoranthène	13,3	5 <i>,</i> 0
Nitroanthracène	15,6	2,1
Nitropyrène	10,6	3,4

Tableau 1 : Effet de la catalyse sur les principaux HAP (mg/g) (3).



Figure 2 : Production de Granulocyte-Monocyte Colony Stimulation Factor (GM-CSF) par les cellules épithéliales bronchiques exposées à des PD issues de véhicules avec ou sans catalyse (3).

### INITIATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE : RÔLE DES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNE

Les cellules de la lignée dendritique présentent un intérêt actuel grandissant car elles sont les plus puissantes cellules présentatrices d'antigène connues, plus puissantes que les monocytes sanguins et surtout plus puissantes que les macrophages alvéolaires. Ces cellules infiltrent tous les épithéliums en contact avec l'extérieur, y compris l'épithélium respiratoire. En position intra-épithéliale, elles prennent le nom de cellules de Langerhans et sont idéalement placées pour jouer un rôle de sentinelles. Elles entretiennent des interactions privilégiées et nombreuses avec les cellules épithéliales à travers leurs longs prolongements cytoplasmigues (21). Leur recrutement au niveau épithélial et leur différenciation s'opèrent en partie sous l'action de cytokines, principalement le GM-CSF (22). Leur rôle dans la transmission de l'information est fondamental : une fois stimulées au niveau de l'épithélium, elles vont migrer vers les organes lymphoïdes régionaux pour présenter l'antigène aux lymphocytes T spécifiques. C'est au cours de cette migration qu'elles vont acquérir les profils phénotypique et fonctionnel nécessaires pour activer efficacement les lymphocytes T (23, 24). Leur rôle dans la physiopathologie des maladies immuno-allergiques comme l'asthme, les rhinites allergiques et les dermatites atopiques, semble de tout premier plan. Récemment, des travaux ont été initiés dans notre laboratoire sur un modèle de cellules dendritiques humaines développées in vitro. Les résultats préliminaires montrent qu'un contact direct avec les particules diesels n'est pas capable de déclencher l'activation de ces cellules. Les interactions avec les cellules épithéliales respiratoires devraient jouer un rôle prépondérant dans ces phénomènes et restent à préciser.

## INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE DE TYPE TH2

Chez la souris, l'instillation d'OA en présence de PD au niveau de la muqueuse nasale ou trachéale induit une prolifération lymphocytaire au niveau des ganglions médiastinaux ainsi qu'une synthèse d'IL4 et d'IgE spécifiques, de façon significativement plus importante que chez les souris exposées à l'allergène seul (25, 26). On observe une infiltration de polynucléaires éosinophiles et de lymphocytes significativement plus élevée au niveau de la muqueuse bronchique et dans les LBA des souris exposées à l'OA associée aux PD. Les taux d'IL2, d'IL4, d'IL5 et de GM-CSF au niveau des surnageants tissulaires et les taux d'IL5 dans le LBA sont significativement plus élevés, tandis que le taux d'IFN-γ demeure inchangé. Cette réponse locale s'accompagne d'une réponse systémique avec des taux d'IgE, IgG1 et IgG2a anti-OA plus élevés chez les souris exposées aux deux composés, par rapport aux souris exposées à l'OA ou aux PD seuls (27).

Il apparaît ainsi chez l'animal que l'exposition aux PD seules est une condition nécessaire, mais souvent non suffisante, pour entraîner une réponse IgE-dépendante. Par contre, la présence combinée de PD associée à un allergène entraîne d'une part localement une augmentation des cytokines de type Th2 rendant compte de l'infiltrat à prédominance éosinophile observé au niveau de la muqueuse respiratoire et d'autre part une réponse systémique IgE-spécifique.

Ces résultats ont été confirmés chez l'homme par une approche élégante. L'étude de lavages nasaux de volontaires sains exposés aux PD a ainsi montré que les concentrations des IgE totales, des IgG4 et des cellules sécrétant les IgE étaient significativement élevées (de manière dose-dépendante) après exposition aux PD (figure 3) (28). Chez des sujets présentant une hypersensibilité à l'ambroisie (*Amb a I*), exposés à l'antigène en présence de PD et en utilisant la même méthodologie, on observe une modification du profil des cytokines produites par les cellules issues des lavages nasaux :

- Augmentation des ARNm des cytokines de type TH2 (IL4, IL5, IL6, IL10, IL13).
- Baisse des ARNm des cytokines de type TH1 (IL2, IFN-γ) (figure 4) (29).

La synthèse d'IL4 était observée 4 heures après l'exposition, pour atteindre un maximum à 18 heures, contemporain de la détection d'une majorité de lymphocytes T de type TH2 dans le liquide de lavage nasal (30). L'afflux des différentes cellules composant l'infiltrat inflammatoire (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes) accompagne l'augmentation des concentrations locales de différentes chémokines CC comme RANTES, MCP-3 et MIP-1α (31).



Figure 3 : Analyse des cellules issues de lavages nasaux après exposition aux PD (28).



Figure 4 : Analyse des ARNm des cellules issues de lavages nasaux après exposition allergénique et PD (29).

Le mécanisme cellulaire de la synthèse des IgE à partir des lymphocytes B de la muqueuse nasale a été précisé ; il requiert :

- L'induction d'un transcrit primaire ε des loci des chaînes lourdes d'immunoglobulines qui sont sous la dépendance de l'IL4 ou de l'IL13.
- Un contact activateur des lymphocytes B par des interactions type CD40-CD40L ou CD58-CD2. La commutation de l'isotype μ à l'isotype ε n'est observée que lors de l'exposition combinée des PD et de l'allergène Amb a I (32).

Une approche "thérapeutique" a été étudiée en traitant des sujets exposés aux PD + Amb a I par la fluticasone pendant une semaine. La synthèse d'IgE et les ARNm des cytokines (IL2, IL4, IL5, IL6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) n'est pas inhibée au niveau de la muqueuse nasale à l'inverse d'une exposition à l'allergène seul (33).

Pour des raisons éthiques évidentes, on ne dispose que de peu d'études sur les effets des PD au niveau des voies aériennes inférieures chez l'homme. Dans un travail récent mené chez 15 sujets sains non tabagiques exposés à des PD, on observe dans le LBA une augmentation des PNN, des lymphocytes B, de l'histamine et de la fibronectine, avec sur les biopsies bronchiques une augmentation des PNN, des mastocytes, des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) qui surexpriment certaines molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1) (34).

### CONCLUSION

Ces différentes approches expérimentales ont apporté des éléments tangibles qui supportent la réalité d'une réponse immuno-allergique liée à l'inhalation des PD. Elles agissent comme agent immuno-adjuvant sur l'immunité des voies aériennes et systémique par différents



Schéma 2 : Schéma général de la réaction immuno-allergique initiée au niveau de la muqueuse bronchique par les PD.

mécanismes (schéma 2) : en modifiant et favorisant d'une part la pénétration des allergènes au sein de la muqueuse respiratoire, en initiant d'autre part, via notamment les HAP adsorbés à la surface des PD, une réponse immunitaire de type TH2 avec in fine production d'IgE.

#### **BIBLIOGRAPHIE**

1. K. Maejima, K. Tamura, Y. Taniguchi et col. - Comparison of the effects of various fine particles on IgE antibody production in mice inhaling Japanese cedar pollen allergens. J. Toxicol Environ Health, 1997 ; 52 . 231-248.

2. A. Nilsen, R. Hagemann, I. Eide. - The adjuvant activity of diesel exhaust particles and carbon black on systemic IgE production to ovalbumin in mice after intranasal instillation. Toxicology, 1997 ; 124:225-232.

3. S. Boland, A. Baeza-Squiban, T. Fournier et col. - Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. Am J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol, 1999; Ź76 : L604-L613.

4. H. BAYRAM, J.-L. DEVALIA, R. SAPSFORD et col. - The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. Am J. Respir Cell Mol Biol, 1999; 18: 441-448.

5. T. Ohtoshi, H. Takizawa, H. Okasaki et col. - Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to inflammation in vitro. J. Allergy Clin Immunol, 1998; 101: 778-785

6. N. Terada, K.-I. Maesako, K. Hiruma et col. - Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause

degranulation. Int Arch Allergy Immunol, 1997 ; 114 : 167-174. 7. N. Terada, N. Hamano, K.-I. Maesako et col. - Diesel exhaust particulates upregulate histamine receptor mRNA and increase histamine-induced IL8 and GM-CSF production in nasal epithelial cells

and endothelial cells. *Clin Exp Allergy*, 1999 ; 29 : 52-59. 8. T. Kanoh, T. Suzuki, M. Ishimori et col. - Adjuvant activities of pyrene, anthracene, fluoranthene and benzo-a-pyrene in production of anti-IgE antibody to Japanese cedar pollen allergen in mice. J.

Clin Lab Immunol, 1996; 48: 133-147.
H. Takenaka, K. Zhang, D. Diaz-Sanchez et col. - Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust : direct effects on B-cell IgE production. J Allergy Clin Immunol, 1995 ; 95 : 103-115.

10. O. Fahy, A. Tsicopoulos, H. Hammad et col. - Effects of diesel organic extracts on chemokine by peripheral blood mononuclear cells. J. Allergy Clin Immunol, 1999 ; 103 : 1115-1124.

11. H.-M. Yang, JYC Ma, V. Castranova et col. - Effects of diesel exhaust particles on the release of IL-1 and tumor necrosis factor-a from rat alveolar macrophages. *Exp Lung Res*, 1997 ; 23 : 269-284. 12. A.-E. Nel, D. Diaz-Sanchez, D. NG et col. - Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. J. Allergy Clin Immunol, 1998; 102: 539-554.

13. N.-I. Kerkvliet, J.-A. Oughton. - Acute inflammatory response to sheep red blood cell challenge in mice treated with tetrachlorodi-benzo-dioxin : phenotypic and functional analysis of peritoneal exudate cells. Toxicol Appl Pharmacol, 1993 ; 119 : 248-257.

14. C. Suphioglu. - Thunderstorm asthma due to grass pollen. Int Arch Allergy Immunol, 1998; 116: 252-260.

15. H. Ormstad, E. Namork, P. Gaarder et col. - Scanning electron microscopy of immunogold labeled cat allergens (Fed d 1) on the surface or airborne house dust particles. J. Immunol Meth, 1995; 187: 245-251.

16. C. Knox, P. Suphioglu, Taylor et col. - Asthma and air pollution :

two major grass pollen allergen blind to diesel exhaust. J. Allergy Clin Immunol, 1996 ; 97 : 378 (abstract). 17. H. Ormstad, B.-V. Johansen, P.-I. Gaarder. - Airborne house dust

particles and diesel exhaust particles as allergen carriers. Clin Exp

Allergy, 1998 ; 28 : 702-708. 18. M. Muranaka, S. Suzuki, K. Koizumi et col. - Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. J. Allergy Clin Immunol, 1986 ; 77 : 616-623. 19. G.-M. Alink, M. Sjogren, R.-P. Bos. - Effect of airborne particles

from selected indoor and outdoor environments on gap-junctional intercellular communication. *Toxicol Lett*, 1998; 96-97: 209-213.

20. H. Takizawa, T. Otoshi, S. Kawasaki et col. - Diesel exhaust particles induce NF-kB activation in human bronchial epithelial cells in vitro : importance in cytokine transcription. J. Immunol., 1999 ; 162 : 4705-4711.

21. M.-A. Schon-Hegrad, J. Oliver, P.-G. McMenamin et col. -Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (la)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. J. Exp. Med., 1991 ; 173 : 1345-1356.

22. A. Tazi, F. Bouchonnet, M. Grandsaigne et col. - Evidence that granuloctye macrophage-stimulating factor (GM-CSF) regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langherhans cells in human lung and lung cancer. J. Clin. Invest., 1993; 91: 566-576

23. R.-M. Steinman. - The dendritic cell system and its role in immu-

nogenicity. Annu Rev. Immunol., 1991 ; 9 : 271-296. 24. J.-L. Gong, K.-M. McCarthy, J. Telford et col. - Intraepithelial airway dendritic cells : a distinct subset of pulmonary dendritic cells obtained by microdissection. J. Exp. Med., 1992; 175: 797-807. 25. S. Takafuji, S. Suzuki, K. Koizumi et col. - Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. J. Allergy Clin Immunol, 1978 ; 79 : 639-645. 26. H. Fujimaki, O. Nohara, T. Ichinose et col. - IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. Toxicology, 1994; 92:

261-268. 27. H. Takano, T. Yoshikawa, T. Ichinose et col. - Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. Am J. Respir. Crit. Care Med., 1997; 156: 36-42. 28. D. Diaz-Sanchez, A.-R. Dotson, H. Takenaka et col. - Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. J. Clin. Invest., 1994; 94: 1417-1425

29. D. Diaz-Sanchez, A. Tsien, J. Fleming et al. - Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cyto-kine production to a T helper cell 2-type pattern. J. Immunol., 1997; 158:2406-2413.

30. M. Wang, A. Saxon, D. Diaz-Sanchez. - Early IL-4 production driving TH2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived. Clin. Immunol., 1999 ; 90 : 47-54.

31. D. Diaz-Sanchez, M. Jyrala, D. NG et col. - In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances production of the CC chemokines RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and MCP-3 in humans. Am. J. Respir.

Cell Mol. Biol., 1999. In press. 32. S. Fujieda, D. Diaz-Sanchez, A. Saxon. - Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J. Respir. Cell Mol. Bio.*, 1998; 19: 507-512. 33. D. Diaz-Sanchez, A. Tsien, J. Fleming et col. - Effect of fluticasone propionate on the mucosal allergic response induced by ragweed allergen and diesel exhaust particle challenge. Clin. Immunol., 1999 ; 90: 313-322.

34. S. Salvi, A. Blomberg, B. Rudell et col. - Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999 ; 159 : 702-709.



# D. Pollution atmosphérique et environnementale et pathologie respiratoire

<u>Chambellan A</u>, Crestani B, Aubier M. Pollution atmosphérique et environnementale et pathologie respiratoire. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), *AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine*, 6-0933, 2003, 6p

# POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE ET ENVIRONNEMENTALE ET PATHOLOGIE RESPIRATOIRE

A CHAMBELLAN, B CRESTANI, M AUBIER

a pollution atmosphérique représente un risque sanitaire essentiellement pour les sujet âgés, les patients atteints de bronchopneumopathies chroniques obstructives et d'asthme et les enfants. L'atmosphère intérieure est parfois très enrichie en certains polluants, comme le  $NO_2$  ou le  $SO_2$ . En France, 1000 décès prématurés par an environ sont imputables au trafic automobile.

© 2003 Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

*Mots-clés* : pollution atmosphérique, aérocontaminants, asthme, bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), ozone, dioxyde de soufre, dioxyde d'azote, pollution particulaire.

#### INTRODUCTION

La pollution atmosphérique est définie comme étant « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influer sur les changements climatiques ». Plusieurs aspects de cette définition proposée par la loi sur l'air de décembre 1996 (loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie [LAURE]) doivent être précisés :

les sources considérées sont générées par les activités humaines (encore appelées anthropiques), ce qui exclut les pollutions d'origine naturelle;

 elles sont multiples, aussi bien extérieures qu'intérieures (domicile, écoles, locaux professionnels);

les types de polluants existants sont très nombreux, variables dans le temps et l'espace, ce qui les rend difficiles à évaluer de manière fiable;

à l'inverse d'autres pollutions (aliments, sols, aquatiques) souvent transitoires et concernant un nombre limité de personnes, la pollution atmosphérique concerne de grandes populations et est pratiquement inévitable (la respiration est vitale);

■ si la notion d'intoxication reflète un degré d'exposition et d'effets sanitaires fort, la pollution atmosphérique entraîne des effets sanitaires de faible amplitude sans seuil en dessous duquel aucun effet n'est décelable ;

enfin, si la plupart des polluants se déposent près de leur site d'émission, d'autres, à la faveur de conditions météorologiques particulières, vont être véhiculés sur de grandes distances : on parle alors de pollution transfrontière, qui est régie par la convention de Genève<sup>16, 20]</sup>.

#### POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE URBAINE EXTÉRIEURE ET POLLUTION INTÉRIEURE

#### Sources et composition de l'atmosphère urbaine

L'atmosphère que nous respirons est un mélange de très nombreuses molécules sous différentes formes : gazeuse, liquide ou solide. Leur nature dépend essentiellement des sources d'émission présentes à un endroit donné et des transformations chimiques que ces composés vont subir au sein de l'atmosphère, qui se comporte comme une véritable usine chimique. Les polluants une fois émis vont être soumis à diverses influences météorologiques comme le vent (essentiel pour la dispersion), la pression atmosphérique (les conditions anticycloniques entraînent la stabilité des masses d'air et de ses polluants), la température (qui agit sur la volatilité de certains polluants et la transformation d'autres par réaction photochimique), et l'humidité sur la formation de composés acidoparticulaires. La grande complexité de ces phénomènes dynamiques de pollution a conduit à distinguer les polluants dits primaires, c'est-à-dire présents de façon inerte dans l'atmosphère tels qu'émis à leur source (plomb, dioxyde de soufre [SO<sub>2</sub>], monoxyde d'azote [NO], particules fines), des polluants secondaires, issus de la transformation de polluants primaires, soit par photo-oxydation (ozone [O3], dioxyde d'azote [NO2]), soit sous l'action de l'humidité (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à partir du SO2, HNO3 à partir des oxydes d'azote [NOX]) (tableau I).

De nombreux autres composés sont présents dans l'atmosphère, d'origine végétale, organique et minérale. Nous nous limitons ici à l'étude des principaux polluants anthropiques pour lesquels des effets sanitaires au niveau des voies aériennes sont documentés. De grands progrès ont été réalisés depuis les années 1950 (épisodes de *smog* londoniens) en ce qui concerne la pollution soufrée et particulaire liée aux foyers fixes de combustion (industries, incinération, chauffage). Cette évolution globalement favorable résulte d'importants efforts de dépollution des émetteurs industriels et du choix français de l'énergie nucléaire (75 % de son électricité) aux dépens des combustibles fossiles. Les sources de polluants urbains se sont ainsi considérablement modifiées et sont actuellement dominées par l'importance du trafic routier.

L'accroissement général du trafic automobile a été multiplié par deux ces 20 dernières années (83 % véhicules particuliers, 17 % véhicules utilitaires), avec une forte hausse des véhicules à moteur diesel qui se stabilise actuellement entre 30 et 40 % du parc automobile français. La combustion des carburants est responsable en grande partie de la hausse des émissions de NOx (NO et NO<sub>2</sub>), de CO, CO<sub>2</sub>, COV (composés organiques volatils) et rejets particulaires. En milieu urbain, on évalue à environ 40 % la contribution de particules issues des moteurs diesels (particules diesels [PD]) dans la pollution particulaire totale.

Ces particules d'environ 100 nm de diamètre sont constituées de microsphères de carbone accolées entre elles formant des agrégats. Leur petite taille leur permet d'atteindre le compartiment alvéolaire des poumons, et la grande surface d'exposition qu'elles présentent permet à de nombreuses autres molécules d'y être adsorbées (notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques [HAP]). Ces caractéristiques rendent compte des effets biologiques observés (*fig 1*) <sup>[21]</sup>. Des systèmes de dépollution ont été développés (pots catalytiques pour véhicules à essences et diesels), en parallèle des progrès réalisés sur les carburants (diminution du taux de plomb et de soufre). Cependant,

Tableau I. – Princip	aux polluants (données CITEPA 2002).		
and a state of the	Source	Commentaires	Situation en 2000/1990
SO <sub>2</sub>	Combustibles soufrés (charbon, fuel, gazole) Centrales thermiques 21 % Raffinage 20 %, chimie 10% Résidentiel 6 %, agroalimentaire 5,3 %	++ Hiver (chauffage)	- 51 %
NOx (NO - NO <sub>2</sub> )	Combustibles fossiles, engrais. Incinérateurs Trafic routier 52 % Agriculture 14 % Production d'électricité 6,5 %	++ Hiver pour le NO amélioration par le pot catalytique	- 25 %
НАР <sup>ь</sup>	Combustion biomasse (bois) R/T <sup>a</sup> 45 % Trafic routier 24 % (+ diesel) Industrie 20 % Agriculture 9 %	cancérigènes pour certains (benzo-a-pyrène)	- 3 %
COV <sup>c</sup>	Solvants, peintures, adhésifs, imprimerie, raffinage Trafic routier 23 % Industrie 26 % Agriculture 23 % R/T 18 %	amélioration par pot catalytique et progrès dans stockage/utilisation des hydrocarbures	- 26 %
CO et CO <sub>2</sub>	Combustion incomplète, incinération, aciéries, extraction minerai Trafic routier 39 %-26 % (CO-CO <sub>2</sub> ) Industrie 19 %-22 % R/T (chauffage) 25 %-24 %	diminution des forêts utilisation de l'énergie fossile	- 39 % CO - 1 %-CO <sub>2</sub>
Ozone - O <sub>3</sub> (troposphérique)	CO >> NOx - COV Trafic routier 60 %	++ Été/UV	+ 2 % par an
Particules	Combustion industrielle et domestique, incinération Transport routier 40 % (+ diesel)	++ Hiver	Stagnation/1990

a : résidentiel et tertiaire.

b: hydrocarbures aromatiques polycycliques.
 c: composés organiques volatils (hydrocarbures, méthane non compris)



l'accroissement continu du trafic ainsi que le renouvellement lent du parc automobile (plus de 10 ans) rend ces différentes mesures peu efficaces dans l'immédiat.

#### Sources et composition de l'atmosphère intérieure

La prise de conscience de la qualité de l'air à l'intérieur des locaux est plus récente. L'intérêt porté à l'environnement de l'asthmatique, aux effets du tabagisme passif et aux risques liés à l'exposition à des aérocontaminants plus ou moins toxiques dans les locaux professionnels a contribué au développement des connaissances dans ce domaine. Nous passons plus de temps à l'intérieur des locaux (environ 80 % de la journée), notamment les enfants en bas âge et les personnes âgées ou malades.

La composition de l'air de nos locaux est très variable dans le temps et fonction de l'habitat. Elle contient déjà les polluants extérieurs (pour l'O<sub>3</sub>, environ 50 % de la concentration extérieure), auxquels viennent s'ajouter d'autres polluants ; la concentration de certains d'entre eux y est parfois nettement plus élevée qu'à l'extérieur (NO<sub>2</sub> si gazinières et chauffage au bois, SO<sub>2</sub> si chauffage au charbon).

La multitude des sources de polluants, le manque d'aération des locaux, l'humidité et la température élevée sont autant de facteurs délétères à la qualité de l'atmosphère intérieure. Les sources de NOx, CO et CO<sub>2</sub> sont essentiellement le chauffage, les cuisinières à gaz et la fumée de tabac. Le SO<sub>2</sub> qui provient du chauffage au charbon ou au kérosène est en décroissance notable. Les COV sont nombreux (plus d'une cinquantaine communément retrouvés), ils proviennent des matériaux de construction (isolants en mousse urée-formol), des produits d'entretien (peintures, vernis, solvants), des produits d'hygiène (laques, déodorants), des meubles en panneaux de particules et de la fumée de tabac. Ils peuvent atteindre des concentrations dix fois supérieures à celles de l'extérieur. La pollution biologique est essentiellement allergénique (acariens, blattes, animaux domestiques, moisissures). Enfin, le radon est un gaz naturel radioactif que l'on rencontre dans les parties basses des locaux de certaines régions granitiques (Bretagne, Massif Central, Vosges, Corse).

#### ÉVALUATION ET SURVEILLANCE DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE

Dès 1956, on dispose en France d'un réseau de surveillance de la qualité de l'air. Le véritable lancement des réseaux de mesure date de 1958 avec la création de l'Association pour la prévention de la pollution atmosphérique (APPA - www.appa.asso.fr).

La politique de la pollution atmosphérique est définie en amont (ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement), les protocoles et outils de surveillance sont coordonnés par d'autres organismes (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie [ADEME - www.ademe.fr]; Laboratoire central de surveillance de la qualité de l'air). Au niveau régional, les associations de gestion de réseaux, impulsés par l'État depuis 1974 jouent un rôle important dans l'application des différentes mesures ; ce réseau national de surveillance et d'information sur la qualité de l'air, ou réseau ATMO, comprend actuellement 36 associations.

Les stations de mesure sont de plusieurs types : fixes, mobiles en véhicule, voire individuelles. Les principaux polluants mesurés sont les composants les plus représentatifs ou les plus nocifs en termes sanitaires : le  $SO_2$ , le  $NO_2$ , l' $O_3$ , le CO, le benzène (COV) et les particules fines en suspension. Pour ce dernier type de polluant, très hétérogène dans ses

	Objectif	Seuil d'information	Seuil d'alerte
NO <sub>2</sub>	50 μg/m <sup>3</sup> /h	200 µg/m³ horaire > 50 % du temps	400 μg/m <sup>3</sup> horaire
SO <sub>2</sub>	100-150 μg/m³/j	300 μg/m³ horaire	600 μg/m³ horaire
03	110 µg/m³/8 h	180 $\mu$ g/m <sup>3</sup> horaire	360 μg/m³ horaire
Particules fines	100-150 µg/m³/j		
CO	10 mg/m <sup>3</sup> /8 h		
Benzène	2 μg/m³/an		



2 Indice ATMO ; données annuelles pour 2001 en Île-de-France (AIRPARIF).

Tableau III. – Recommandations en cas de dépassement des seuils d'information et d'alerte (CS-HPF, réglementation du 18 avril 2000).

	Activités	Niveau d'information	Niveau d'alerte
Enfants < 6 ans	Déplacements habituels	-	Éviter promenades
	Récréation	Activités calmes pour enfants sensibles	Éviter activités à l'exté- rieur
Enfants entre 6 et 15 ans	Déplacements habituels	-	-
	Récréation	· · ·	Éviter activités à l'exté- rieur
	Sport	Non intense, avec abstention de compétition si sensibles	Éviter activités à l'exté- rieur Exercices moyennement intenses en intérieur Reporter compétition
Adolescents et adultes	Déplacements	-	-
	Sport	Non intense, avec abstention de compétition si sensible	Éviter activités à l'exté- rieur Exercices moyennement intenses en intérieur Reporter compétition

sources et sa composition, seule la fraction inhalable est évaluée indirectement par des appareils relevant les particules de diamètre inférieur à 10 µm (PM10), voire 2,5 µm (PM2,5). On a longtemps utilisé en France la mesure dite des fumées noires (FN, encore appelée *Black* ou *British Smoke* [BS]), plus pratique et moins onéreuse.

Les valeurs de référence actuelles à ne pas dépasser sont modifiées et revues à la baisse, notamment par directives européennes (*tableau II*).

Une information quotidienne est disponible dans chaque agglomération disposant d'un réseau de surveillance de la qualité de l'air, qui diffuse l'indice ATMO, défini à partir des indices de pollution habituels (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, particules fines). Il tient compte du polluant le plus élevé du jour et s'exprime sous forme d'échelle de 1 (très bon) à 10 (très mauvais) (www.ademe.fr/jola/indatmo.htm) (fig 2).

À partir de ces indices, une procédure d'information et d'alerte de la population est appliquée. Le niveau d'information de la population correspond à un niveau de concentration d'un des trois polluants au-delà duquel une exposition de courte durée a des effets limités et transitoires sur la santé des catégories de la population particulièrement sensibles (enfants, personnes âgées, asthmatiques et insuffisants respiratoires chroniques). Le niveau d'alerte correspond au seuil de polluant au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé ou l'environnement ; il comprend en plus des recommandations précédentes, des mesures de restriction ou de suspension des activités polluantes, y compris la circulation automobile. Pour exemple, le niveau d'information est atteint en moyenne 1 semaine par an pour les NOx et l'O<sub>3</sub>, tandis que le niveau d'alerte n'a pas été atteint depuis au moins 3 ans en Île-de-France.

Le Conseil supérieur d'hygiène publique de France a publié des recommandations relatives aux conduites à tenir lors d'épisodes de pollution atmosphérique (*tableau III*).

#### EFFETS SANITAIRES DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE

#### Évaluation des risques et limites méthodologiques

Les voies aériennes supérieures et inférieures sont constamment exposées aux divers polluants de l'atmosphère. Les effets que l'on observe sont liés à la fois à la pollution de fond, quotidienne, à laquelle s'ajoutent les effets plus notables des pics de pollution. On distingue ainsi les effets se manifestant quelques heures ou jours après l'exposition (effets à court terme) des effets observés lors d'exposition chronique (effets à long terme).

Si l'ensemble de la population exposée à la pollution atmosphérique ne ressent que des symptômes mineurs d'inconfort (toux, conjonctivite, rhinite, céphalées), des effets plus sévères s'observent concernant les populations sensibles (enfants, personnes âgées, personnes atteintes d'affections respiratolres et/ou cardlaques). Les indices sanitaires les plus représentatifs sont la mortalité, l'augmentation d'incidence ou d'exacerbation d'asthme, de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou d'insuffisance respiratoire, le recours aux soins, le risque cancérigène de certains polluants, de sévérité inférieure, divers symptômes comme rhinite <sup>[6, 7, 20]</sup>.

Ces données sanitaires sont ensuite analysées en parallèle avec les données des indices de pollution dans l'approche épidémiologique. Chaque augmentation d'un polluant se voit attribuer un risque relatif (RR) d'effets sanitaires observés. Les études épidémiologiques sont de plusieurs types : transversales (comparaison de deux populations dans deux zones de pollution différente à moyen ou long terme), de cohorte (suivi d'une population sur un moyen ou long terme), de panel (suivi d'une sous-population bien définie, asthmatiques par exemple, sur un court terme) et écologiques (étude d'une population soumise à un pic de pollution à court terme)<sup>[13]</sup>.

L'approche expérimentale est un complément indispensable pour tenter d'établir des liens de causalité entre un polluant et un effet sanitaire observé. Elle tente de préciser les mécanismes physiopathologiques qui rendent compte des observations épidémiologiques, par des études in vivo d'exposition d'animaux ou de sujets sains à un polluant donné, et in vitro sur des modèles de cultures cellulaires primaires ou de lignées. Elle permet de préciser certains effets spécifiques d'un polluant par rapport à un autre.

Tableau IV. – Mortalité respir	Lieu	RR	Polluant, par augmentation de
Dockery 94 <sup>[10]</sup>	Méta-analyse États-Unis	1,034	10 µg/m <sup>3</sup> PM10
APHEA <sup>[16]</sup>	12 villes européennes	1,05 1,04	50 $\mu g/m^3$ de SO <sub>2</sub> 50 $\mu g/m^3$ de BS
Institut de veille sanitaire <sup>[16]</sup>	9 villes françaises 90-95	1,005 1,008	10 μg/m <sup>3</sup> FN 10 μg/m <sup>3</sup> SO <sub>2</sub>
Samet 2000 [25]	20 villes américaines 87-94	1,0068	10 µg/m <sup>3</sup> РМ10

BS : black smoke.

Ces études comportent toutefois des limites :

■ l'approche épidémiologique est rendue délicate par les nombreux facteurs confondants existants (tabagisme, interactions entre les différents polluants, conditions météorologiques, période d'endémie virale ou pollinique, subjectivité de certaines données sanitaires) ; les liens statistiques identifiés sont le plus souvent faibles (RR < 2), ce qui n'exclut pas la réalité d'un biais ; le rapport de causalité du polluant sur l'indice sanitaire est difficile à prouver car les conditions nécessaires sont rarement réunies (l'exposition doit précéder l'effet, avec un gradient dose-effet, un RR élevé, les études épidémiologiques et expérimentales doivent être cohérentes, les facteurs confondants contrôlés, et la cause si possible spécifique...);

l'approche expérimentale quant à elle ne reflète pas les conditions réelles d'exposition, et il faut être prudent lors de l'extrapolation à l'homme de résultats obtenus à partir de modèles simplifiés in vitro ou animaux <sup>[4, 8]</sup>.

#### Mortalité

Les résultats de nombreuses études épidémiologiques sont concordants sur le niveau du risque sanitaire en fonction des pics de pollution atmosphérique. Les données en fonction de chaque polluant sont en revanche encore discutées, car le type de modélisation utilisé pour l'analyse des données brutes peut changer de manière significative les résultats. À titre d'exemple, l'étude menée à Philadelphie par Dockery et Schwartz avait montré une surmortalité en relation avec les particules fines et le SO<sub>2</sub>; sa réanalyse, en prenant en compte de nouvelles données, n'efface pas le degré de surmortalité observé, mais elle ne permet pas de l'attribuer aux particules fines, l'O3 était en revanche associée à la surmortalité en été et le SO2 pour les trois autres saisons [12, 18].

#### Court terme

Si le niveau de pollution atmosphérique, notamment acidoparticulaire, a considérablement

diminué depuis les années 1930-1950, où il a été responsable d'une surmortalité de plusieurs milliers de personnes, il semble qu'à plus faible niveau le risque, bien que nettement inférieur, persiste. Il est évalué dans l'étude APHEA (Air Pollution and Health, a European Approach) regroupant 15 villes européennes (plus de 25 millions d'habitants) à 5 % de surmortalité respiratoire pour une augmentation de 50  $\mu$ g/m<sup>3</sup> des niveaux journaliers de pollution essentiellement SO<sub>2</sub>, particules fines et O<sub>3</sub> (surtout l'été) [16]. Le risque de surmortalité subsiste alors même que les normes en vigueur sont le plus souvent respectées, ce qui pousse les autorités compétentes à revoir à la baisse les seuils actuellement proposés. On estime ainsi en France à environ 1000 le nombre de décès prématurés par an imputable au trafic automobile<sup>[24]</sup>. Des résultats analogues sont retrouvés dans les études américaines [10, 27] (tableau IV).

#### Long terme

On dispose de plusieurs études récentes mettant en évidence une augmentation de la mortalité liée à une exposition chronique à certains polluants atmosphériques, et ce à de relativement faibles concentrations. Il est toutefois plus difficile d'affirmer une liaison de causalité étant donné le biais important que représente l'exposition concomitante au tabac. Cependant, les diverses études de cohortes disponibles sont concordantes pour les particules et les sulfates.

Le RR de décès par cancer bronchique a été récemment précisé dans trois études <sup>[3, 11, 22]</sup> : pour les sulfates et/ou SO<sub>2</sub>, il est de 1,36 (1,11-1,66) (villes polluées versus non polluées), de 1,99 et 3,01 chez les hommes et les femmes adventistes respectivement pour un accroissement de 10  $\mu$ g/m<sup>3</sup> des moyennes annuelles. Pour les PM10, le RR, lors du passage d'une tranche d'exposition (43 jours/an) à la suivante, à une concentration > 100  $\mu$ g/m<sup>3</sup> est de 2,38 (1,42-3,97) chez les hommes adventistes (*tableau V*).

#### Morbidité

Plusieurs types d'approches permettent de préciser les effets respiratoires de la pollution atmosphérique. Le recueil des symptômes suivant un pic de pollution (court terme) ou à long terme repose le plus souvent sur des questionnaires remplis par chaque personne interrogée (les données sont subjectives avec un biais d'évaluation possible ; il s'agit le plus souvent d'études écologiques) dans le cadre d'études de cohortes, l'évaluation est médicale, plus objective et rigoureuse. Ces données sont dans ce cas souvent associées à une étude spirométrique et à des tests allergologiques. Ces études apportent des informations en termes de population générale, ou de plusieurs sous-groupes à risque (enfants, personnes âgées, asthmatiques, insuffisants respiratoires). Les indices sanitaires sont exprimés en risque relatif ou prévalence (nombre de cas à un instant donné). Il est beaucoup plus difficile d'obtenir des données sur l'incidence (nombre de nouveaux cas), qui n'est souvent approchée que dans les études à long terme [20].

#### **Court terme**

Les études épidémiologiques des 10 dernières années ont montré que pour des niveaux de polluants relativement faibles (souvent inférieurs aux normes en vigueur) et incomparables à ceux des années 1950, on observe des effets sanitaires. Il s'agit le plus souvent de signes en rapport avec l'exacerbation d'une pathologie respiratoire préexistante. Les polluants incriminés sont essentiellement les particules et le SO<sub>2</sub>. Les résultats obtenus avec l'indicateur des NOx sont assez contradictoires et ne peuvent être attribués au NO2 seul; il est davantage le reflet d'un ensemble de polluants d'origine automobile et de la « chimie » atmosphérique qui lui est associée. La récente méta-analyse européenne APHEA montre que pour une augmentation de 50  $\mu g/m^3$  des principaux polluants (essentiellement l'O<sub>3</sub>, en été), on observe une augmentation de 1 à 3 % des hospitalisations pour causes respiratoires chez les patients de plus de 65 ans, de 1 à 8 % des hospitalisations pour asthme chez l'enfant et de 1 à 4 % des hospitalisations pour exacerbation de BPCO. L'étude ERPURS (Évaluation des risques de la pollution urbaine pour la santé) réalisée en Île-de-France adopte la même méthodologie, mais compare trois niveaux de pollution (de base, moyenne et élevée), complémentaires, avec certaines nuances (risques significatifs avec  $NO_2$ , mais pas avec  $O_3$ ) (tableau VI). Les études nord-américaines ont montré des associations essentiellement avec les PM10 (tableau VII).

	Lieu	N/durée	Condition (µg/m <sup>3</sup> )	RR	Polluant
Dockery 1993 [11]	6 villes américaines 1974-91	8111/15 ans	Pollué (29,6) / non pollué (11) Pollué (12,8) / non pollué (4,8)	1,26 1,26	PM10 Sulfates
Pope 1995 [22]	151 villes américaines 1982-89	552 138 / 7 ans	Augmentation de 24,5 $\mu$ g/m <sup>3</sup> Augmentation de 19,9 $\mu$ g/m <sup>3</sup>	1,31 1,26	Particules fines Sulfates
Abbey 1999 [3]	Adventistes californiens 1977-92	6338 / 15 ans	Paliers de 43 jours/an avec PM10 > 100 µg/m <sup>3</sup>	1,18	PM10
Künzli 2000 [18]	Autriche, France, Suisse 1996	mortalité tota	le. RR : 1.043 par paliers de 10 µg/n	$n^3$ de PM10 et po	our 1 million d'habitants sur 1 d

	SO <sub>2</sub>	N	02	Fumée	es noires
	Hiver	Hiver	Été	Hiver	Été
Hospitalisations de cause respiratoire, adulte $\ge 65$ ans			+ 4 %		+ 3 %
Hospitalisation pour exacerbation BPCO, tous âges			+ 6 %		+ 6 %
Hospitalisation pour asthme, 0-14 ans	+ 8 %	11 %	+ 19 %		+ 25 %
Urgences pédiatriques hôpital Trousseau pour bronchiolite			+ 15 %		
Visite à domicile SOS-médecins (Paris pour asthme, enfants)	+ 10 %	+ 8 %	+ 20 %	+ 8 %	+ 15 %
Arrêt de travail (EDF-GDF) de cause respiratoire	+ 7 %	+ 10 %	+ 10 %	+ 5 %	+ 6 %

Tableau VI. – Morbidité respiratoire en fonction des polluants, en Île-de-France [ERPURS] : risque pour un niveau de pollution passant du niveau des 9 jours les moins pollués de l'année au niveau atteint ou dépassé 1 jour sur 2 dans l'année (d'après www.erpors.org).

a Bronchiolites aux urgences pédiatriques/hôpital Trousseau b Arrêts de travail pour cause respiratoire chez EDF-GDF

Tableau VII. – Augmentation du risque pour une augmentation de  $10 \mu g/m^3$  de PM10 en moyenne quotidienne (d'après <sup>[10]</sup>).

Affections respiratoires aux urgences	1 %
Asthme aux urgences	3,4 %
Hospitalisations pour asthme	1,9 %
Augmentation utilisation des bronchodilatateurs/asthmatiques	2,9 %
Majoration symptômes respiratoires	3 %

#### Long terme

On dispose d'un certain nombre de publications sur la dernière décennie relatives aux manifestations sanitaires en rapport avec l'exposition à la pollution atmosphérique au long terme. Cette approche est plus délicate car nécessite un recueil de données sanitaires et environnementales des plus rigoureux et complet afin de ne pas méconnaître un facteur confondant qui pourrait à lui seul expliquer les résultats obtenus (problème du tabagisme passif ou de la pollution intérieure par exemple).

Chez l'enfant, la prévalence de l'asthme diagnostiqué par un médecin est multipliée par 4,40 entre zone industrielle (SO<sub>2</sub>, NOx et particules) et zone considérée non industrielle en Allemagne<sup>[15]</sup>.

A Hong-Kong, l'application de mesures pour la baisse du SO<sub>2</sub> a été suivie d'une baisse significative de la prévalence de l'hyperréactivité bronchique 2 ans après. Une étude autrichienne sur 3 ans, rapporte une baisse de la capacité vitale forcée (CVF) de 48,7 mL (soit 2 % de la valeur théorique) pour une hausse de 10 ppb (20  $\mu$ g/m<sup>3</sup>) d'O<sub>3</sub> en moyenne annuelle<sup>[14]</sup>.

Concernant les adultes, on dispose de deux principales études : ASHMOG et SAPALDIA. L'étude ASHMOG concerne le suivi d'une cohorte californienne d'adventistes non fumeurs sur 15 ans ; aucune association entre le  $SO_2$ , le  $NO_2$  et le développement de maladies respiratoires chroniques n'est rapportée. On trouve en revanche une association entre les particules fines et l'apparition d'une bronchopathie chronique ainsi que son aggravation, pour des niveaux moyens supérieurs à 60 µg/m<sup>3</sup>. Pour l'asthme en particulier, un RR de 3,12 pour une augmentation de 10 ppb (20µg/m<sup>3</sup>) d'O<sub>3</sub> en moyenne annuelle est retrouvée chez les hommes uniquement, de même pour les sulfates <sup>[2]</sup>. Dans la même cohorte et sur 20 ans, pour une concentration de PM10 supérieure à  $100 \mu g/m^3$  dépassée plus de 54 jours par an, on observe une baisse du volume expiratoire maximal seconde /capacité vitale (VEMS/CV) de 1,5 %<sup>[1]</sup>.

Quant à l'étude suisse SAPALDIA, la dyspnée et la bronchite chronique sont augmentés 41 % et 31 % respectivement pour une élévation de 10  $\mu$ g/m<sup>3</sup> de PM10 en moyenne annuelle. Pour les mêmes variations de PM10, on observe une baisse de 3,1 % de la CVF <sup>[29]</sup>.

#### Principales données expérimentales

#### Ozone

L'O<sub>2</sub> est insoluble et atteint facilement le compartiment alvéolaire. C'est le polluant le plus oxydant. Il est néanmoins absorbé à 40 % au niveau des muqueuses des voies aériennes supérieures. On distingue des sujets répondeurs et non répondeurs aussi bien chez le sujet sain qu'asthmatique. Son exposition entraîne des symptômes de rhinite, une toux, une oppression thoracique, l'exacerbation des symptômes d'asthme à court terme, avec un phénomène de tolérance. Sur les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR), on constate une diminution des volumes d'environ 10% et une hyperréactivité bronchique représentée par la baisse des doses d'allergène nécessaires pour entraîner un chute de 20 % du VEMS [PD<sub>20</sub>FEV1]. L'exposition de muqueuses nasales et bronchiques à des doses moyennes d'O3 entraîne une infiltration cellulaire franche à éosinophiles et neutrophiles [5] associée à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL6, l'IL8 (chémoattractrice des polynucléaires neutrophiles [PNN]), l'IL1 et le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)<sup>[26]</sup>.

#### Particules fines

Les particules fines d'un diamètre inférieur à 10 µm gagnent les voies aériennes inférieures, et pour celles en dessous de 3 µm, le compartiment alvéolaire. Les travaux expérimentaux ont été principalement menés avec les PD. Des symptômes de rhinite allergique et de bronchoconstriction sont observés, notamment chez les patients atopiques, asthmatiques et présentant une BPCO. Les PD agiraient comme adjuvant de la réaction immunoallergique en modifiant d'une part certains pneumallergènes avec exposition de nouveaux motifs antigéniques, et générant une réponse locale

de type TH2, d'autre part. Cette hypothèse est actuellement confortée par de nombreuses études, aussi bien in vitro qu'in vivo, qui montrent une synthèse et une sécrétion accrue de GM-CSF par les cellules épithéliales de muqueuse nasale ou bronchique, avec afflux de lymphocytes de type TH2 sécrétant principalement les cytokines les IL4, IL5, IL10, IL13, et une augmentation de lymphocytes B sécréteurs d'IgE<sup>[19]</sup>.

#### Dioxyde de soufre

Le  $SO_2$  est un gaz incolore soluble dans l'eau, qui est piégé à 90 % au niveau de la muqueuse nasale. Sa grande solubilité ne lui permet pas d'atteindre en grande quantité les voies aériennes inférieures. C'est un gaz hautement irritant, entraînant conjonctivite, rhinite, bronchoconstriction chez l'asthmatique et à plus fortes doses chez le sujet sain <sup>[9]</sup>. Il est responsable d'effets cytotoxiques à doses élevées avec œdème pulmonaire, nécrose et desquamation de l'épithélium chez l'animal.

#### Dioxyde d'azote

Le NO<sub>2</sub> est moins soluble et atteint en plus grande quantité les voies aériennes basses. Sa toxicité est essentiellement liée à son pouvoir oxydant, plus faible que l'ozone cependant. On le retrouve à plus de 60 % au niveau des voies aériennes basses. Les études sont contradictoires quant aux manifestations fonctionnelles observée : la plupart des sujets sains restent asymptomatiques même lors de fortes concentrations. Chez le sujet asthmatique, on note cependant une exacerbation des signes respiratoires. Une inflammation de la muqueuse nasale avec augmentation des résistances nasales et des marqueurs de la réaction allergique (éosinophiles, eosinophil cationic protein) est observée chez des sujets présentant une rhinite atopique, exposés à un mélange NO2 et allergène<sup>[28]</sup>. Avec la même approche, on constate une majoration significative de l'hyperréactivité bronchique chez des asthmatiques légers. Sur une muqueuse bronchique de sujets tabagiques non asthmatiques exposés au NO2 à des concentrations rencontrées au domicile ou lors de pics, on observe une altération de l'épithélium avec diminution des battements ciliaires et augmentation de sa perméabilité, ainsi que l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, I'IL8, RANTES, ICAM1s et TNF $\alpha$ ).

# CONCLUSION

La pollution atmosphérique et ses effets sanitaires sont actuellement mieux documentés. Les études épidémiologiques ont permis d'établir des liens entre divers polluants à court terme sur l'appareil respiratoire et d'en distinguer des groupes à risque, notamment les enfants et les personnes âgées, les sujets asthmatiques et les BPCO. La plupart des effets sur la morbidité semblent transitoires et réversibles. En ce qui concerne le long terme, il ne semble pas que la pollution atmosphérique urbaine, notamment automobile, soit responsable de la hausse des manifestations atopiques et de l'asthme. D'autres

facteurs comme la pollution intérieure, l'environnement tabagique sont incriminés. La meilleure compréhension des liens entre polluants et risques sanitaires a permis d'établir un véritable programme de maîtrise des sources polluantes et de prévention des complications pour la santé, dont les effets enregistrés sont d'ores et déjà encourageants.

Arnaud Chambellan : Chef de clinique. Bruno Crestani : Professeur à la faculté, médecin des Hôpitaux. Michel Aubier : Professeur à la faculté, médecin des Hôpitaux, chef de service. Service de pneumologie, CHU Bichat, 46, rue Henri-Huchard, 78877 Paris cedex 18, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : A Chambellan, B Crestani et M Aubier. Pollution atmosphérique et environnementale et pathologie respiratoire. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine, 6-0933, 2003, 6 p

#### RÉFÉRENCES

[1] Abbey DE, Burchette RJ, Knutsen SF, Mcdonnell WF, Lebowitz MD, Enright PL et al. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 158 : 289-298

[2] Abbey DE, Lebowitz MD, Mills PK et al. Long-term ambient concentrations of particulates and oxidants and development of chronic disease in a cohort of nonsmoking California residents. *Inhalation Toxicology* 1995; 7:19-34

[3] Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette WF, Knutsen SF, Lawrence-Beeson W et al. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in non-smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 373-382

[4] Aubier M. Pollution atmosphérique, ses effets sur l'appareil respiratoire. Encycl Méd Chir (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Pneumologie, 6-019-A-38, 1999 : 1-5

[5] Bascom R, Naclerio RM, Fitzgerald MC, Kagey-Sobotka A, Proud D et al. Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1990; 142: 594-601

[6] Committee of the Environmental and Occupation Health Assembly of the American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution. Part 1. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 3-50

[7] Committee of the Environmental and Occupation Health Assembly of the American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution. Part 2. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153 : 477-498

[8] Contribution da la pollution atmosphérique extérieure en pathologie respiratoire. *Rev Mal Respir* 1997; 14 (suppl) : 6S9-6S63.

[9] Department of Health Advisory Group on the Medical aspects of Air Pollution Episodes. Second report-SO2, acid aerosols and particulates. London : HMSO, 1992

[10] Dockery DW, Pope CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. Annu Rev Public Health 1994; 15:107-132

[11] Dockery DW, Pope CA, Xu X et al. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 1753-1759

[12] Dockery DW, Schwartz J, Spengler JD et al. Air pollution and daily mortality : associations with particulates and acid aerosols. *Environ Res* 1992 ; 59 : 362-373

[13] Festy B, Dab W. Pollution atmosphérique. *Encycl Méd Chir (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris),* Toxicologie-Pathologies professionnelles, 16-001-C-10, 1999 : 1-12

[14] Frischer T, Studnicka M, Gartner C, Tauber E, Horak F, Veiter A et al. Lung function growth and ambient ozone. A three-year populationstudy in school children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 160 : 390-396

[15] Heinrich J, Hoelscher B, Wjst M, Ritz B, Cyrys J, Wichmann H et al. Respiratory diseases and allergies in two polluted areas in East Germany. *Environ Health Perspect* 1999; 107:53-62

[16] Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S et al. Short-term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 european cities : results from time series data from the APHEA project. *BMJ* 1997 ; 314 : 1658-1663

[17] Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution : a European assessment. *Lancet* 2000; 356 : 795-801

[18] Moolgavkar SH, Luebeck EG, Hall TA, Anderson EL et al. Air pollution and daily mortality in Philadelphia. *Epidemiology* 1995; 6: 476-484

[19] Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A et al. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 539-554

[20] Politiques publiques, pollution atmosphérique et santé : poursuivre la réduction des risques. Haut Comité de la Santé Publique. Editions ENSP Juillet 2000 ; 1-266

[21] Pollution atmosphérique due aux transports et santé publique. Rapport commun n°12. Editions TEC& DOC. Académie des sciences-CADAS. Octobre1999

[22] Pope CA, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE et al. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of US adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 151 : 669-674

[23] Programme de surveillance air et santé 9 villes (PSAS-9). Surveillance des effets sur la santé liés à la pollution atmosphérique en milieu urbain. Phase II - 27 juin 2002

[24] Quenel P, Zmirou D, Médina S et al. Impact sur la santé de la pollution atmosphérique en milieu urbain : synthèse des résultats de l'étude APHEA. *BEH* 1998 ; 2 : 5-7

[25] Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL et al. Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities1987-1994. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 1742-1749

[26] Schierhorn K, Zhang M, Matthias C, Kunkel G et al. Influence of ozone and  $NO_2$  on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 1013-1019

[27] Schwartz J. Air pollution and daily mortality : a review and meta-analysis. *Environ Res* 1994 ; 64 : 36-52

[28] Wang JH, Devalia JL, Duddle JM, Hamilton SA, Davies RJ et al. The effect of exposure for six hours to  $NO_2$  on early phase nasal response to allergen challenge in patient with a history of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 669-676

[29] Zemp E, Elsasser S, Schindler C, Kunzli N, Perruchoud AP, Domenighetti G et al. Long-term ambient air pollution and respiratory symptoms in adults (SAPA-LDIA study). *Am J respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 1257-1266

# E. Les particules diesels altèrent la mycobactéricidie des macrophages humains

Bonay M, <u>Chambellan A</u>, Grandsaigne M, Aubier M, Hance AJ, Soler P. Diesel Exhaust Particles Affect Mycobactericidal Activity of Human Macrophages. FEMS Immunol Med Mic 2006; 46: 419-25



# Effects of diesel particles on the control of intracellular mycobacterial growth by human macrophages *in vitro*

Marcel Bonay<sup>1,2</sup>, Arnaud Chambellan<sup>1</sup>, Martine Grandsaigne<sup>1</sup>, Michel Aubier<sup>1</sup> & Paul Soler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm U 700, Faculté Xavier Bichat/BP 416, Paris, France and <sup>2</sup>Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

Correspondence: Paul Soler, Inserm U 700, Faculté Xavier Bichat/BP 416, 75870 Paris Cedex 18, France. Tel.: 33 1 44 85 62 89; fax: 33 1 42 26 33 30; e-mail: soler@bichat.inserm.fr

Received 20 July 2005; revised 27 September 2005; accepted 4 November 2005. First published online 8 February 2006.

doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00050.x

Editor: Patrick Brennan

#### Keywords

diesel particles; mycobacteria; macrophages; tuberculosis.

#### Abstract

Changes that may modify the capacity of macrophages to control mycobacterial growth could favour the reactivation of bacillary proliferation within protective granulomas developed in response to mycobacterial infection. There is increasing evidence that diesel exhaust particles (DEPs) could suppress some macrophage functions, but it is not known whether DEPs may alter macrophage mycobactericidal activity. The aim of this study was to assess the effect of DEPs on the mycobactericidal activity of human mononuclear phagocytes in vitro. Human monocytes from healthy donors were cultured for 3 days in the presence or absence of DEPs or carbon black particles (CBPs), and then infected with a Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin reporter strain expressing luciferase activity. DEPs were rapidly internalized by monocyte-derived macrophages without cytotoxic effect. Mycobactericidal activity of cells exposed to DEPs was not different from that of cells cultured in their absence or in the presence of CBPs. Although our study was restricted to the mycobactericidal activity of human macrophages in vitro, the results indicate that DEPs do not directly influence the first line of defence against microorganisms. Whether exposure to DEPs influences the adaptive immune response against mycobacterial infections remains to be determined.

### Introduction

Mycobacterial infections, particularly pulmonary tuberculosis, represent a growing public health concern. Although the vast majority of individuals infected with Mycobacterium tuberculosis are latent carriers of the organism and exhibit no overt sign of disease, the risk of developing reactivation of the organism increases annually in these individuals (Zahrt, 2003). The mechanisms responsible for this reactivation are poorly understood, but conditions that are known to suppress immunity, including HIV infection, corticosteroid therapy, age and malnutrition, are likely to be involved. Mycobacteria, which survive and proliferate within mononuclear phagocytes, are well known to induce a protective immune granulomatous response that contains the pathogen and protects surrounding tissue. Granulomas are dynamic structures composed of monocytes/macrophages and T lymphocytes recruited and activated at the sites of infection (Zahrt, 2003; Co et al., 2004; North & Jung, 2004). The ability of the host to sustain the mycobactericidal activity of macrophages is clearly important in the maintenance of an effective granulomatous response (Zahrt, 2003; Co et al.,

been reported to suppress macrophage function (Saito *et al.*, 2002a; Amakawa *et al.*, 2003). DEPs are ultrafine particles that accumulate within the lung where they interact with pulmonary cells, including cells of the monocyte/macrophage lineage. They have been shown to induce a marked pulmonary inflammatory reaction (Salvi *et al.*, 1999), but it also possible that they could alter protective immune responses. For example, evidence has been reported that DEPs suppress phagocytic activity and secretion of

2004; North & Jung, 2004). Extensive studies have been

reported showing that macrophages produce a range of

activating signals that mobilize both cellular and humoral

effectors against microbial targets, including M. tuberculosis

[reviewed in (Flynn & Chan, 2001)]. However, the ultimate

factor determining mycobacterial immunity is the ability of

macrophages to contain growth of intracellular mycobac-

teria. Thus, changes that may modify the capacity of

macrophages to control mycobacterial growth could favour

the reactivation of bacillary proliferation. In this regard,

diesel exhaust particles (DEPs), which constitute an impor-

tant component of urban air pollution associated with

various respiratory disorders (Sydbom et al., 2001), have

pro-inflammatory cytokines by macrophages in response to lipopolysaccharide (LPS) or following Listeria monocytogenes or Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection (Rudell et al., 1999; Yang et al., 1999; Saito et al., 2002b; Yin et al., 2002, 2004; Siegel et al., 2004). Interestingly, prior exposure to DEPs has been shown to exacerbate the effect of BCG lung infection, an effect associated with reduced sensitivity of DEP-exposed macrophages to interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Saxena *et al.*, 2003). IFN- $\gamma$ , which is a potent activator of macrophages and a key cytokine involved in the formation and maintenance of granulomas, has been shown to be important for the control of mycobacterial infection (Zahrt, 2003; Co et al., 2004). Thus, it remains possible that DEPs may alter susceptibility to mycobacterial infections by suppressing the bactericidal activity of macrophages. A suppressive effect of DEPs on macrophage antibacterial activity could represent a serious challenge to pulmonary immune reactions in response to mycobacterial infection, but whether DEPs could alter macrophage antibacterial activity was unknown.

To address this question, we assessed the effect of DEPs on the mycobactericidal activity of human macrophages in vitro. Although alveolar macrophages of the respiratory tract represent the first cells of the immune system exposed to these inhaled particles, we chose to perform the study on macrophages derived from peripheral blood monocytes for the following reasons: first, a pulmonary inflammatory reaction in response to chronic DEP exposure will favour the continuous recruitment of monocytes to the lungs and, thus, DEPs will be taken up by recently recruited monocytes/macrophages rather than by fully differentiated macrophages; second, whereas bacteria are first engulfed by alveolar macrophages, mycobacterial containment is focused on granulomatous lesions where M. tuberculosis resides in monocytes/macrophages recruited from peripheral blood (Zahrt, 2003; Co et al., 2004). We used a method permitting the rapid quantification of viable mycobacteria based on the detection of luciferase activity expressed by an M. bovis – BCG reporter strain (Bonay et al., 1999; Verreck et al., 2004). Monocytes from healthy donors were isolated by elutriation, maintained in culture to differentiate into macrophages, and then cultured in the presence of DEPs and subsequently infected by mycobacteria. The results indicate that DEPs are rapidly internalized by human macrophages but do not alter their mycobactericidal activity in vitro.

#### **Materials and methods**

#### Purification and culture of human monocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from leukapheresis concentrates obtained from healthy volunteers by centrifugation on Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Monocytes were then purified by counterflow centrifugal elutriation as previously described (Bonay *et al.*, 1999). Monocytes had a viability of more than 95% and a purity of at least 92% in all experiments.

To initiate experiments, monocytes were resuspended in complete medium (IMDM; Sigma, St Louis, MO) supplemented with 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 20% human AB serum (Institut Jacques Boy, Reims, France),  $200 \text{ UmL}^{-1}$  penicilin G and  $1 \mu \text{g mL}^{-1}$ kanamycin (Sigma), allowing growth of the mycobacterial kanamycin-resistant reporter strain used in the study. Cells were cultured in 96-well flat-bottom plates with opaque sides and transparent bottoms (EG&G Wallac, Turku, Finland) at  $2 \times 10^5$  cells per well, a density that has previously been shown to be optimal for the control of mycobacterial infection (Boechat et al., 2001). They were maintained at 37 °C in 95% air, 5% CO2 for 3 days before infection. Monocytes are known to differentiate in vitro into macrophages, and thus they are referred to as monocyte-derived macrophages in the present study.

#### Infection of monocyte-derived macrophages

Construction of the mycobacterial reporter strain expressing luciferase activity and preparation of the mycobacterial suspensions used for infection have been previously described (Bonay *et al.*, 1999). To infect monocyte-derived macrophages, culture medium was removed and  $25 \,\mu\text{L}$  of a mycobacterial suspension was added, followed by fresh complete medium with or without other additions as indicated below to a final volume of  $200 \,\mu\text{L}$ .

#### Exposure of monocyte-derived macrophages to DEPs

Standard reference diesel particulate matter SRM 1650 purchased from the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD) was used in this study. SRM 1650 represents combustion particles from a heavyduty diesel engine commonly used to evaluate the toxicity of DEPs, which has been recently demonstrated to be a suitable surrogate of DEPs emitted from current diesel vehicles (Boland *et al.*, 2001). Carbon black (FR103; 95 nm in diameter) used as a control was obtained from Degussa (Frankfurt, Germany). Stock solutions of particles were made by suspension in phosphate-buffered saline (PBS) and sonicated three times for 60 s each at maximal power (8 kilocycles). Particles were resuspended in serum-free culture medium by further sonication  $(3 \times 20 \text{ s})$  just before addition to the cultures.

As the biologically relevant tissue culture concentration of DEPs studied in macrophages has been shown to range from 0.2 to  $20 \,\mu g \,\mathrm{cm}^{-2}$  (Li *et al.*, 2003), we chose to test three

concentrations:  $10 \,\mu g \,cm^{-2}$  (70  $\mu g \,mL^{-1}$ ), a concentration commonly used to test the effects of DEPs on macrophages in vitro and already used in our laboratory to study the effects of DEPs on airway epithelial cells (Boland et al., 1999; Li et al., 2003);  $20 \,\mu g \,\mathrm{cm}^{-2}$  (140  $\mu g \,\mathrm{mL}^{-1}$ ), the maximal biologically relevant dose; and  $40\,\mu g\,cm^{-2}~(280\,\mu g\,m L^{-1}),$ twice the maximal relevant dose.

#### **Evaluation of mycobacterial growth**

The techniques used for assessment of mycobacterial number, based on luciferase activity expressed as relative light units (RLU), have been previously described (Bonay et al., 1999). Briefly, mycobacteria expressing luciferase activity were cultured in the presence or absence of mononuclear phagocytes, and after varying periods of culture the medium was removed, the cells and mycobacteria were lysed, and luciferase activity present in the lysate was determined by luminometry. In this system, based on the measurement of luciferase activity expressed by viable mycobacteria, mycobacterial killing resulted in the rapid loss of luciferase activity. We chose this system because one obstacle to the identification of signals stimulating mycobactericidal activity is the relative difficulty of measuring survival of these organisms by standard techniques (e.g. quantification of CFU). Pathogenic mycobacteria are slow-growing organisms, and several weeks are required to obtain results for a single experiment. Because each specimen is typically plated at several different dilutions, practical constraints limit the number of conditions that can be evaluated. In addition, mycobacteria have the strong tendency to form aggregates, and it is often difficult to determine whether techniques used to disperse samples have reduced mycobacterial viability and have successfully eliminated clumps. Nevertheless, in one parallel series of experiments used as positive controls, we evaluated CFU as previously described (Bonay et al., 1999).

#### Distribution of DEPs and mycobacteria in the cultures

To evaluate the distribution of DEPs and mycobacteria in the cultures, cells were recovered and treated for electron microscopy as previously described (Boland et al., 1999; Bonay et al., 1999). For mycobacteria, the protocol used permitted the recovery of all extracellular bacteria and cells. Semithin sections were cut to allow counting infected cells via light microscopy. Ultrathin sections were examined with a Philips EM 410 electron microscope (Eindhoven, The Netherlands).

#### Statistical methods

All results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons between groups were made using analysis of variance (ANOVA). A P value <0.05 was considered significant.

Fig. 1. (a, b) Human monocyte-derived macrophages 24 h after infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. (a) Note the cellular distribution of numerous Ziehl-stained mycobacteria. Extracellular organisms are virtually absent. Original magnification: × 500. (b) By electron microscopy, all microorganisms are observed within intracytoplasmic vacuoles. Original magnification: ×15 000. (c, d) Human monocyte-derived macrophages 24 h after exposure to  $10 \,\mu g \, \text{cm}^{-2}$  diesel exhaust particles observed closely associated with the macrophages. Phase contrast microscopy. Original shows that DEPs are ingested within vacuoles.

(DEPs). (c) As for mycobacteria, the particles are magnification: ×500. (d) Ultrastructural analysis Original magnification: ×12 000.


#### Results

#### Internalization of mycobacteria and DEPs by monocyte-derived macrophages

Under the culture conditions used in the study, when cells were exposed to Mycobacterium bovis - BCG, mycobacteria were essentially all found associated with monocyte-derived macrophages 24 h after infection (Fig. 1a). Very rare extracellular microorganisms could be detected. Microscopic evaluation of semithin sections, prepared through a protocol retaining extracellular mycobacteria, indicated that >99% of mycobacteria had been engulfed by macrophages. Ultrastructural evaluation confirmed that these bacteria were present within macrophage phagosomes (Fig. 1b). In agreement with these observations, luciferase activity, which reflects the presence of viable mycobacteria, could not be detected in culture supernatants. More than 90% of cells remained viable after 7 days of culture as assessed by propidium iodide staining. Cells with condensed nuclei typical of apoptotic cells were observed but were never abundant.

When monocyte-derived macrophages were exposed to DEPs, the particles rapidly sedimented onto the culture plates. When monocyte-derived macrophages were exposed to DEP concentrations of 20 and  $40 \,\mu g \,\mathrm{cm}^{-2}$ , the particles rapidly sedimented onto the culture plates, giving the whole surface a homogeneous black appearance. By contrast, when particles were used at  $10 \,\mu g \, \text{cm}^{-2}$ , although they rapidly sedimented onto the culture plates, 24 h later they showed a cellular distribution. As shown in Fig. 1c, DEPs were not deposited on the plate between cells, but were all associated with mononuclear phagocytes, suggesting that they have been ingested. Ultrastructural analysis demonstrated that DEPs were internalized by mononuclear phagocytes, accumulating within vacuoles (Fig. 1d). Cell viability, assessed by a trypan blue exclusion test, showed that DEPs had no cytotoxic effects. This was confirmed by electron microscopy, as no sign of cellular degeneration or apoptosis was observed at the ultrastructural level.

Similar observations were made when mononuclear phagocytes were cultured for 3 days in the presence of DEPs and then infected with M. bovis - BCG. Both DEPs and mycobacteria were found within macrophages, and 24 h after infection extracellular microorganisms were virtually absent on the culture plates.

### Evaluation of mycobacterial survival in monocyte-derived macrophages

Monocyte-derived macrophages were maintained in culture at a density  $(2 \times 10^5$  cells per well) that was able to control mycobacterial proliferation. The kinetics of mycobacterial growth is shown in Fig. 2. As assessed through luciferase

activity (RLU), the number of mycobacteria increased during the first 48 h of culture and then decreased to reach, at day 10, levels near or below those originally present. Similar kinetics was observed when mycobacterial number was measured by evaluation of CFU (data not shown).

#### Effect of DEPs on bactericidal activity of monocyte-derived macrophages

To evaluate whether DEPs could influence the ability of macrophages to limit mycobacterial growth, monocytes were precultured with DEPs for 3 days before being infected, and mycobacterial number was evaluated at varying periods of culture. As shown in Fig. 3a, addition of DEPs at 10, 20 or  $40 \,\mu g \,\mathrm{cm}^{-2}$  to cultures did not significantly modify the survival of these organisms compared with mycobacterial survival in control cells. To test the possibility that functional changes such as altered phagocytic capacity or activation of the cells due to pretreatment with the particles could have altered the control of mycobacterial growth, we exposed cells to DEPs at the time of infection and compared their bactericidal activity with that of cells pretreated with particles. In these experiments, mycobacteria were again essentially all found associated with monocyte-derived macrophages 24 h after infection with M. bovis - BCG and, accordingly, luciferase activity could not be detected in culture supernatants. Evaluation of mycobacterial growth in this series of experiments gave similar results to those when cells were exposed to particles 3 days before infection



Fig. 2. Evaluation of mycobacterial number by measurement of luciferase activity. Aliquots of  $2 \times 10^5$  human monocytes were cultured for 10 days in 200 µL complete medium and infected with the Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin reporter strain, as described in the Methods section. After the indicated periods of culture, the number of mycobacteria was evaluated with the luciferase assay (relative light units, RLU). Results are the mean  $\pm$  standard deviation for six independent experiments with cells from different individuals.



Fig. 3. Effect of diesel exhaust particles (DEPs) on mycobactericidal activity of human monocyte-derived macrophages. (a) Aliquots of  $2 \times 10^5$  human monocytes were cultured for 3 days in the presence of 10 (open bars), 20 (hatched bars) or 40 (black bars)  $\mu$ g cm<sup>-2</sup> DEPs, then infected with the Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) reporter strain as described in the Methods section, and cultured for an additional 10 days. Results are expressed as the percentage of values obtained for control cells. In no case did the addition of DEPs to cultures significantly modify the survival of microorganisms. (b) Monocytes were cultured for 3 days in the presence of complete medium (open bars), or medium containing DEPs (black bars) or CBPs (hatched bars), then infected with the M. bovis-BCG reporter strain. Survival of organisms was not modified comparing cells cultured in the presence of DEPs or in complete medium alone, as shown for example for the biologically relevant dose of  $10 \,\mu g \, \text{cm}^{-2}$  currently used in *in vitro* studies. (c) Results were similar when DEPs were added on the day of infection. Results are the mean  $\pm$  standard deviation for five independent experiments with cells from different individuals.

(Fig. 3b, c), strongly suggesting that pretreatment had not induced major functional changes.

#### Discussion

Previous studies evaluating the effects of DEPs on pulmonary macrophages focused on their phagocytic activity or on secretion of proinflammatory cytokines. These studies have shown that DEPs may suppress macrophage phagocytosis or cytokine production in response to LPS stimulation or following infection (Rudell et al., 1999; Yang et al., 1999; Saito et al., 2002b; Yin et al., 2002, 2004; Siegel et al., 2004), suggesting that DEPs may retard bacterial clearance and weaken innate and adaptive immunity. However, the effect of DEPs on the bactericidal activity of macrophages, and in particular their ability to contain mycobacterial growth, had not previously been assessed. This was probably due to the fact that the traditional measurement procedure of CFU for evaluating mycobacterial survival is time consuming and not easy to perform. We have developed a rapid and sensitive approach in which human monocyte-derived macrophages are able to control the replication of an Mycobacterium bovis - BCG reporter strain expressing luciferase activity (Bonay et al., 1999). In this approach, the density of monocytes used is sufficient to form complete monolayers in the microplate wells, ensuring that the mycobacteria, which settle to the bottom, contact the cells. Within 24 h, no evidence for extracellular mycobacteria was found via morphological examination, and no luciferase activity was detected in the supernatants. This model has proved to be useful in identifying conditions that could influence cell permissivity for mycobacterial growth (Bonay et al., 1999; Boechat et al., 2001; Bouchonnet et al., 2002; Verreck et al., 2004). In the present study, it was used under conditions that render human monocytes resistant to mycobacterial growth (Boechat et al., 2001), and thus was suitable in assessing the possible deleterious effects of environmental pollutants such as DEPs on macrophage mycobacterial susceptibility.

Using this model, we first showed that following direct exposure to DEPs, monocyte-derived macrophages rapidly ingested these particles, and no cytotoxic effects were observed. When DEP-treated cells were exposed to M. bovis - BCG, mycobacteria were rapidly found within macrophages, indicating that DEP exposure had not modified the phagocytic capacity of these cells. Previous studies have shown, however, that DEPs may influence the phagocytosis by macrophages in vitro (Rudell et al., 1999; Saito et al., 2002b), but it should be noted that macrophages were evaluated ex vivo after exposure of normal healthy volunteers or rats to inhaled DEPs. By contrast, and in agreement with our findings, in studies evaluating direct exposure in vitro of human and rat macrophages to environmental particles, all particles tested, including DEPs, were rapidly phagocytosed and DEPs were found to be nontoxic (Becker et al., 1996). Moreover, although in the

study by Saito *et al.* (2002b) DEPs were found to suppress cytokine production by rat macrophages regardless of exposure to BCG, indirect evidence suggested that DEPs had no suppressive effect on the phagocytosis of BCG by these cells.

Mycobacterial killing by macrophages is known to be associated with the production of reactive nitrogen or oxygen species and cytokines, particularly interleukin-1, tumour necrosis factor-a and granulocyte monocyte colony-stimulating factor in humans (Beltan et al., 2000; Nathan & Shiloh, 2000). In the present study the mycobactericidal activity of monocyte-derived macrophages infected with an M. bovis - BCG reporter strain was not found to be influenced by exposure to DEPs. The control of mycobacterial growth was similar to that observed in standard conditions or in the presence of carbon black particles (CBPs). This suggests that the production of reactive nitrogen or oxygen species or cytokines by human macrophages in vitro in response to mycobacterial infection is not profoundly affected by DEP exposure. In this regard, exposure to diesel dust particles has not been found to modify human macrophage chemiluminescence linked to the production of reactive oxygen species (Becker et al., 1996). For cytokines, however, most prior in vitro studies have suggested that DEPs could aggravate bacterial infection by suppressing the expression of cytokines by macrophages stimulated with LPS, or infected with M. bovis - BCG or L. monocytogenes (Yang et al., 1999; Saito et al., 2002b; Yin et al., 2002, 2004; Siegel et al., 2004). The reasons for the differences between these results and those reported here remain unknown; manifest differences in the experimental protocols used are obvious possibilities. For example, murine macrophages were evaluated ex vivo after exposure of animals to inhaled or intratracheal DEPs. It is possible that macrophages respond differently under these experimental conditions, or that human macrophages differ from murine macrophages. In this regard, we have previously demonstrated that human monocytes/macrophages have the intrinsic capacity to develop into cells capable of controlling mycobacterial proliferation (Boechat et al., 2001). Evaluation of the mechanisms involved suggests that the density of the cells present and differences in their differentiated state, not the production of autocrine/paracrine mediators, are chiefly responsible for their improved bacteriostatic activity. Results of the present study suggest that DEPs have no effect on this process.

Apoptosis represents another potential mechanism by which infected macrophages may contain mycobacterial growth (Fratazzi *et al.*, 1999). However, as discussed elsewhere (Boechat *et al.*, 2001), very few apoptotic cells are observed in our *in vitro* model, indicating that macrophage apoptosis is unlikely to account for the reduced mycobacterial growth seen over the culture period. The incidence of DEP exposure on this mechanism remains to be evaluated *in vivo*.

Whereas macrophages play a key role in containing mycobacterial infection, different T-cell populations participate in the protective immune response in the course of a granulomatous reaction. Mycobacteria-containing macrophages favour the emergence of T-cell populations capable of recognizing mycobacterial antigens, leading to the production of Th1 cytokines that in turn activate infected macrophages to contain the infection (Zahrt, 2003; Co et al., 2004; North & Jung, 2004). The development of cytotoxic T lymphocytes capable of destroying cells infected with mycobacteria may also play an important role in the control of mycobacterial infection. Thus, the impact of DEP exposure on the capacity of macrophages to contain mycobacterial infection suggests that we need to study not only the bactericidal capacity of these cells, but also the host response (both humoral and cell-mediated) to mycobacteria. This needs to be evaluated before the question of whether DEPs can truly impair macrophage mycobactericidal activity can be answered. Nevertheless, although our study was restricted to the bactericidal activity of human macrophages in vitro independently of the overall immune response against mycobacterial infection, the results indicate that DEPs, a major urban air pollutant with well-known adverse effects on human health, do not directly influence the first line of defence against microorganisms. Further studies are clearly required to determine whether DEP exposure could influence the adaptive immune response against mycobacterial infections, and thus favour the reactivation of mycobacterial granulomas. In this respect, it has recently been shown that continued inhalation of DEPs may reduce the capacity of murine macrophages to kill mycobateria in vivo, and thus increase susceptibility to mycobacterial infections (Hiramitsu et al., 2005).

## Acknowledgements

We thank Dr Catherine Pierre-Audigier for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by a PRIMEQUAL-PREDIT grant from the Ministère de l'Environnement.

## References

- Amakawa K, Terashima T, Matsuzaki T, Matsumaru A, Sagai M & Yamaguchi K (2003) Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res* **29**: 149–164.
- Becker S, Soukup JM, Gilmour MI & Devlin RB (1996) Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation

and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 637–648.

Beltan E, Horgen L & Rastogi N (2000) Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria. *Microb Pathol* **28**: 313–318.

Boechat N, Bouchonnet F, Bonay M, Grodet A, Pelicic V, Gicquel B & Hance AJ (2001) Culture at high density improves the ability of human macrophages to control mycobacterial growth. *J Immunol* **166**: 6203–6211.

Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M & Marano F (1999) Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol* 276: L604–L613.

Boland S, Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Houcine O, Pain C, Meyer M & Marano F (2001) Similar cellular effects induced by diesel exhaust particles from a representative diesel vehicle recovered from filters and standard reference material 1650. *Toxicol In Vitro* **15**: 379–385.

Bonay M, Bouchonnet F, Pelicic V, Lagier B, Grandsaigne M, Lecossier D, Grodet A, Vokurka M, Gicquel B & Hance AJ (1999) Effects of stimulation of human macrophages on intracellular survival of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. Evaluation with a mycobacterial reporter strain. *Am J Respir Crit Care Med* **159**: 1629–1637.

Bouchonnet F, Boechat N, Bonay M & Hance AJ (2002) Alpha/ beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* **70**: 3020–3025.

Co DO, Hogan LH, Kim SI & Sandor M (2004) Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host–pathogen relationship. *Clin Immunol* **113**: 130–136.

Flynn JL & Chan J (2001) Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19: 93–129.

Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H & Remold HG (1999) Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol* 66: 763–764.

Hiramitsu K, Saito Y, Sakakibara K, Azuma A & Kudoh S (2005) The effects of inhalation of diesel exhaust on murine mycobacterial infection. *Exp Lung Res* **31**: 405–415.

Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC & Nel AE (2003) Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* **109**: 250–265.

Nathan C & Shiloh MU (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8841–8848.

North RJ & Jung YJ (2004) Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22: 599–623.

Rudell B, Blomberg A, Helleday R, Ledin MC, Lundback B, Stjernberg N, Horsted P & Sandström T (1999) Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trap filtered exhaust. *Occup Environ Med* **56**: 527–534.

- Saito Y, Azuma A, Kudo S, Takizawa H & Sugawara I (2002a) Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low- and high-dose diesel exhaust exposure. *Exp Lung Res* 28: 493–506.
- Saito Y, Azuma A, Kudo S, Takizawa H & Sugawara I (2002b) Effects of diesel exhaust on murine alveolar macrophages and a macrophage cell line. *Exp Lung Res* **28**: 201–217.

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandström T, Holgate ST & Frew A (1999) Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**: 702–709.

Saxena RK, Saxena QB, Weissman DN, Simpson JP, Bledsoe TA & Lewis DM (2003) Effect of diesel exhaust particulate on bacillus Calmette-Guerin infection in mice and attendant changes in lung interstitial lymphoid subpopulations and IFNgamma response. *Toxicol Sci* **73**: 66–71.

Siegel PD, Saxena RK, Saxena QB, Ma JKH, Ma JYC, Yin XJ, Castranova V, Al-Humadi N & Lewis DM (2004) Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components. *J Toxicol Environ Health A* 67: 221–231.

Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandström T & Dahlen SE (2001) Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* **17**: 733–746.

Verreck FAW, de Boer T, Langerberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R & Ottenhoff THM (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4560–4565.

Yang HM, Barger MW, Castranova V, Ma JKH, Yang JJ & Ma JYC (1999) Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A* **58**: 261–278.

Yin XJ, Schafer R, Ma JYC, Antonini JM, Weissman DD, Siegel PD, Barger MW, Roberts JR & Ma JKH (2002) Alteration of pulmonary immunity to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles (DEPs). I. Effects of DEPs on early pulmonary responses. *Environ Health Perspect* **110**: 1105–1111.

Yin XJ, Dong CC, Ma JYC, Antonini JM, Roberts JR, Stanley CF, Schafer R & Ma JKH (2004) Suppression of cell-mediated immune responses to listeria infection by repeated exposure to diesel exhaust particles in brown Norway rats. *Toxicol Sci* 77: 263–271.

Zahrt TC (2003) Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection. Microbes Infect 5: 159–167.

## F. Principaux résultats de l'analyse pangénomique effectuée sur FOSi

Nom	Bruit de fond moyen < 100	Variation entre pixels < 5	Facteur de correction	%P	3'/5'β-Actin <2	3'/5' GAPDH < 2
FOSibase	43	1,42	1,53	59	1,10	0,91
$FOSi + 4h TNF\alpha$	45	1,72	1,46	57	1,12	0,91
$FOSi + 4h IFN \gamma$	44	1,61	1,42	59	1,20	0,93
FOSi + 18h IFN y	40	1,52	1,46	58	1,16	0,94
FOSscr base	46	1,78	3,28	42	1,08	0,96
$FOSser + 4hTNF\alpha$	42	1,55	2,68	44	0,97	1,04
$FOSser + 4h IFN \gamma$	41	1,42	2,91	44	0,99	0,98
$FOSser + 18h$ IF N $\gamma$	39	1,46	3,08	43	0,89	0,99
Moyenne (ET)	42 (2)	1,56 (0,13)	2,23(0,83)	51 (8)	1,06 (0,10)	0,96 (0,04)

## 1. Evaluation des critères qualité des puces Affymetrix HG-U133A

Les valeurs habituellement obtenues pour le bruit de fond moyen se situent entre 20 et 100, avec une variation de pixel à pixel entre 2 et 4.

La comparaison entre puces est rendue possible après correction du signal moyen de chaque puce à une même valeur d'intensité fixée à 300.

L'analyse des gènes détectés « présent » par le logiciel Microarray Suite 5,1 doit donner une valeur de P > 20%, avec une variation < 15% entre échantillons (dans le cas contraire, ceci témoigne d'une qualité médiocre de l'échantillon).

Les contrôles internes de la qualité des ARNc sont le ratio des intensités 3'/5' de l'actine et de la GAPDH qui doivent être < 3-4.

L'ensemble de la méthodologie utilisée dans cette étude et l'analyse des données sont conformes aux recommandations concernant le contrôle-qualité des plateformes de transcriptomes proposées par la MGED (Microarray Gene Expression Data Society) et le consensus MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) (www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html. 2. Analyse par regroupements (clusters) selon la similitude des profils d'expression



## 3. Analyse génomique fonctionnelle de FOSi/FOSscr





## 4. Analyse préliminaire pour les cytokines



Affy ID	Commun	Nom	FOSi			FOSscr	
			Base	IFN 4h	IFN 18h	IFN 4h	IFN 18h
205992_s_at	IL15	interleukin 15	11,4	31,9	22,3	1,4	1,4
217371_s_at	IL15	interleukin 15	14,8	44,9	27,5	0,1	1,2
206295_at	IL18	interleukin 18	21,0	26,6	23,7	0,7	0,9
206924_at	IL11	interleukin 11	2,6	4,1	5,6	0,2	0,1
211506_s_at	IL8	interleukin 8	4,3	5,2	8,2	3,4	38,7
202859_x_at	IL8	interleukin 8	2,2	2,4	6,3	0,3	2,4

A ffy ID	Commun	Nom	F	<b>FOSi</b>	FOSscr
	Commun	INOIII	Base	TNF 4h	TNF 4h
206924_at	IL11	interleukin 11	2,6	12,5	0,0
217371_s_at	IL15	interleukin 15	14,8	42,9	0,7
205992_s_at	IL15	interleukin 15	11,4	32,7	1,4
206295_at	IL18	interleukin 18	21,0	39,2	0,2
203828_s_at	IL32	interleukin 32	1,3	149,3	0,9
202859_x_at	IL8	interleukin 8	2,2	149,7	1,0
211506_s_at	IL8	interleukin 8	4,3	676,6	5,3

G. Résultats préliminaires sur la survie cellulaire de FOSi et FOSscr (abstract American Thoracic Society, San Diego 2009)

POSTER À CONSULTER SUR LA THÈSE PAPIER

## X. Bibliographie

1. Girosi D, Bellodi S, Sabatini F, Rossi GA. The lung and the gut: common origins, close links. Paediatr Respir Rev. 2006;7 Suppl 1:S235-9.

2. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. Respirology. 2003 Dec;8(4):432-46.

3. Harkema JR, Mariassy A, St. George J, Hyde DM, Plopper CG. Epithelial cells of the conducting airways: a species comparison. In: Farmer SG, Hay DWP (eds) The airway epithelium: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology Marcel-Dekker, New York. 1991:3-39.

4. Jeffery PK. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. Am Rev Respir Dis. 1991 May;143(5 Pt 1):1152-8; discussion 61.

5. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2006 Nov;3(8):726-33.

6. Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001 Jun;24(6):671-81.

7. Reid L, Meyrick B, Antony VB, Chang LY, Crapo JD, Reynolds HY. The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Jul 1;172(1):136-9.

8. Warburton D, Perin L, Defilippo R, Bellusci S, Shi W, Driscoll B. Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. Proc Am Thorac Soc. 2008 Aug 15;5(6):703-6.

9. Falkowski PG, Godfrey LV. Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2008 Aug 27;363(1504):2705-16.

10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):47-95.

11. van der Vliet A, Cross CE. Oxidants, nitrosants, and the lung. Am J Med. 2000 Oct 1;109(5):398-421.

12. Deneke SM, Fanburg BL. Normobaric oxygen toxicity of the lung. N Engl J Med. 1980 Jul 10;303(2):76-86.

13. Papi A, Contoli M, Gasparini P, Bristot L, Edwards MR, Chicca M, et al. Role of xanthine oxidase activation and reduced glutathione depletion in rhinovirus induction of inflammation in respiratory epithelial cells. J Biol Chem. 2008 Oct 17;283(42):28595-606.

14. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.

15. Grisham M. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. Ed. R.G. Landes, Austin. 1992.

16. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am J Physiol. 1995 May;268(5 Pt 1):L699-722.

17. Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. Free Radic Biol Med. 2003 Aug 1;35(3):213-25.

18. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Aug;283(2):L246-55. 19. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. Biochim Biophys Acta. 1999 May 5;1411(2-3):217-30.

20. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiol Rev. 2004 Jul;84(3):731-65.

21. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.

22. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. Am J Med. 1991 Sep 30;91(3C):2S-13S.

23. Bebok Z, Varga K, Hicks JK, Venglarik CJ, Kovacs T, Chen L, et al. Reactive oxygen nitrogen species decrease cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and cAMP-mediated Cl- secretion in airway epithelia. J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):43041-9.

24. Banhegyi G, Benedetti A, Csala M, Mandl J. Stress on redox. FEBS Lett. 2007 Jul 31;581(19):3634-40.

25. Snider GL, Rinaldo JE. Oxygen therapy, oxygen therapy in medical patients hospitalized outside of the intensive care unit. Am Rev Respir Dis. 1980 Nov;122(5 Pt 2):29-36.

26. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Jun;163(7):1723-9.

27. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2000 May 4;342(18):1334-49.

28. Carvalho CR, de Paula Pinto Schettino G, Maranhao B, Bethlem EP. Hyperoxia and lung disease. Curr Opin Pulm Med. 1998 Sep;4(5):300-4.

29. Cantin AM, White TB, Cross CE, Forman HJ, Sokol RJ, Borowitz D. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. Free Radic Biol Med. 2007 Jan 1;42(1):15-31.

30. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2005;2(1):50-60.

31. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur J Pharmacol. 2001 Oct 19;429(1-3):195-207.

32. Crapo JD, Harmsen AG, Sherman MP, Musson RA. Pulmonary immunobiology and inflammation in pulmonary diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Nov;162(5):1983-6.

33. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. The attenuated fibroblast sheath of the respiratory tract epithelial-mesenchymal trophic unit. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Dec;21(6):655-7.

34. Fish EM, Molitoris BA. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. N Engl J Med. 1994 Jun 2;330(22):1580-8.

35. Knight D. Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. Immunol Cell Biol. 2001 Apr;79(2):160-4.

36. Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. Respir Res. 2002;3:22.

37. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. Immunol Rev. 2000 Feb;173:27-38.

38. Holt PG. Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. Eur Respir J. 1993 Jan;6(1):120-9.

39. Devalia JL, Davies RJ. Airway epithelial cells and mediators of inflammation. Respir Med. 1993 Aug;87(6):405-8.

40. Folkerts G, Nijkamp FP. Airway epithelium: more than just a barrier! Trends Pharmacol Sci. 1998 Aug;19(8):334-41.

41. Barnes PJ. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. Chest. 2006 Jan;129(1):151-5.

42. Wang Y, Bai C, Li K, Adler KB, Wang X. Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. Respir Med. 2008 Jul;102(7):949-55.

43. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev. 2000 Feb;173:17-26.

44. Janssen YM, Barchowsky A, Treadwell M, Driscoll KE, Mossman BT. Asbestos induces nuclear factor kappa B (NF-kappa B) DNA-binding activity and NF-kappa B-dependent gene expression in tracheal epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 29;92(18):8458-62.

45. Jaspers I, Flescher E, Chen LC. Ozone-induced IL-8 expression and transcription factor binding in respiratory epithelial cells. Am J Physiol. 1997 Mar;272(3 Pt 1):L504-11.

46. Guo FH, Erzurum SC. Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in human airway epithelium. Environ Health Perspect. 1998 Oct;106 Suppl 5:1119-24.

47. Message SD, Johnston SL. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. J Leukoc Biol. 2004 Jan;75(1):5-17.

48. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol. 2000 Feb;12(1):64-76.

49. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. Thorax. 2004 Aug;59(8):713-21.

50. Nakayama T, Church DF, Pryor WA. Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. Free Radic Biol Med. 1989;7(1):9-15.

51. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect. 1985 Dec;64:111-26.

52. Zang LY, Stone K, Pryor WA. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. Free Radic Biol Med. 1995 Aug;19(2):161-7.

53. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. Ann N Y Acad Sci. 1993 May 28;686:12-27; discussion -8.

54. Ghio AJ, Hilborn ED, Stonehuerner JG, Dailey LA, Carter JD, Richards JH, et al. Particulate matter in cigarette smoke alters iron homeostasis to produce a biological effect. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Dec 1;178(11):1130-8.

55. Slama K. Global perspective on tobacco control. Part I. The global state of the tobacco epidemic. Int J Tuberc Lung Dis. 2008 Jan;12(1):3-7.

56. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 6;101(27):10143-8.

57. Tobacco smoking. . European lung White book ERS. 2004:108-24.

58. Reardon JZ. Environmental tobacco smoke: respiratory and other health effects. Clin Chest Med. 2007 Sep;28(3):559-73, vi.

59. WHO. WHO Framework Convention on Tobacco Control. Geneva, Switzerland: WorldHealth Organization. 2005.

60. Yoneda K, Peck K, Chang MM, Chmiel K, Sher YP, Chen J, et al. Development of high-density DNA microarray membrane for profiling smoke- and hydrogen peroxide-induced genes in a human bronchial epithelial cell line. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S85-9.

61. Hackett NR, Heguy A, Harvey BG, O'Connor TP, Luettich K, Flieder DB, et al. Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Sep;29(3 Pt 1):331-43.

62. Powell CA, Spira A, Derti A, DeLisi C, Liu G, Borczuk A, et al. Gene expression in lung adenocarcinomas of smokers and nonsmokers. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Aug;29(2):157-62.

63. Spira A, Beane J, Pinto-Plata V, Kadar A, Liu G, Shah V, et al. Gene expression profiling of human lung tissue from smokers with severe emphysema. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004 Dec;31(6):601-10.

64. Spira A, Beane JE, Shah V, Steiling K, Liu G, Schembri F, et al. Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. Nat Med. 2007 Mar;13(3):361-6.

65. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. Eur Respir J. 2000 Sep;16(3):534-54.

66. Bean JW. Effects of oxygen at increased pressure. Physiol Rev. 1945 1945;25:1-147.

67. Behnke AR. High atmospheric pressures; physiological effects of increased and decreased pressures; applications of these findings to clinical medicine. Ann Intern Med. 1940;13:2217-28.

68. Comroe JH, Dripps RD, Dumke PR, Deming M. The effect of inhalation of high concentration of oxygen for twenty-four hours on normal men at sea level and at a simulated altitude of 18,000 feet. JAMA. 1945;128(10):710-17.

69. Burger EJ, Jr., Mead J. Static properties of lungs after oxygen exposure. J Appl Physiol. 1969 Aug;27(2):191-7.

70. Caldwell PR, Lee WL, Jr., Schildkraut HS, Archibald ER. Changes in lung volume, diffusing capacity, and blood gases in men breathing oxygen. J Appl Physiol. 1966 Sep;21(5):1477-83.

71. Erzurum SC, Danel C, Gillissen A, Chu CS, Trapnell BC, Crystal RG. In vivo antioxidant gene expression in human airway epithelium of normal individuals exposed to 100% O2. J Appl Physiol. 1993 Sep;75(3):1256-62.

72. Sackner MA, Landa J, Hirsch J, Zapata A. Pulmonary effects of oxygen breathing. A 6-hour study in normal men. Ann Intern Med. 1975 Jan;82(1):40-3.

73. Van De Water JM, Kagey KS, Miller IT, Parker DA, O'Connor NE, Sheh JM, et al. Response of the lung to six to 12 hours of 100 per cent oxygen inhalation in normal man. N Engl J Med. 1970 Sep 17;283(12):621-6.

74. Yoo JH, Erzurum SC, Hay JG, Lemarchand P, Crystal RG. Vulnerability of the human airway epithelium to hyperoxia. Constitutive expression of the catalase gene in human bronchial epithelial cells despite oxidant stress. J Clin Invest. 1994 Jan;93(1):297-302.

75. Comhair SA, Thomassen MJ, Erzurum SC. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O(2) or cigarette smoke. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Sep;23(3):350-4.

76. Danel C, Erzurum SC, Prayssac P, Eissa NT, Crystal RG, Herve P, et al. Gene therapy for oxidant injury-related diseases: adenovirus-mediated transfer of superoxide dismutase and catalase cDNAs protects against hyperoxia but not against ischemia-reperfusion lung injury. Hum Gene Ther. 1998 Jul 1;9(10):1487-96.

77. Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Aug;19(2):286-92.

78. Horowitz S. Pathways to cell death in hyperoxia. Chest. 1999 Jul;116(1 Suppl):64S-7S.

79. Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Mantell L, Fein AM, Horowitz S. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. J Biol Chem. 1996 Jun 21;271(25):15182-6.

80. Franek WR, Horowitz S, Stansberry L, Kazzaz JA, Koo HC, Li Y, et al. Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells. J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):569-75.

81. Romashko J, 3rd, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, et al. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells. Free Radic Biol Med. 2003 Oct 15;35(8):978-93.

82. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. Ann N Y Acad Sci. 2003 Dec;1010:405-16.

83. Mantell LL, Horowitz S, Davis JM, Kazzaz JA. Hyperoxia-induced cell death in the lung--the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation. Ann N Y Acad Sci. 1999;887:171-80.

84. Zheng S, De BP, Choudhary S, Comhair SA, Goggans T, Slee R, et al. Impaired innate host defense causes susceptibility to respiratory virus infections in cystic fibrosis. Immunity. 2003 May;18(5):619-30.

85. Wang X, Ryter SW, Dai C, Tang ZL, Watkins SC, Yin XM, et al. Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. J Biol Chem. 2003 Aug 1;278(31):29184-91.

86. Franek WR, Morrow DM, Zhu H, Vancurova I, Miskolci V, Darley-Usmar K, et al. NF-kappaB protects lung epithelium against hyperoxia-induced nonapoptotic cell death-oncosis. Free Radic Biol Med. 2004 Nov 15;37(10):1670-9.

87. McGrath SA. Induction of p21WAF/CIP1 during hyperoxia. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Feb;18(2):179-87.

88. Clement A, Henrion-Caude A, Besnard V, Corroyer S. Role of cyclins in epithelial response to oxidants. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S81-4.

89. Campian JL, Gao X, Qian M, Eaton JW. Cytochrome C oxidase activity and oxygen tolerance. J Biol Chem. 2007 Apr 27;282(17):12430-8.

90. Campian JL, Qian M, Gao X, Eaton JW. Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):46580-7.

91. Pagano A, Donati Y, Metrailler I, Barazzone Argiroffo C. Mitochondrial cytochrome c release is a key event in hyperoxia-induced lung injury: protection by cyclosporin A. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Feb;286(2):L275-83.

92. Waxman AB, Einarsson O, Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB, Johnston R, et al. Targeted lung expression of interleukin-11 enhances murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation. J Clin Invest. 1998 May 1;101(9):1970-82.

93. Wang J, Chen Q, Corne J, Zhu Z, Lee CG, Bhandari V, et al. Pulmonary expression of leukemia inhibitory factor induces B cell hyperplasia and confers protection in hyperoxia. J Biol Chem. 2003 Aug 15;278(33):31226-32.

94. La pollution atmosphérique d'origine automobile et la santé publique - Bilan de 15 ans de recherche internationale. Société française de santé publique Collection santé et société. 1996;4:1-251.

95. Rusznak C, Devalia JL, Wang J, Davies RJ. Pollution-induced airway disease and the putative underlying mechanisms. Clin Rev Allergy Immunol. 1997 Summer;15(2):205-17.

96. Devalia JL, Bayram H, Rusznak C, Calderon M, Sapsford RJ, Abdelaziz MA, et al. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. Allergy. 1997;52(38 Suppl):45-51; discussion 7-8.

97. Peden DB. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. Allergy. 1997;52(38 Suppl):37-44; discussion 57-8.

98. Chambellan A, Crestani B, Aubier M. Pollution atmosphérique et environnementale et pathologie respiratoire. Encyclopédie Médico Chirurgicale (Elsevier, Paris) AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine. 2003;6-0933:6p.

99. ADEME et ministère de l'environnement. La qualité de l'air en France. Données et références. Paris 1995.

100. Bonay M, Aubier M. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires allergiques. médecine/sciences. 2007;23:187-92.

101. Nel A. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. Science. 2005 May 6;308(5723):804-6.

102. Chambellan A, Crestani B, Soler P. Diesel particles and allergy: cellular mechanisms. Allerg Immunol. 2000;32(2):43-8.

103. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires. médecine/sciences. 2007;23:497-501.

104. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. J Biol Chem. 2003 Dec 12;278(50):50781-90.

105. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. Chest. 2000 May;117(5 Suppl 1):303S-17S.

106. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Aug;156(2 Pt 1):341-57.

107. Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking, emphysema, and damage to alpha 1-proteinase inhibitor. Am J Physiol. 1994 Jun;266(6 Pt 1):L593-611.

108. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 2000 Jul 27;343(4):269-80.

109. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? Trends Mol Med. 2001 Feb;7(2):55-62.

110. Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Feb 27;315(1):240-5.

111. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 2005 May 12;352(19):1967-76.

112. Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. Lancet. 2004 Feb 28;363(9410):731-3.

113. Barnes P. Cells and mediators of chronic obstructive pulmoray disease. Eur Respir Mon. 2006;38:130-58.

114. Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, et al. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 25;99(13):8921-6.

115. Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S58-65.

116. Dow L, Tracey M, Villar A, Coggon D, Margetts BM, Campbell MJ, et al. Does dietary intake of vitamins C and E influence lung function in older people? Am J Respir Crit Care Med. 1996 Nov;154(5):1401-4.

117. Hu G, Cassano PA. Antioxidant nutrients and pulmonary function: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). Am J Epidemiol. 2000 May 15;151(10):975-81.

118. Pilette C, Durham SR, Vaerman JP, Sibille Y. Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A? Proc Am Thorac Soc. 2004;1(2):125-35.

119. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev. 2004 Dec;56(4):515-48.

120. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Supplementary oxygen in healthy subjects and those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. Thorax. 2004 Dec;59(12):1016-9.

121. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Sep;162(3 Pt 1):1175-7.

122. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007 Dec;120(6):1233-44; quiz 45-6.

123. Chan RC, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoe K, Lee JJ, et al. Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. J Allergy Clin Immunol. 2006 Aug;118(2):455-65.

124. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. Faseb J. 1998 Aug;12(11):929-37.

125. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jul;160(1):216-20.

126. Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2008 Feb;8(1):49-56.

127. Kelly FJ, Mudway I, Blomberg A, Frew A, Sandstrom T. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. Lancet. 1999 Aug 7;354(9177):482-3.

128. Fitzpatrick AM, Teague WG, Holguin F, Yeh M, Brown LA. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. J Allergy Clin Immunol. 2009 Jan;123(1):146-52 e8.

129. Dut R, Dizdar EA, Birben E, Sackesen C, Soyer OU, Besler T, et al. Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma. Allergy. 2008 Dec;63(12):1605-9.

130. Yang IA, Fong KM, Zimmerman PV, Holgate ST, Holloway JW. Genetic susceptibility to the respiratory effects of air pollution. Thorax. 2008 Jun;63(6):555-63.

131. D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M. Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. Eur Respir J. 2002 Sep;20(3):763-76.

132. Gaston B, Sears S, Woods J, Hunt J, Ponaman M, McMahon T, et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. Lancet. 1998 May 2;351(9112):1317-9.

133. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. Eur Respir J. 2005 Mar;25(3):552-63.

134. See H, Wark P. Innate immune response to viral infection of the lungs. Paediatr Respir Rev. 2008 Dec;9(4):243-50.

135. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. J Exp Med. 2005 Mar 21;201(6):937-47.

136. Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, et al. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. J Clin Invest. 2003 Jun;111(12):1863-74.

137. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. Pharmacol Rev. 1998 Dec;50(4):515-96.

138. Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. Eur Respir J. 2008 Oct;32(4):1068-81.

139. Nadel JA. Innate immune mucin production via epithelial cell surface signaling: relationship to allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007 Feb;7(1):57-62.

140. Siddiqui S, Martin JG. Structural aspects of airway remodeling in asthma. Curr Allergy Asthma Rep. 2008 Nov;8(6):540-7.

141. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. Lancet. 2008 Sep 20;372(9643):1107-19.

142. Sagel SD, Kapsner R, Osberg I, Sontag MK, Accurso FJ. Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Oct 15;164(8 Pt 1):1425-31.

143. Rao S, Grigg J. New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 2006 Sep;91(9):786-8.

144. Verhaeghe C, Delbecque K, de Leval L, Oury C, Bours V. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. J Cyst Fibros. 2007 Jul;6(4):304-8.

145. Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, et al. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. Biochem Pharmacol. 2007 Jun 15;73(12):1982-94.

146. Verhaeghe C, Tabruyn SP, Oury C, Bours V, Griffioen AW. Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 May 11;356(3):745-9.

147. Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. Eur Respir J. 1996 Feb;9(2):334-9.

148. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. Am J Physiol. 1998 Jul;275(1 Pt 1):C323-6.

149. Hudson VM. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. Free Radic Biol Med. 2001 Jun 15;30(12):1440-61.

150. Kettle AJ, Chan T, Osberg I, Senthilmohan R, Chapman AL, Mocatta TJ, et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2004 Dec 15;170(12):1317-23.

151. Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. Am J Physiol. 1999 Jul;277(1 Pt 1):L113-8.

152. Shapiro BL. Mitochondrial dysfunction, energy expenditure, and cystic fibrosis. Lancet. 1988 Jul 30;2(8605):289.

153. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Aug;291(2):C218-30.

154. Boncoeur E, Tabary O, Bonvin E, Muselet C, Fritah A, Lefait E, et al. Oxidative stress response results in increased p21WAF1/CIP1 degradation in cystic fibrosis lung epithelial cells. Free Radic Biol Med. 2006 Jan 1;40(1):75-86.

155. Cannon CL, Kowalski MP, Stopak KS, Pier GB. Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Aug;29(2):188-97.

156. Elphick HE, Demoncheaux EA, Ritson S, Higenbottam TW, Everard ML. Exhaled nitric oxide is reduced in infants with cystic fibrosis. Thorax. 2001 Feb;56(2):151-2.

157. Zheng S, Xu W, Bose S, Banerjee AK, Haque SJ, Erzurum SC. Impaired nitric oxide synthase-2 signaling pathway in cystic fibrosis airway epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Aug;287(2):L374-81.

158. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. Chest. 2009 Feb;135(2):505-12.

159. Button B, Boucher RC. Role of mechanical stress in regulating airway surface hydration and mucus clearance rates. Respir Physiol Neurobiol. 2008 Nov 30;163(1-3):189-201.

160. Williams OW, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey BF, Evans CM. Airway mucus: From production to secretion. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 May;34(5):527-36.

161. Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 16;96(6):3081-6.

162. Burgel PR, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. Thorax. 2007 Feb;62(2):153-61.

163. Burgel PR, Nesme-Meyer P, Chanez P, Caillaud D, Carre P, Perez T, et al. Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subjects. Chest. 2009 Apr;135(4):975-82.

164. Rojas R, Apodaca G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Dec;3(12):944-55.

165. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. Am Rev Respir Dis. 1989 Aug;140(2):531-54.

166. Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. Mutat Res. 2005 Nov 11;579(1-2):58-80.

167. Morcillo EJ, Estrela J, Cortijo J. Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants. Pharmacol Res. 1999 Nov;40(5):393-404.

168. Lee PJ, Choi AM. Pathways of cell signaling in hyperoxia. Free Radic Biol Med. 2003 Aug 15;35(4):341-50.

169. Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogenactivated protein kinases in lung epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Jun;34(6):666-9.

170. Allen GL, Menendez IY, Ryan MA, Mazor RL, Wispe JR, Fiedler MA, et al. Hyperoxia synergistically increases TNF-alpha-induced interleukin-8 gene expression in A549 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Feb;278(2):L253-60.

171. Rahman I, Mulier B, Gilmour PS, Watchorn T, Donaldson K, Jeffery PK, et al. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. Biochem Pharmacol. 2001 Sep 15;62(6):787-94.

172. Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, et al. Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. Biol Chem. 1997 Nov;378(11):1237-45.

173. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Nov;281(5):L1037-50.

174. Stein B, Baldwin AS, Jr., Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P. Crosscoupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. Embo J. 1993 Oct;12(10):3879-91.

175. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alphainduced cell death. Science. 1996 Nov 1;274(5288):782-4.

176. Bhandari V, Elias JA. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. Free Radic Biol Med. 2006 Jul 1;41(1):4-18.

177. Zaher TE, Miller EJ, Morrow DM, Javdan M, Mantell LL. Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonary epithelial cells. Free Radic Biol Med. 2007 Apr 1;42(7):897-908.

178. Abate C, Patel L, Rauscher FJ, 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNAbinding activity in vitro. Science. 1990 Sep 7;249(4973):1157-61.

179. Janssen YM, Matalon S, Mossman BT. Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. Am J Physiol. 1997 Oct;273(4 Pt 1):L789-96.

180. Reddy SP, Mossman BT. Role and regulation of activator protein-1 in toxicantinduced responses of the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Dec;283(6):L1161-78. 181. Janssen YM, Heintz NH, Marsh JP, Borm PJ, Mossman BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994 Nov;11(5):522-30.

182. Otterbein LE, Choi AM. The saga of leucine zippers continues: in response to oxidative stress. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Feb;26(2):161-3.

183. Lee HY, Dawson MI, Claret FX, Chen JD, Walsh GL, Hong WK, et al. Evidence of a retinoid signaling alteration involving the activator protein 1 complex in tumorigenic human bronchial epithelial cells and non-small cell lung cancer cells. Cell Growth Differ. 1997 Mar;8(3):283-91.

184. Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. Cancer Res. 1996 Jan 15;56(2):305-15.

185. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med. 1996 Oct;74(10):589-607.

186. Mantell LL, Lee PJ. Signal transduction pathways in hyperoxia-induced lung cell death. Mol Genet Metab. 2000 Sep-Oct;71(1-2):359-70.

187. Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van der Velden PA, et al. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2004 Mar 15;36(6):782-801.

188. Perkowski S, Sun J, Singhal S, Santiago J, Leikauf GD, Albelda SM. Gene expression profiling of the early pulmonary response to hyperoxia in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Jun;28(6):682-96.

189. Cho HY, Reddy SP, Debiase A, Yamamoto M, Kleeberger SR. Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury. Free Radic Biol Med. 2005 Feb 1;38(3):325-43.

190. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Jr., et al. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. J Biol Chem. 1998 Jun 12;273(24):15148-56.

191. Xu W, Comhair SA, Zheng S, Chu SC, Marks-Konczalik J, Moss J, et al. STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Jul;285(1):L137-48.

192. Comhair SA, Bhathena PR, Dweik RA, Kavuru M, Erzurum SC. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. Lancet. 2000 Feb 19;355(9204):624.

193. Swynghedauw B, Mansier P. Physiologie, une science qui se réveille. médecine/sciences. 1999;15:868-72.

194. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. 2000 May;25(1):25-9.

195. Barrell D, Dimmer E, Huntley RP, Binns D, O'Donovan C, Apweiler R. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database issue):D396-403.

196. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. Bioinformatics. 2009 Jan 15;25(2):288-9.

197. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 8;95(25):14863-8.

198. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24;98(9):5116-21.

199. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. Nat Rev Genet. 2001 Jun;2(6):418-27.

200. Imbeaud S, Auffray C. 'The 39 steps' in gene expression profiling: critical issues and proposed best practices for microarray experiments. Drug Discov Today. 2005 Sep 1;10(17):1175-82.

201. Auffray C, Chen Z, Hood L. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare. Genome Med. 2009 Jan 20;1(1):2.

202. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. Nat Genet. 2000 Mar;24(3):236-44.

203. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.

204. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. N Engl J Med. 2009 Feb 19;360(8):790-800.

205. Ntzani EE, Ioannidis JP. Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment. Lancet. 2003 Nov 1;362(9394):1439-44.

206. Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, et al. Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Feb 1;167(3):438-43.

207. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. N Engl J Med. 2006 Jun 8;354(23):2463-72.

208. Ho YS, Dey MS, Crapo JD. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. Am J Physiol. 1996 May;270(5 Pt 1):L810-8.

209. Ho YS. Transgenic and knockout models for studying the role of lung antioxidant enzymes in defense against hyperoxia. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Dec 15;166(12 Pt 2):S51-6.

210. Rahman I, Bel A, Mulier B, Donaldson K, MacNee W. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. Am J Physiol. 1998 Jul;275(1 Pt 1):L80-6.

211. Comhair SA, Bhathena PR, Farver C, Thunnissen FB, Erzurum SC. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. Faseb J. 2001 Jan;15(1):70-8.

212. Strange K. The end of "naive reductionism": rise of systems biology or renaissance of physiology? Am J Physiol Cell Physiol. 2005 May;288(5):C968-74.

213. Sugiura H, Komaki Y, Koarai A, Ichinose M. Nitrative stress in refractory asthma. J Allergy Clin Immunol. 2008 Feb;121(2):355-60.

214. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. Faseb J. 1997 Jun;11(7):526-34.

215. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature. 2003 Dec 18;426(6968):895-9.

216. Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. médecine/sciences. 2000;16:623-9.

217. Wong HR, Menendez IY, Ryan MA, Denenberg AG, Wispe JR. Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. Am J Physiol. 1998 Oct;275(4 Pt 1):L836-41.

218. Zeitlin PL, Gail DB, Banks-Schlegel S. Protein processing and degradation in pulmonary health and disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Nov;29(5):642-5.

219. Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet. 1993;27:437-96.

220. Allen CB, White CW. Glucose modulates cell death due to normobaric hyperoxia by maintaining cellular ATP. Am J Physiol. 1998 Jan;274(1 Pt 1):L159-64.

221. Aulak KS, Koeck T, Crabb JW, Stuehr DJ. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Jan;286(1):H30-8.

222. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heatshock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. Nat Cell Biol. 2001 Sep;3(9):839-43.

223. Dweik RA, Comhair SA, Gaston B, Thunnissen FB, Farver C, Thomassen MJ, et al. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2622-7.

224. Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar;163(4):854-8.

225. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, et al. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5970-80.

226. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. J Clin Invest. 1998 Feb 1;101(3):660-6.

227. Dweik RA. The lung in the balance: arginine, methylated arginines, and nitric oxide. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Jan;292(1):L15-7.

228. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 15;92(17):7809-13.

229. Sanders SP. Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Aug;21(2):147-9.

230. Grasemann H, Ratjen F. Cystic fibrosis lung disease: the role of nitric oxide. Pediatr Pulmonol. 1999 Dec;28(6):442-8.

231. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin Exp Immunol. 1998 Aug;113(2):147-56.

232. Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. J Biol Chem. 1998 Aug 28;273(35):22201-8.

233. Taylor BS, Geller DA. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. Shock. 2000 Jun;13(6):413-24.

234. Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J. Analysis of the cytokinestimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jul 30;248(3):871-8.

235. Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 17;98(15):8638-43.

236. Guo FH, Uetani K, Haque SJ, Williams BR, Dweik RA, Thunnissen FB, et al. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. J Clin Invest. 1997 Aug 15;100(4):829-38.

237. Xu W, Zheng S, Dweik RA, Erzurum SC. Role of epithelial nitric oxide in airway viral infection. Free Radic Biol Med. 2006 Jul 1;41(1):19-28.

238. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science. 2002 Apr 19;296(5567):550-3.

239. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol. 2003 Sep;5(9):834-9.

240. Kulkarni A, Das KC. Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 May;294(5):L998-L1006.

241. Barlow CA, Kitiphongspattana K, Siddiqui N, Roe MW, Mossman BT, Lounsbury KM. Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells. Apoptosis. 2008 May;13(5):681-92.

242. Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, Zhu Z, Nedrelow JH, Chupp GL, et al. Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. Nat Med. 2006 Nov;12(11):1286-93.

243. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J Clin Invest. 2000 Dec;106(11):1311-9.

244. Jin Y, Kim HP, Cao J, Zhang M, Ifedigbo E, Choi AM. Caveolin-1 regulates the secretion and cytoprotection of Cyr61 in hyperoxic cell death. Faseb J. 2009 Feb;23(2):341-50.

MECANISMES DE LA REPONSE DE L'EPITHELIUM DES VOIES AERIENNES A L'AGRESSION - Approche génomique de la réponse à l'hyperoxie et rôle de c-fos dans l'expression de la NO synthase inductible (NOS2)

L'épithélium des voies aériennes représente un modèle d'adaptation unique à l'environnement oxydant. Nous avons étudié les mécanismes de la réponse à l'hyperoxie en exposant des sujets sains à de l'oxygène pur pendant 12 h et obtenu les cellules épithéliales par brossage bronchique. L'analyse du transcriptome a été effectuée en utilisant des puces pangénomiques. Nous confirmons l'implication précoce des voies responsables du maintien de la fonction redox et du cycle cellulaire. Nous précisons la place centrale de HSP70 et du système ubiquitine-protéasome dans le maintien de l'homéostasie des protéines et du métabolisme énergétique cellulaire.

Le monoxyde d'azote (NO) occupe une place particulière dans les mécanismes de défense antioxydants. Sa synthèse au niveau de l'épithélium des voies aériennes est principalement sous le contrôle de la NO synthase inductible (NOS2). Nous avons étudié l'importance de la voie de signalisation redox AP-1 (composé des facteurs de transcription c-Fos/c-Jun) dans l'expression de NOS2. En utilisant la technique de l'interférence ARN et la lignée épithéliale respiratoire A549, des clones ont été obtenus par transfection stable contenant une séquence c-Fos siRNA (FOSi) et une séquence siRNA aléatoire (FOSscr) pour contrôle. Nous avons observé une forte baisse de l'expression de NOS2 par FOSi comparée à FOSscr, qui était associée au niveau fonctionnel à une baisse de fixation du complexe AP-1 sur le promoteur de NOS2 par gel retard (EMSA).

Ces travaux montrent l'importance de HSP70 et du système ubiquitine-protéasome dans la réponse épithéliale respiratoire précoce à l'hyperoxie (Chambellan et coll., Am J Respir Cell Mol Biol 2006) et le rôle pivot de c-Fos dans l'expression de NOS2 (Chambellan et coll., Nitric Oxide 2009).

<u>Mots clés:</u> voies aériennes ; génomique fonctionnelle ; hyperoxie ; protéasome ; ubiquitine ; NO synthase ; c-Fos ; AP-1 ; ARN interférence.

# MECHANISMS OF THE AIRWAY EPITHELIUM RESPONSE TO INJURY - A genomic approach of the response to hyperoxia and role of c-fos in the expression of inducible NO synthase (NOS2)

The airway epithelium represents a unique adaptive model to the oxidative environment. We studied the hyperoxia response mechanisms by exposing healthy subjects to pure oxygen for 12 h and obtained the epithelial cells by brushing. The transcriptome analysis was performed by using pangenomic DNA microarrays. We confirmed the early involvement of redox and cell cycle pathways. We specify the importance of HSP70 and the ubiquitin-proteasome system in the maintenance of protein homeostasis and energy production.

Nitric oxide plays a peculiar role among the antioxidant defense mechanisms. It is mainly produced by inducible NOS (NOS2) present in the airway epithelial cells. We investigated the role of the redox signaling pathway AP-1 (composed by transcriptional factors c-Fos/c-Jun) in NOS2 expression. By using RNA interference technology and A549 cell line, we obtained clones stably transfected with a c-Fos siRNA sequence (FOSi) and a scrambled siRNA sequence (FOSscr) as control. We observed a large decrease in NOS2 expression in FOSi compared to FOSscr, which was associated at the functional level to a decrease of the AP-1 binding complex on the NOS2 promoter on EMSA.

These results highlight the importance of HSP70 and the ubiquitinproteasome system in the airway epithelial response to hyperoxia (Chambellan et al., Am J Respir Cell Mol Biol 2006) and the pivotal role of c-Fos in NOS2 expression (Chambellan et al., Nitric Oxide 2009).

<u>Keywords:</u> airways; gene expression; hyperoxia; proteasome; ubiquitin; nitric oxide synthase; c-Fos; activator protein-1; RNA interference.

## CHAMBELLAN Arnaud

UMR 915 ; L'institut du thorax ; Faculté de médecine ; Université de Nantes

1 rue Gaston Veil, 44035 NANTES cedex