

Effets et mécanismes de la modulation de l'activité de la télomerase sur la transformation myofibroblastique induite par l'exposition au TGF-beta1

François Pellegrin

▶ **To cite this version:**

François Pellegrin. Effets et mécanismes de la modulation de l'activité de la télomerase sur la transformation myofibroblastique induite par l'exposition au TGF-beta1. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-02066597

HAL Id: dumas-02066597

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02066597

Submitted on 13 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017-2018 Thèse n° 110

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par **Pellegrin François**

Née le 8 novembre 1993 à Bordeaux

Le 7 novembre 2018 à Bordeaux

EFFETS ET MECANISMES DE LA MODULATION DE L'ACTIVITE DE LA TELOMERASE SUR LA TRANSFORMATION MYOFIBROBLASTIQUE INDUITE PAR L'EXPOSITION AU TGF-BETA1

Sous la direction de : Dr. Isabelle Passagne

Membres du jury

Pr. Marie Claude Saux	Président
Pr. Roger Marthan	Examinateur
Dr. Arnaud Courtois	Examinateur
Dr. Stéphane Bouchet	Examinateur

REMERCIEMENTS

Au Professeur Marie Claude Saux, pour avoir accepté de présider et d'évaluer ma thèse de pharmacie. Merci pour sa disponibilité et ses conseils attentionnés tout au long de mes études.

Au Docteur Isabelle Passagne, pour avoir accepté de me diriger dans la rédaction de cette thèse. Merci pour son temps, ses conseils et sa grande aide tout au long de mes études.

Au Docteur Stéphane Bouchet, pour avoir gentiment accepté de participer à ce jury de thèse et pour le temps passé à évaluer mon travail.

Au Professeur Roger Marthan, pour avoir également accepté de faire partie de ce jury, pour son temps dans l'examen de ma thèse, ses conseils et sa gentillesse.

Au Docteur Sophie Lanone, pour m'avoir fait confiance pour intégrer son équipe et m'avoir confié la réalisation de ce sujet de recherche.

A mes frères, pour avoir partagé avec moi ces années d'études en les rendant plus agréables.

A mes parents pour m'avoir soutenu, motivé, encouragé, corrigé et supporté pendant toutes mes études et pour leur grande aide dans la relecture et la mise en forme de cette thèse.

Table des matières

Liste des abbréviations 6

Liste des figures 8

Liste des tables 9

PREAMBULE 10

I. LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE 12

A. Généralités 12

1. Définitions 12

2. Epidémiologie 15

a) Prévalence 15

b) Morbi-mortalité 16

c) Impacts socio-économiques 17

3. Facteurs de risque 17

a) Tabagisme 18

b) Facteurs de risques non tabagiques 19

c) Facteurs génétiques 24

4. Diagnostic 25

5. Traitement 26

B. Remodelage bronchiolaire dans la BPCO 28

1. Fibrose péri-bronchique 29

2. Caractéristiques des myofibroblastes 29

3. Origine des myofibroblastes 30

C. Pathogénie du remodelage bronchique 33

1. Rôle de l'Inflammation 33

2. Rôle de la cytokine non inflammatoire TGF-β1 34

TGF-β : Généralités 35

3. Rôle de la sénescence cellulaire 39

4. Rôle du stress oxydant 41

a) Système pro-oxydant : NADPH oxydase (Nicotamide Adénine Dinucléotide PHosphate-oxydases ou NOX) 42

b) Systèmes Anti-oxydants 43

c) Stress oxydant et fibrose péri-bronchique 45

II. LA TELOMERASE 49

A. Généralités 49

B. Fonctions télomériques de la telomérase 51

C. Fonctions extra-télomériques de la télomérase 51
D. Télomérase et pathologies fibrosantes 52
1. Mutations de la télomérase et pathologies fibrosantes 52
2. Modulations de la télomérase et pathologies fibrosantes 53
E. Modulation pharmacologique de la télomérase 55
1. Activation de la protéine télomérase : TA-65 55
a) Effets sur la longueur des télomères (anti-vieillissement) du TA-65 56
b) Effets immunorégulateurs du TA-65. 56
2. Inhibition de la protéine télomérase : Imetelstat 57
III. Travail expérimental 59
A. Résultats préliminaires 59
B. OBJECTIFS DE L'ETUDE (Figure 16) 60
1. Hypothèses 60
2. Objectifs 60
C. Matériels et méthodes 61
1. Isolement des fibroblastes 61
A) Fibroblastes bronchiques murins 61
b) Fibroblastes embryonnaire murins (d'origine pulmonaire) en lignée : MEF 63
c) Phénotypage des fibroblastes 63
d) Survie des fibroblastes en culture en présence des molécules activatrice (TA-65) et inhibitrice (Imetelstat) : choix de doses in vitro, Dosage MTT 64
2. Détection de proteines d'intérêt dans les cultures de fibroblastes 67
a) Immunocytochimie (ICC) 67
b) Western Blot (WB) 69
c) Sonde DCFH2-DA et MitoSOX 70
3. Détection des activités Enzymatiques 70
a) Activité Catalase 70
b) Activité Glutathion Peroxydase GPx 71
c) Activité Télomérase 71
4. Analyses Statistiques 71
D. RESULTATS 72
1. Le TA-65 augmente l'activité de la protéine télomérase dans les fibroblastes embryonnaires murins. 72
2. Le TA-65 prévient la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-β *in vitro*. 73
3. Le TA-65 diminue la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les fibroblastes exposés in vitro au TGF-β. 74

4. Influence de l'activité Télomérase sur les systèmes enzymatiques pro- et anti-oxydant 75
a) Expression des NADPH oxydases et modulation de l'activité télomérase 75
b) Expression et activité de la glutathion peroxydase 1 et modulation de l'activité télomérase 78
c) Expression et activité de la catalase et modulation de l'activité télomérase 79
d) Expression et activité de la SOD et modulation de l'activité télomérase 80
IV. Discussion 81
A. Discussion du travail expérimental 81
1. Discussion des conditions expérimentales 81
a) Cultures cellulaires 81
b) Modulation de l'activité de la télomerase 81
2. Discussion des résultats 82
3. Limites de notre travail 83
B. Perspectives 84
1. La télomérase, facteur clé du vieillissement global 84
2. Régulation de la télomérase dans le cancer 85
3. Cibles thérapeutiques de la télomérase 86
a) Intérêt du TA-65 dans l'activation de la télomérase 86
b) Intérêt de l'Imetelstat dans l'inhibition de la télomérase 87
4. Effets extra-télomériques de la télomérase 88
V. Conclusion 89
VI. BIBLIOGRAPHIE 90

Liste des abbréviations

ADNmt : ADN mitochondrial

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : activator protein 1

ATM : ataxia telangiectasia mutated

AZT : azidothimidine

bFBF : basic fibroblast growth factor

BOLD : burden of obstructive lung disease

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

BRG1 : brahm-related gene-1

BSA : bovine serum albumin

CEB : cellules épithéliales bronchiques

Complexe PAP : complexe peroxydase-anti-peroxydase

COPD : chronic obstructive pulmonary disease

CS : cigarette smoke

CTGF : connective tissue growth factor

CXCL : CXC chemokine ligand

CVF : capacité vitale force

DAB : dyskératose congénitale

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA : desoxyribonucleic acid

EFR : épreuves fonctionnelles respiratoires

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

EMT : epithelial-mesenchymal transition

ERK : extracellular signal-regulated

FGF : facteur de croissance des fibroblastes

FPI : fibrose pulmonaire idiopathique

GOLD : global initiative for chronic obstructive lung disease

GSH : glutathion s-transferases

HE : hematoxylin-eosin

IL : Interleukine

IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale

JNK : jun n-terminal kinases

KO : knock out

LAP : latency-associated peptide

LLC : large latent complex

LPS : lipopolysaccharide

LTGF-β : latent TGF-β

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MEC : matrice extracellulaire

MMPS : métallo protéinases matricielles

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-kB : facteur nucléaire kappa B

NMDA : N-méthyl-D-aspartique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : phosphate buffered saline

PDGF : platelet derived growth factor

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

RT : reverse transcriptase

SASP : senescence-associated secretory phenotype

SPLF : société de pneumologie de langue française

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TERC : telomerase RNA component

TERT : telomerase reverse transcriptase

TGF-β : transforming growth factor beta

TNF-α : tumor necrosis factor α

TRAP : telomerase repeat amplification protocol

TVO : trouble ventilatoire obstructif

TβR : récepteur spécifique du TGFβ

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEMS : volume expiratoire maximal seconde

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

α-SMA : alpha smooth muscle actin

Liste des figures

Figure 1. Lésions anatomiques dans la BPCO (coloration HES) d'après référence (3). 14
Figure 2. Prévalence de la BPCO (stade II et III ou plus) selon le sexe et le site (29). 16
Figure 3. Différents types de combustibles de la biomasse (46) 21
Figure 4. Déclin du VEMS avec l'âge (adaptée de Fletcher) (37, 49)..... 22
Figure 5. Modifications histologiques des bronchioles après exposition à la fumée de cigarette (16) 28
Figure 6. Principaux composants de la voie canonique (Smad) du TGF-β (112)..... 36
Figure 7. Rôle central du TGF-β dans la fibrogénèse pulmonaire (84)..... 38
Figure 8. Stress oxydant et BPCO (128). 46
Figure 9. Cellules épithéliales bronchiques et stress oxydant (143) 46
Figure 10. Structure d'un télomère (155). 50
Figure 11. Composants essentiels de la télomérase (155)..... 50
Figure 12. Coloration HES bronchique (A et C) et immunomarquage α-SMA (B et D) 60
Figure 13. Objectifs..... 61
Figure 14. Protocole d'isolement et de culture primaire de fibroblastes bronchiques murins..... 62
Figure 15. Tests de cytotoxicité du TA-65 et de l'Imetelstat sur des fibroblastes murins. 65
Figure 16. Protocole de traitement des fibroblastes bronchiques murins/MEF..... 66
Figure 17. Mesure de l'activité télomérase in vitro par la méthode TRAP dans les fibroblastes embryonnaires murins (n=2 par groupe) 72
Figure 18. Effet de la modulation de l'activité télomérase sur la différenciation myofibroblastique (marquage αSMA en immunocytochimie) dans des fibroblastes embryonnaires murins exposés au TGF-β ; n = 1 passage, Grossissement X200, 4 photos par conditions. 73
Figure 19 Mesure des ROS totaux. n= 2 passages différents, réalisé 2 fois sur chaque passage 74
Figure 20. Immunomarquage en ICC (A1, B1, C1) et expression protéique en WB (A2, B2, C2) de NOX1 (A), de NOX 2 (B) et NOX4 (C) dans les fibroblastes embryonnaire murins +/- TA-65 , +/-Imetelstat, +/- TGF-β. grossissement X20, 4 clichés par condition, n = 2 passages différents, ICC et WB réalisés 1 x/passage. 75
Figure 21. Immunomarquage en ICC (A), expression protéique en WB (B) et activité (C) de la Glutathion Peroxydase 1 dans les fibroblastes embryonnaires murins +/- TA-65 , +/-Imetelstat, +/- TGF-β. grossissement X20, 4 clichés par condition,, n = 2 passages différents, ICC et WB réalisé 1x/passage ; B et C n, activité 2x/passage. 78
Figure 22. Immunomarquage en ICC (A), expression protéique en WB (B) et activité (C) de la catalase dans les fibroblastes embryonnaires murins (+ TA-65, + Imetelstat, +TA-65 + Imetelstat, +/- TGF-β. ; **A** : grossissement X20, 8 clichés/condition, n=2 passages, ICC et WB réalisé 1x/passage ; activité réalisés 2x/passage. 79

Liste des tables

Tableau 1. Facteurs de risque de la BPCO selon les recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française (20). 18
Tableau 2. Modifications structurales de la paroi des bronchioles dans la BPCO, adaptées de Baraldo et de Skold (5,67). Estimation semi-quantitative d'importance croissante : (+), +, ++, +++ 28
Tableau 3. Caractérisation des fibroblastes en immunocytochimie 63
Tableau 4. Récapitulatif des anticorps utilisés en ICC et en WB pour la caractérisation cellulaire et l'étude des systèmes anti-oxydants, dilution (fournisseur) 68

PREAMBULE

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une préoccupation majeure de santé publique au niveau français et mondial en termes de morbidité, mortalité et dépenses de santé associées (1). Le poids de cette maladie est encore susceptible de croître au cours des 20 prochaines années selon les projections de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (2).

Le tabagisme est le principal facteur de risque de la BPCO. (3, 4).

La BPCO est caractérisée par une obstruction bronchique incomplètement réversible, habituellement associée à une réponse inflammatoire anormale des bronches. Le substratum anatomique de la BPCO inclut deux aspects : le remodelage des petites voies aériennes (ou bronchiolaire) et l'emphysème (4, 5).

Le remodelage des bronches s'effectue majoritairement aux dépens des petites voies aériennes de moins de 2mm. Il est caractérisé par une métaplasie des cellules épithéliales sans épaississement de la membrane basale, une fibrose, une hypertrophie des cellules musculaires lisses. Ces lésions en association avec l'inflammation contribuent à l'épaississement des parois bronchiolaires et au rétrécissement de la lumière bronchique (4).

Bien que la pathogénèse du remodelage bronchiolaire dans la BPCO ne soit que partiellement connue, **l'inflammation pulmonaire chronique**, caractérisée par une infiltration de polynucléaires neutrophiles, de macrophages, de lymphocytes T (CD4, CD8) et B, revêt sans doute une importance majeure (6). D'autres mécanismes ont également été identifiés dans l'initiation et la progression de la maladie tels que le **stress oxydant**, l'apoptose des cellules pulmonaires, la production excessive de TGF-B au niveau des bronchioles et le déséquilibre protéase-antiprotéase de la matrice extracellulaire (7, 8).

Des revues récentes (9) ont suggéré que la **sénescence cellulaire** pourrait constituer un déterminant de nombreuses maladies chroniques dont la BPCO ou la fibrose pulmonaire idiopathique (10). Dans les fibroblastes humains, il a été montré que la sénescence était induite par le stress oxydant via le transforming growth factor-beta (TGF-β) (11). Parmi les fonctions cellulaires de la télomérase indépendantes de la régulation de la longueur des télomères figure la capacité de protection contre le stress oxydant, caractérisée par une réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaire (12,13). Expérimentalement l'absence de télomérase favorise le stress oxydant via une diminution de l'activité catalase (14).

Le **système télomères - télomérase** a été étudié dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et l'emphysème (15). Il est pertinent de s'intéresser à son rôle dans le remodelage des petites voies aériennes de la BPCO induite par la fumée de cigarette (16).

La modulation de l'activité de la télomérase a été étudiée dans un modèle murin de remodelage péribronchiolaire induit par la fumée de cigarette en utilisant le TA-65, extrait de l'astragale (*Astragalus membranaceus*), activateur connu de la télomérase (17) et l'imetelstat, inhibiteur de la télomérase, molécule en développement dans les pathologies néoplasiques hématologiques et bronchiques (18, 19). Dans ce modèle, l'augmentation de l'activité de la télomérase induite par le TA-65 protège les souris de la fibrose peribronchiolaire. Dans cette thèse d'exercice, nous rapporterons un travail expérimental visant à déterminer si l'effet de la télomérase est médié par une protection contre le stress oxydant.

Notre thèse est présentée en trois parties :

Une première partie fait l'état de la **littérature concernant la BPCO**

- Epidémiologie, bases histopathologiques et mécanismes du remodelage bronchiolaire de la BPCO, rôle potentiel du stress oxydant sur la senescence des cellules bronchiques.

Une deuxième partie résume les connaissances sur le **système télomères – télomérase :**

- Télomérase : fonctions, rôle potentiel dans la genèse du remodelage bronchiolaire de la BPCO en particulier sa composante fibrosante, modulation par TA-65 et imetelstat.

La troisième partie rapporte notre **travail de master 2** réalisé sous la co-direction des docteurs Sophie LANONE (Directeur de Recherche (DR2) à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM) et Frédéric Schlemmer (Pneumologue à l'Hôpital Henri Mondor).

I. LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE

A. Généralités

1. Définitions

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie respiratoire chronique lentement évolutive. Elle est caractérisée par une obstruction ventilatoire habituellement persistante, non complétement réversible et progressive. Cette maladie est associée à une réponse inflammatoire pulmonaire anormale aux particules ou gaz nocifs. La fumée de cigarette constitue la principale cause de développement de la BPCO. Les composants présents dans le tabac agressent l'épithélium bronchique et alvéolaire par contact direct. L'inflammation crée au niveau des voies aériennes induit un épaississement des parois par atrophie des muscles lisses, associé à une hypersécretion de mucus. Cette maladie peut engager le pronostic vital en perturbant le processus normal de la respiration. Les exacerbations et les comorbidités (diminution de la capacité à l'effort, atrophie musculaire, ostéoporose, perte de poids, maladies cardiovasculaires et dépression) contribuent à la sévérité de cette maladie chronique. La BPCO est un problème de santé publique de par sa morbidité et sa mortalité élevées (3).

D'un point de vue clinique : la présence de toux productive quotidienne pendant au moins 3 mois au cours de deux années consécutives reste un terme cliniquement utile pour la définition de la BPCO (3). L'hypersécrétion de mucus existent à la fois dans les voies aériennes proximales et distales. La présence de mucus dans les voies aériennes proximales est associée à la toux et l'expectoration chronique et donc à la bronchite chronique. C'est la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes distales qui contribue à l'obstruction bronchique. Il est important de reconnaître que la toux chronique avec production d'expectoration (bronchite chronique) reste une entité indépendante de la BPCO pouvant précéder ou suivre le développement de la limitation du débit aérien et être associée au développement et/ou à l'accélération de l'obstruction bronchique (3). La bronchite chronique peut exister également chez les patients ayant une spirométrie normale (3).
Progressivement, un essoufflement survient au début à l'effort pour finalement exister au repos. La gravité de la BPCO peut éventuellement être évaluée selon les conditions de survenue de l'essoufflement du patient. Les signes cliniques (toux, expectoration, essoufflement) peuvent se majorer aux différents stades de la maladie et en particulier lors de survenue d'infections broncho-pulmonaires. On parle d'exacerbations. Ces épisodes d'aggravation de l'état respiratoires du patient conduisent souvent à des hospitalisations. La mortalité hospitalière des exacerbations est entre 3 et 10%.

Il faut souligner que la BPCO évolue longtemps sans donner de symptômes. De plus, les premiers symptômes sont peu spécifiques (toux grasses) et sont généralement minimisés par les patients car associés à une conséquence normale du tabagisme.

D'un point de vue fonctionnel respiratoire : la réalisation des explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) permet de diagnostiquer l'obstruction bronchique chronique et de la classer en différents stades de sévérité selon les recommandations GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (3). Le diagnostic de BPCO repose sur la mise en évidence d'un trouble ventilatoire obstructif (TVO) permanent, non complétement réversible (2). La spirométrie est donc l'examen clé pour le diagnostic et le suivi de la BPCO. Ce test permet de mettre en évidence un trouble ventilatoire obstructif persistant après l'administration d'un bronchodilatateur.

Selon la Société de pneumologie de Langue Française (SPLF), la définition du TVO retenue pour le diagnostic de BPCO est un rapport volume expiratoire maximal seconde/capacité vitale forcée (VEMS/CVF) < 0.70 post-bronchodilatateur (2). Le VEMS ou volume expiratoire maximal par seconde correspond au volume d'air expiré pendant la première seconde d'une expiration dite forcée. La capacité vitale forcée (CVF) correspond au volume d'air expulsé avec force jusqu'à un volume résiduel (VR). Le patient doit inspirer profondément et souffler dans le spiromètre le plus rapidement possible tout l'air contenu dans ses poumons. Pour la réalisation de ce test, il est demandé au patient de ne pas fumer au moins 1 heure avant l'examen et de ne pas pratiquer un exercice physique moins de 30 minutes avant l'examen.

Le stade évolutif de la BPCO est évalué par le VEMS post-bronchodilatateur selon la classification GOLD de la sévérité de la limitation du débit aérien (2, 3) :

GOLD 1 (BPCO légère) : VEMS $\geq$ 80% de la valeur prédite

GOLD 2 (BPCO modérée) : VEMS $\leq$ 80% de la valeur prédite

GOLD 3 (BPCO sévère) : VEMS $\leq$ 50% de la valeur prédite

GOLD 4 (BPCO très sévère) : VEMS $\leq$ 30% de la valeur prédite

Le dernier stade de la maladie correspond à des capacités pulmonaires extrêmement limitées avec souvent des effets délétères en dehors de la zone pulmonaire.

Une gazométrie permet être réalisée en complément pour juger de l'efficacité des échanges gazeux (oxygène et gaz carbonique) au niveau des poumons.

D'un point de vu anatomique : la limitation chronique du débit aérien est causée par l'association de la maladie des petites voies aériennes (définies chez l'homme comme celles ayant un diamètre inférieur à 2 mm) communément appelée bronchiolite obstructive (ou remodelage bronchiolaire) et d'une destruction parenchymateuse (emphysème) dont les contributions relatives varient d'une personne à une autre (figure 1) (3).

L'obstruction bronchique qui est visible par un rétrécissement des bronchioles est liée d'un côté lié à un épaississement de la paroi des bronchioles et à la présence de mucus en grande quantité. Au niveau des bronches, le nombre de cellules ciliés est réduit par rapport au nombre de cellules à mucus (cellules caliciformes). La couche musculaire est épaissie par hypertrophie cellulaire. Une fibrose bronchique et péri-bronchiolaire est observable. La fibrose et L'épaississement de la paroi musculaire lisse conduit à une diminution progressive de la lumière bronchique et donc des flux respiratoires.

Dans l'emphysème, une augmentation de la taille des alvéoles pulmonaires est observée suite à la destruction du parenchyme et de la matrice extracellulaire pulmonaire. La destruction des alvéoles s'explique par une dégradation protéolytique du tissu conjonctif et notamment de l'élastine. Les poumons des patients vont perdre de leur élasticité et la mécanique ventilatoire devient moins efficace. C'est le déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase qui est à l'origine de la dégradation excessive des protéines de la matrice extra-cellulaire. On assiste à une diminution de l'expression et de l'activité d'anti protéases et notamment des serpines qui sont fortement impliquées. Leur principal représentant est l'alpha 1-antitrypsine.

Des photographies représentatives de l'atteinte anatomopathologique de la BPCO sont présentées ci-dessous à droite (figure 1). Au niveau des alvéoles, un élargissement des espaces aériens en rapport avec la destruction des parois alvéolaires est observé sans fibrose alvéolaire. Les bronches et les bronchioles sont contractées. La paroi est épaissie du fait d'une fibrose péribronchiolaire.

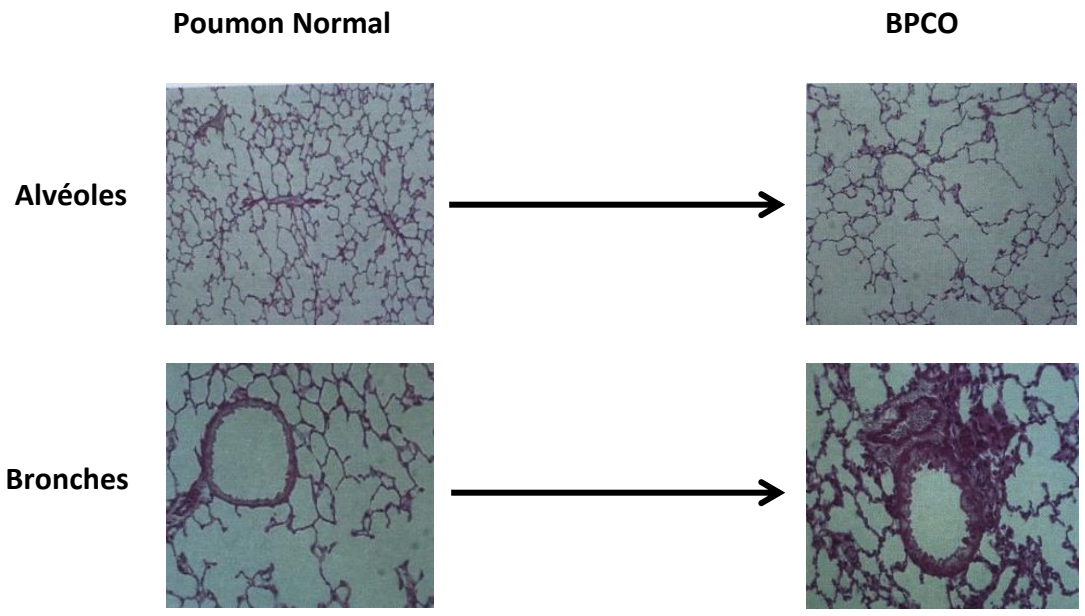


Figure 1. Lésions anatomiques dans la BPCO (coloration HES) d'après référence (3).

2. Epidémiologie

a) Prévalence

Il est difficile d'estimer la prévalence de la BPCO en raison des difficultés liées à la faisabilité des études épidémiologiques sur la BPCO : l'utilisation de spiromètres à large échelle est difficile pour des raisons de disponibilité non pas tant du matériel que des investigateurs qui doivent être formés et expérimentés. Une autre difficulté est la définition de l'obstruction bronchique, variable d'une étude à l'autre. Enfin, les équations nécessaires au calcul des valeurs spirométriques normales sont peu nombreuses chez les sujets âgés et méritent probablement d'être mises à jour (21). La BPCO reste une maladie sous-diagnostiquée (22). Le sous diagnostic s'expliquerait par la banalisation des premiers symptômes évocateurs pour les malades, le caractère silencieux de la maladie à ses débuts et la faible utilisation de la spirométrie pour la mesure de la fonction ventilatoire dans les établissements de soins primaires malgré sa nécessité pour faire le diagnostic de la maladie (22-24). Malgré ces limites, les données internationales et françaises convergent vers une prévalence de la BPCO de 4-10%, 50% des sujets ayant un VEMS encore normal (Stade I), 35% une BPCO de stade II (VEMS entre 50% et 80% de la normale), 15% des BPCO de stade III-IV (VEMS < 50%) (21). La prévalence de la BPCO est estimée à 7.5% en France, 14% au Danemark, 10.2% en Espagne et entre 3.1 et 9.3% aux USA (22, 24-26). En France, elle touche environ 3 millions de personnes dans la population de plus de 45 ans, dont 1 million au moins sont symptomatiques. Il existe peu de données dans les pays en développement (27), mais l'augmentation de la consommation du tabac dans ces pays devrait contribuer très fortement à l'augmentation dans les prochaines décennies de la prévalence de la BPCO (27).

La prévalence de la BPCO montrent des différences selon l'âge, le sexe, le statut tabagique ou socio-économique des individus (20, 23, 24, 28). Ces différences s'expliquent aussi par des variations des critères de « diagnostiques épidémiologiques » renvoyant à des définitions différentes et/ou des stades différents de la BPCO : diagnostic fondé sur les symptômes et/ou l'examen clinique, diagnostic médical rapporté par le malade, confirmé ou pas par le médecin, diagnostic sur la base de la spirométrie ou la combinaison de ces diverses possibilités (20). Pour sortir de cette incertitude épidémiologique, l'initiative GOLD a recommandé l'utilisation d'une méthodologie standardisée rigoureuse et de critères spirométriques stricts pour le diagnostic de la BPCO. Malgré cette harmonisation avec l'initiative GOLD, il existe une réelle hétérogénéité de prévalence selon les pays, comme en témoigne le travail de Buist *et al.* qui ont étudié la prévalence de la BPCO dans 12 pays de niveau de développement variables, en utilisant une définition spirométrique de la BPCO (figure 2) (26). La figure 2 illustre cette hétérogénéité.

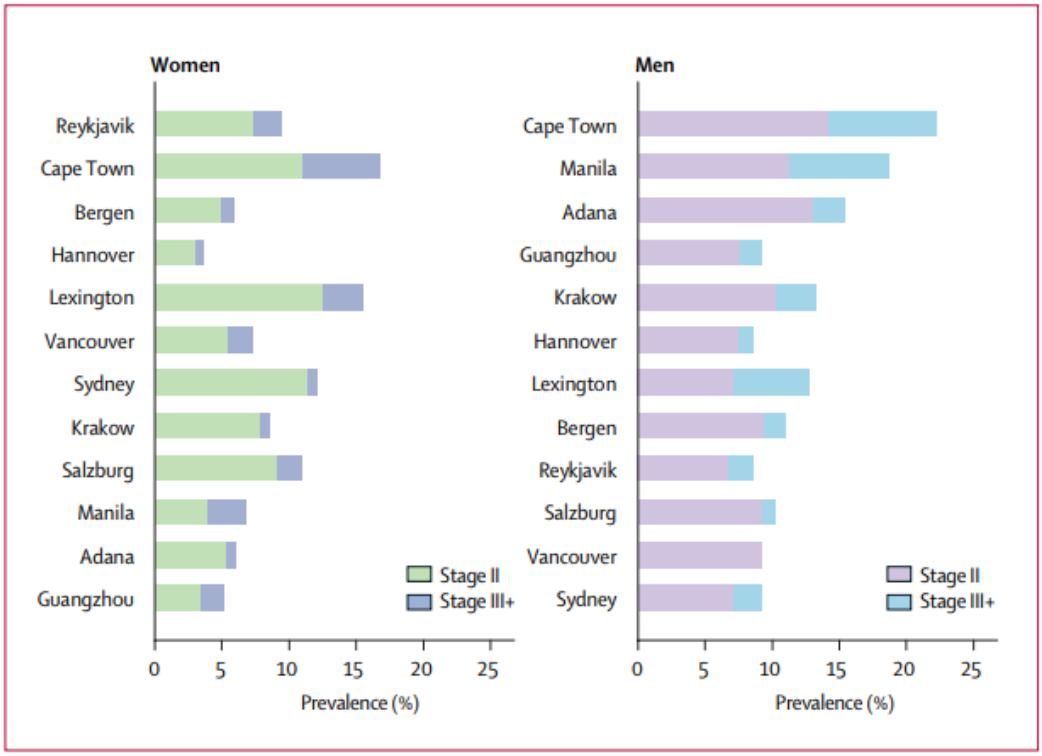


Figure 2. Prévalence de la BPCO (stade II et III ou plus) selon le sexe et le site (29).

b) Morbi-mortalité

La BPCO est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde comptant pour 5% des décès (30). En 2002, l'initiative GOLD projetait que la BPCO, classée cinquième cause de mortalité deviendrait la troisième cause en 2020 (après les cardiopathies ischémiques et les maladies cérébro-vasculaires) ; une projection plus récente faite en 2008, estimait que la BPCO sera la quatrième cause de mortalité en 2030 (1,3). En effet, parmi les maladies chroniques, la BPCO est la seule dont le taux de mortalité soit toujours en hausse constante (1) ; cette augmentation serait principalement secondaire à une recrudescence de la consommation de tabac dans le monde, à la réduction de la mortalité de certaines maladies (cardiopathies, maladies infectieuses) et au vieillissement de la population mondiale (3).

L'estimation de la mortalité ajustée sur l'âge attribuable à la BPCO dans 25 pays était de 4,4/100.000 au Japon, 12/100.000 en France, 23,1/100.000 au Royaume-Uni, 27.2/100.000 aux Etats-Unis, 49,4/100.000 au Nigeria, 130,5/100.000 en Chine (31). Ces taux étaient donc très variables avec un ratio de près de 30 fois entre ceux du Japon et de la Chine (31). Cela s'expliquerait par la différence des critères de décès attribuables à la BPCO entre les pays (31). Par ailleurs, les morbidités liées à la BPCO peuvent être estimées indirectement par le nombre de consultations médicales ou

d'hospitalisations (24). Aux Etats-Unis d'Amérique, une étude évaluant la morbidité de la BPCO, rapportait 10.3 millions de consultations médicales, 1.5 millions de consultations dans les services d'urgence et 699 000 hospitalisations en 2010. Cette morbidité importante est en baisse car entre 1999 et 2019, les taux d'hospitalisation de la BPCO ont diminué de 39.9 à 31.6 pour 10000 habitants chez les hommes et de 40.2 à 32.2 pour 10000 habitants chez les femmes (24). Aussi, la morbidité de la BPCO peut être affectée par d'autres comorbidités chroniques concomitantes comme l'atrophie musculaire, les maladies cardio-vasculaires, la dépression, l'ostéopénie, le diabète, les infections et les défaillances musculo-squelettiques (3). Ces comorbidités contribuent à l'aggravation des morbidités à l'origine d'une mortalité précoce chez les patients atteints de BPCO (31).

c) Impacts socio-économiques

La BPCO est une pathologie lourde en termes économique et social tant pour les patients que pour la société (3). Différentes méthodes sont utilisées pour estimer les coûts de la BPCO ; les coûts directs des services de santé (hospitalisations, médications, équipement médical durable...) et les coûts indirects (absentéisme, perte de productivité et décès prématurés...) (23).

Aux Etats Unis d'Amérique, en 2003, une étude avait estimé les coûts totaux (directs et indirects) de la BPCO à 32,1 milliards de dollars US, avec des coûts directs de l'ordre de 18 milliards de dollars US (31). En 2010, les coûts totaux d'hospitalisations et d'absentéisme étaient estimés à 36 milliards de dollars US. Toutefois, le coût réel pourrait être près du double en raison de la présence concomitante d'autres comorbidités chez les patients atteints de BPCO, rendant difficile l'attribution des coûts des traitements hospitaliers spécifiquement à une maladie particulière. Par exemple, parmi 10.3 millions de patients atteintes de BPCO diagnostiquée en 2010, des frais médicaux de l'ordre de 101 milliards de dollars ont été engagés, dont 72.7 milliards de dollars US ont été directement attribués à la BPCO. A l'échelon Européen, les coûts directs en rapport avec la BPCO sont estimés à 23.3 milliards d'euros (26). Par conséquent, la charge croissante de la BPCO dans le monde est une préoccupation majeure pour tous les acteurs du système mondial de santé (24).

3. Facteurs de risque

Le développement de la BPCO est multifactoriel. Les facteurs de risque sont génétiques et environnementaux (32). Le principal facteur de risque de BPCO est le tabac, responsable de plus de 80 à 90% des cas (20). Le tableau 1 résume l'ensemble des facteurs de risques endogènes et exogènes de cette maladie en attribuant à chaque facteur un grade correspondant au niveau de preuve en faveur de l'association et de sa causalité (d'après 20).

Tableau 1. Facteurs de risque de la BPCO selon les recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française (20).

A : *preuve scientifique établie* ***B :*** *présomption scientifique* ***C :*** *faible niveau de preuve scientifique*

Exogènes		**Endogènes**	
Tabagisme	**A**	Déficit en α-1-antitrypsine	**A**
Polluants professionnels	**A**	Hyperréactivité bronchique	**B**
Pollution domestique	**B**	Prématurité	**B**
Pollution urbaine	**B**	Prédisposition familiale	**B**
Infections respiratoires	**C**	Sexe féminin	**C**
Conditions socio-économiques défavorables	**C**	Reflux gastro-œsophagien	**C**

a) Tabagisme

Le tabagisme est de loin le facteur de risque le plus important de la BPCO et neuf patients sur dix sont des fumeurs ou ex-fumeurs (3, 33, 35). Le tabagisme affecte la prévalence de la BPCO, avec 13.3% de fumeurs actuels, 6.8% d'anciens fumeurs, et 2.8% de non-fumeurs ayant déclaré une BPCO. (24, 34). L'implication de la cigarette dans le développement de la BPCO a été démontré sur des modèles animaux (surtout souris, rat, cobaye) où la BPCO peut être induite par l'exposition à la fumée de cigarette (36).

Non seulement le tabac joue un rôle dans la genèse de la BPCO, mais une fois la maladie établie, le tabac est également associé à une progression plus rapide de la maladie : la fonction pulmonaire des BPCO fumeurs diminuent 2 fois plus vite que les BPCO non-fumeurs (27, 37). Il existe une dégradation plus rapide de la fonction respiratoire avec un meilleur bénéfice respiratoire à l'arrêt du tabac chez la femme (28). De même, Pauwels et al. ont rapporté que les fumeurs ont plus de symptômes respiratoires et d'anomalies de la fonction pulmonaire, un déclin annuel plus rapide de VEMS, et une plus grande mortalité attribuable à la BPCO que les non-fumeurs (33). L'âge de début de l'intoxication tabagique, le nombre de paquets-année (1 paquet-année correspondant à une consommation d'un paquet américain de cigarette (20 cigarettes) par jour pendant 1 an), et le statut de fumeur actif sont prédictifs de la mortalité de la BPCO (33). La relation entre l'âge de début de l'intoxication tabagique et la BPCO est bien établie (38). Une étude canadienne qui rapportait lors

d'un dépistage de la BPCO chez des sujets âgés de 60 ans, que 7% d'hommes et 12% de femmes atteints de BPCO fumaient depuis l'adolescence ; chez ceux qui avaient commencé au début de l'âge adulte, les taux étaient plus faibles, soit 4% pour les hommes et 7% pour les femmes (38). Par contre, à peine 2% des hommes et 3% des femmes qui n'avaient jamais fumé étaient atteints de BPCO à l'âge de 60 ans. Ainsi pour des consommations tabagiques comparables en paquets-années, les personnes qui ont commencé à fumer à l'adolescence courent un plus grand risque d'être atteints de BPCO que celles qui n'ont commencé à fumer qu'au début de l'âge adulte (38). Le tabagisme passif est responsable de manifestations respiratoires à répétition qui pourraient également favoriser le développement de la BPCO. Plus particulièrement, fumer pendant la grossesse peut également représenter un risque pour le fœtus, en affectant la croissance et le développement des poumons in utero et éventuellement l'amorçage du système immunitaire (3).

Enfin, à niveau de tabagisme égal, environ 15 à 20% des fumeurs développeront une BPCO, soulignant l'importance d'autres facteurs de risque (20). Si la fumée de tabac reste le facteur de risque principal de la BPCO, le tabagisme passif, les expositions professionnelles, la pollution ou encore une probable susceptibilité génétique sont entre autres, des facteurs de risque à ne pas négliger ; car environ 15% des BPCO en Europe surviennent chez des individus non-fumeurs, proportion qui atteint 50% dans les pays en voie de développement (32).

b) Facteurs de risques non tabagiques

— **Expositions professionnelles**

La responsabilité des facteurs professionnels dans la genèse ou l'aggravation de la BPCO est restée longtemps méconnue, occultée en particulier par le poids prépondérant du tabagisme (39). Néanmoins, il existe un corpus de données expérimentales et surtout épidémiologiques, objet de plusieurs revues générales (40, 41), qui attestent du rôle important des expositions professionnelles en tant que facteur étiologique de la BPCO (39). Les polluants professionnels associés à un risque avéré de BPCO peuvent être classés en quatre groupes :

- Les poussières minérales : silice et silicates, ciment, charbon ;
- Les poussières organiques : coton, jute, endotoxine, grains, bois
- Les fumées et vapeurs : combustion, gaz d'échappement
- Les poussières métalliques : osmium, vanadium, fumées de soudures (42)

Ces polluants peuvent provoquer une BPCO indépendamment du tabagisme ou en synergie avec le tabagisme lorsque les expositions sont suffisamment intenses ou prolongées (43). L'American Thoracic Society estime que 15 à 20% des cas de BPCO chez les non-fumeurs pourraient être causés

par une exposition professionnelle (44). Les métiers exposant les personnes aux poussières biologiques comme dans l'agriculture ou l'industrie du textile doublent le risque de BPCO ; et l'exposition aux vapeurs ou poussières inorganiques est la plus associée à la présence de BPCO (42,45).

— **Pollution atmosphérique**

L'OMS estime que la pollution de l'air serait responsable de 1% des cas de BPCO dans les pays développés et de 2% dans les pays en voie de développement (31). Un autre facteur de risque important pour le développement de la BPCO est l'exposition à la pollution de l'air intérieur, causée par le chauffage et la cuisson avec du carburant de biomasse dans les logements mal ventilés, conduisant à des niveaux élevés de matières particulaires à l'intérieur des maisons (33). Dans le monde, environ 50% de tous les ménages, et 90% des ménages ruraux utilisent un combustible de la biomasse (bois, charbon de bois, d'autres matières végétales, et les déjections animales) et le charbon comme principale source d'énergie domestique (32). Environ 3 milliards de personnes dans le monde sont exposés à la fumée des combustibles de la biomasse par rapport aux 1.01 milliards de personnes qui fument du tabac suggérant que l'exposition à la fumée de biomasse pourrait être le plus important facteur de risque pour la BPCO (32).

De nombreuses études ont identifié la fumée de biomasse (figure 3) en tant que facteur de risque principal de la BPCO dans les zones rurales (32). Effectivement, plus de 80% des foyers en Chine, en Inde, en Afrique subsaharienne utilisent le carburant de la biomasse pour la cuisson et entre 30 à 75% des foyers dans les zones rurales d'Amérique latine ; près de 2 milliards kg de biomasse sont brûlées quotidiennement dans les seuls pays en développement (32). Aussi, les résultats des études épidémiologiques menées en Inde, Arabie Saoudite, Turquie, Mexique, Népal et au Pakistan ont montré que les femmes utilisant les combustibles de biomasse ont une prévalence accrue de symptômes respiratoires attribuables à la BPCO et une diminution significative de la fonction pulmonaire par rapport aux femmes qui ne sont pas exposées à ces combustibles (32). Une méta-analyse de 36 études a montré que l'exposition à la fumée de biomasse était significativement associée à la BPCO, aux infections des voies respiratoires aigües, et aux sifflements respiratoires (32). Enfin, environ 50% des décès dus à la BPCO dans les pays en développement sont attribuables à la fumée de biomasse, dont environ 75% sont des femmes (32). Cependant, même les pays développés, tels que les Etats Unis d'Amérique, sont également concernés par l'exposition à la fumée de la biomasse (32) ; environ 10% de ménages américains comptent encore sur le bois comme source primaire ou secondaire d'énergie de chaleur (24).



Figure 3. Différents types de combustibles de la biomasse (46)

Contrairement à la pollution intérieure, le rôle de la pollution extérieure dans la BPCO n'est pas clairement élucidé mais le risque attribuable aux polluants extérieurs dans le développement de la BPCO semble beaucoup plus faible que celui des polluants de l'air intérieur (31,33).

La pollution urbaine est un mélange complexe de particules en suspension dans l'air (particules : PM 10 ou PM 2.5 selon leur diamètres moyen en microns), de vapeurs et de gaz (dioxyde d'azote/NO_2, dioxyde de soufre/SO_2, ozone/O_3) provenant du trafic motorisé, de l'industrie, du chauffage intérieur, voir des feux à l'extérieur dans certains pays (44). Allain et *al.* ont rapporté qu'il n'existait pas de seuil d'exposition aux polluants à partir duquel les différentes pathologies respiratoires surviennent (47).

L'association entre la pollution atmosphérique et la BPCO est probable (44). Les travaux cherchant à montrer une relation causale s'accumulent, avec trop peu d'études longitudinales disponibles et les études transversales rapportent des résultats contradictoires (44). Ainsi, de multiples études ont montré qu'en période de pics de pollution, l'augmentation de la morbidité et de la mortalité des pathologies cardiovasculaires est bien établie (47). Et l'exposition à long terme à une pollution extérieure serait associée au développement de troubles ventilatoires obstructives (47).

Aujourd'hui encore, Il est difficile d'évaluer l'effet exact de la pollution atmosphérique sur l'incidence de la BPCO. Les effets de la pollution sont probablement d'origine multifactorielle.

— **Âge**

L'âge est souvent répertorié comme un facteur de risque de la BPCO (3). Plusieurs études ont en effet rapporté une augmentation de la prévalence et de la morbi-mortalité de la BPCO avec l'âge. La prévalence de la BPCO en Australie rapporté dans l'étude « Burden of Obstructive Lung Disease » (BOLD) confirme cette théorie, avec une prévalence de 7.5% pour les sujets âgés de 40 ans et plus et 29.3% pour ceux âgés de plus de 75 ans (23). De même, la prévalence déclarée de la BPCO aux USA

augmente avec l'âge : 3.4% chez les personnes âgés de 25-44 ans, 6.6% chez ceux âgés de 45-54 ans, 9.2% chez les 55-64 ans, 12.1% chez les 65-74 ans, et 11.6% chez ceux âgés de 75ans et plus (24). Cette aggravation de la BPCO avec l'âge s'expliquerait par le déclin physiologique de la fonction respiratoire, évaluée par la mesure du VEMS, débutant dans les troisième et quatrième décennies de vie puis s'accélérant au cours du vieillissement (figure 4) (37). De récentes publications argumentant contre ce modèle de Fletcher, ont montré que le changement de la fonction pulmonaire est hétérogène avec une minorité des patients présentant réellement une baisse rapide de leur fonction ventilatoire tandis que de nombreux patients ont un déclin non rapide manifeste et avec pour certains une amélioration soutenue de la fonction pulmonaire au fil du temps (48).

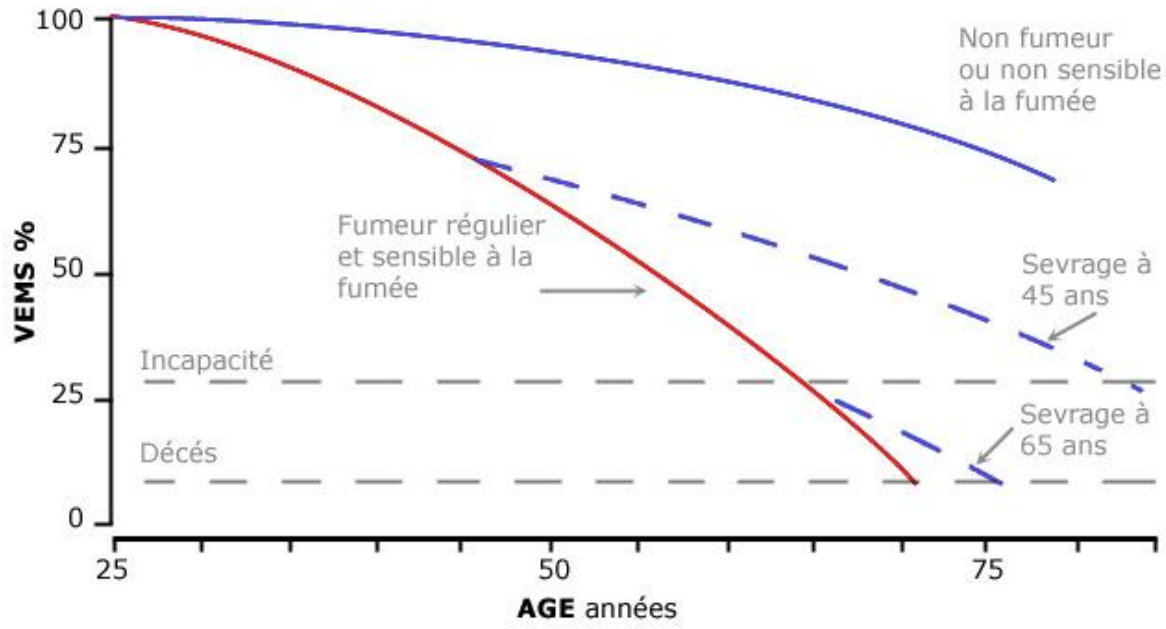


Figure 4. Déclin du VEMS avec l'âge (adaptée de Fletcher) (37, 49)

Déclin physiologique de la fonction pulmonaire avec l'âge chez les non-fumeurs, les fumeurs et les ex-fumeurs ayant cessé de fumer respectivement à l'âge de 45 et 65 ans.

— **Sexe**

Historiquement, la BPCO était connue comme la maladie liée au tabagisme qui touche principalement les hommes, malgré un VEMS plus bas des femmes par rapport aux hommes à tabagisme égal (28,50). La prévalence de la BPCO chez les femmes montre une tendance à l'augmentation liée à l'exposition accrue aux fumées domestiques résultant de la combustion des biomasses dans les pays en développement et à l'augmentation du tabagisme féminin dans les pays développés où les habitudes tabagiques des femmes ont rejoint celles des hommes (28). Ainsi, plusieurs études ont rapporté une prévalence de la BPCO, stade GOLD 2 et plus, de 6.9% et 5.8% chez les hommes contre 8.1 et 7.9% chez les femmes respectivement en Australie et aux Etats Unis

d'Amérique (23,24). Aussi, l'étude BOLD a montré une prévalence plus élevée chez les femmes comparativement aux hommes aux Etats Unis d'Amérique, en Autriche, et Australie et en Islande (29, 31). Ces différents arguments expliqueraient que la prévalence actuelle de la BPCO dans le monde concerne autant les hommes que les femmes bien qu'il existe des disparités géographiques (28).

Il pourrait y avoir des différences cliniques fondées sur le sexe (50). En effet, les femmes sont plus susceptibles de développer une bronchite chronique alors que l'emphysème semble plus fréquent chez les hommes (28,50). Les femmes présentent aussi plus de dyspnée, de comorbidités associées et une plus mauvaise qualité de vie que les hommes (28,50). Les exacerbations peuvent entraîner des résultats différents avec des ré-hospitalisations plus fréquentes. L'observance au traitement peut être différente selon le sexe (28,50).

En résumé, les femmes sont de plus en plus concernées par la BPCO et présentent un phénotype clinique différent de celui des hommes.

— **Statut socio-économique**

Le risque de voir apparaître une BPCO est supérieur dans les populations bas niveau socio-économique. En effet, la prévalence de la BPCO et les facteurs socio-économiques étaient inversement corrélés dans une étude réalisée en 2011 aux Etats Unis d'Amérique (24). En prenant le niveau de scolarisation comme variable socio-économique, la prévalence était de 9.5% pour les personnes n'ayant aucun diplôme d'études secondaires, 6.8% pour ceux qui avaient un diplômes d'études secondaires, et 4.6% pour ceux qui avaient plus d'un diplôme d'études secondaires (16). Une tendance similaire était observée si le statut socio-économique était évalué en fonction du revenu annuel du ménage (24). Ces facteurs socio-économiques sont particulièrement pertinents pour l'accès des patients aux soins et aux traitements (24). Aussi, les conséquences d'un bas niveau socio-économique telles la pauvreté, la promiscuité, le faible statut nutritionnel, les mauvais accès aux soins, les infections respiratoires précoces sont responsables d'une augmentation du nombre de BPCO (44). Toutefois, il est difficile de faire la part entre ce qui est dû au statut socio-économique lui-même et les autres facteurs de risque avérés de la BPCO comme l'exposition au tabac, la nutrition, la pollution intérieure et l'exposition professionnelle, tous liés au statut socio-économique de la personne (31).

— **Autres facteurs de risque**

D'autres facteurs tels l'asthme chronique, la tuberculose, les infections respiratoires à répétition durant l'enfance, les régimes alimentaires riches en antioxydants, l'hyperréactivité bronchique, le

reflux gastro-œsophagien, la malnutrition et l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pourraient prédisposer au développement de la BPCO (44, 51-53).

c) Facteurs génétiques

Le déficit en α-1-antitrypsine et la *Cutis Laxa* sont les seuls facteurs de risque génétiques, avec une preuve suffisante pour conclure à un lien de causalité, associés à la BPCO chez les non-fumeurs (53). Le facteur génétique lié à la BPCO le plus connu, une déficience en α-1-antitrypsine est présent chez 1-3% des patients atteints de BPCO (31, 54). La déficience héréditaire en α-1-antitrypsine, un inhibiteur majeur des sérines protéases, se traduit chez les malades atteints de la BPCO (fumeurs ou non), par un développement prématuré et accéléré d'un emphysème pan lobulaire (33). L'exposition à la fumée de tabac ou à d'autres polluants aggrave l'emphysème lié à ce déficit enzymatique (31).

La BPCO est également une maladie polygénique ; en effet des polymorphismes d'autres gènes autres que l' α-1-antitrypsine pourraient constituer des facteurs de risque d'emphysème ou plus largement de BPCO sévère. Ce sont des gènes impliqués dans certains processus physiopathologiques de la maladie :

- Métabolisme oxydatif : hème-oxygénase-I, un puissant antioxydant (33) ;
- Balance protéase-antiprotéases : époxyde hydrolase microsomale 1 (EPHX 1 : enzyme jouant un rôle important dans le métabolisme des réactifs intermédiaires de l'époxyde, composé de la cigarette), α-1-antichymotrypsine (ACT : inhibiteur des protéases à sérine), Glutathion S-transférase (GSH, rôle dans la détoxification des divers composés hydrocarbonés aromatiques de la cigarette), métalloprotéinase matricielle 12 (MMP-12 : protéase) (3, 31, 33, 55, 56) ;
- Inflammation : facteur de nécrose tumorale (TNFα : cytokine pro inflammatoire), facteur de croissance (TGF-β1) (55,57).

Il y aurait également le chromosome 2q décrit comme un déterminant génétique de l'obstruction bronchique et statistiquement corrélé au développement de phénotype intermédiaire de la BPCO (58) ; aussi les polymorphismes du gène serpine2, un inhibiteur de la trombine, de l'urokinase et de la plasmine, pourraient altérer les processus de réparation des dommages pulmonaires secondaires à la cigarette (59).

Toutefois, l'impact et la description des variantes génétiques fonctionnelles impliquées dans ces interactions sont toujours discutés.

4. Diagnostic

Le diagnostic de la BPCO est essentiellement porté par l'examen clinique et l'étude de la fonction ventilatoire éventuellement complétés par l'étude de l'hématose et l'imagerie pulmonaire (20). Il faut penser à réaliser un diagnostic différentiel avec d'autres pathologies comme le cancer, l'insuffisance cardiaque (dyspnée seule) , l'anomalie pulmonaire ou pleurale (radiographie thorax), la tuberculose, l'asthme.

Les symptômes les plus courants de la BPCO sont la dyspnée et la toux productive matinale. En amont du stade d'insuffisance respiratoire, les signes physiques contribuent peu au diagnostic de la BPCO et se limitent, à l'auscultation pulmonaire, à des râles bronchiques surtout des ronchi. Les symptômes et les signes d'examen doivent être replacés dans le contexte d'une exposition durable et parfois ancienne à des aérocontaminants (20).

Le diagnostic de BPCO repose sur la mise en évidence d'un TVO permanent, non complétement réversible (2). Une réversibilité spirométrique significative est définie par une augmentation du VEMS et/ou de la CVF supérieure ou égale à 12% et au moins 200 mL après inhalation d'un β-2-mimétique et/ou un anticholinergique de courte durée d'action (2).

Les investigations supplémentaires suivantes peuvent être considérées comme faisant partie du diagnostic et de l'évaluation de la BPCO (3) :

- L'étude de l'hématose permet d'évaluer l'existence d'une hypoxémie
- La radiographie thoracique n'est informative que dans les formes évoluées de BPCO nécessitant une confirmation par la réalisation de tomodensitométrie (3, 20).
- Les tests d'efforts : une déficience de l'exercice mesurée de façon objective, évaluée par une réduction de la distance de marche par le patient lui-même ou lors d'un test d'effort progressif dans un laboratoire, est un puissant indicateur de l'affaiblissement de l'état de santé et un prédicteur de pronostic. Le suivi de l'activité physique peut être plus pertinent en ce qui concerne le pronostic que l'évaluation de la capacité d'exercice (3).
- Les scores composites (index ou score BODE par exemple) : une approche relativement simple pour identifier la gravité de la maladie en utilisant une combinaison de plusieurs variables (VEMS, tolérance à l'exercice, perte de poids, réduction de la pression artérielle en oxygène (PaO_2) a été proposée (3).
- Le dépistage de la déficience en alpha-1-antitrypsine (AAT) (3). En effet, le déficit en AAT est le facteur de risque génétique le plus connu pour l'emphysème et la BPCO. La fonction principale de l'AAT est de protéger le poumon des inflammations notamment provoquées

par tabac. On estime qu'environ Environ 3% des personnes BPCO sont atteintes d'un déficit en AAT non détecté.

5. Traitement

Un traitement pharmacologique approprié peut réduire les symptômes de la BPCO, réduire la fréquence et la gravité des exacerbations et améliorer l'état de santé et la tolérance à l'effort (3). Mais à ce jour, aucun des médicaments existants pour la BPCO n'a démontré de façon concluante sa capacité à modifier le déclin à long terme de la fonction pulmonaire (3). Enfin chaque régime de traitement pharmacologique doit être spécifique au patient, guidé par la gravité des symptômes, le risque d'exacerbations, la disponibilité des médicaments et la réponse du patient (3).

Selon la HAS, les médicaments disponibles sont les suivants :

■ Bronchodilatateurs de courte durée d'action (BCA), β-2 agonistes ou anticholinergiques : indiqués en 1re intention. Les formes orales doivent être réservées aux patients incapables d'utiliser les formes inhalées.

■ Bronchodilatateurs de longue durée d'action (BLA), β-2 agonistes ou anticholinergiques : indiqués lorsque la dyspnée notamment persiste.

■ En association, les bronchodilatateurs de deux classes peuvent améliorer le VEMS.

■Les associations corticoïdes + bronchodilatateurs BLA sont réservées souvent aux patients qui ont une BPCO sévère (stade III) avec des antécédents d'exacerbations fréquentes malgré un traitement continu par bronchodilatateur.

■ L'association des corticoïdes inhalés augmentent le risque d'infections respiratoires basses en particulier de « pneumonies ».

■ L'association corticoïde + β-2 agoniste LA à un anticholinergique LA est possible si la dyspnée ou les exacerbations persistent malgré le traitement.

■ L'alpha antitrypsine si déficit.

■ Dans les cas les plus sévères entrainant une insuffisance respiratoire chronique, une oxygénothérapie de longue durée est nécessaire.

Il reste très important surtout d'accompagner les patients dans une démarche d'arrêt du tabagisme ; la pharmacothérapie et le remplacement de la nicotine augmentent de façon fiable les taux d'abstinence tabagique à long terme (3). La vaccination antigrippale est à mettre en place chez les patients atteints de BPCO. Cela réduirait de 50 % la mortalité par infection grippale chez les plus de 65 ans.

Une rééducation fonctionnelle peut être prescrite aux patients BPCO. Les objectifs sont le maintien des capacités respiratoires et de l'adaptation à l'effort ainsi que la prévention de l'encombrement ou de la surinfection bronchique. Il s'agit de 15 à 20 séances, 2 à 3 fois par semaine. Les patients notamment vont se ré-entrainer à l'effort. Ils commencent par des efforts brefs (2 minutes) et intensifs sous surveillance médicale. Un apprentissage de la toilette bronchique est proposé.

Les recommandations actuelles prise en charge ont pour but d'améliorer les symptômes, la réduction de la dyspnée notamment, ralentir la vitesse de déclin de la fonction respiratoire et réduction de la mortalité, diminuer le nombre des exacerbations, réduire les facteurs de risque et améliorer la qualité de vie du patient.

La BPCO, définie par une obstruction bronchique permanente et progressive est une des premières causes de morbi-mortalité dans le monde, et son importance continuera d'augmenter avec le vieillissement continu de la population. Le diagnostic de la BPCO est basé sur la mise en évidence d'un TVO à l'issu des EFR. La BPCO se caractérise par un remodelage des petites voies aériennes et un emphysème, principalement secondaires à une exposition chronique à la fumée de cigarette. Bien que le tabagisme soit le principal facteur de risque de la BPCO, d'autres facteurs, indépendamment ou non d'une exposition à la fumée de tabac et incluant essentiellement une pollution de l'air intérieur, une prédisposition génétique et des expositions professionnelles, sont également incriminés dans la genèse de la maladie.

B. Remodelage bronchiolaire dans la BPCO

La progression de la BPCO (du stade GOLD 0 au stade GOLD 4) est associée à un épaississement de la paroi des petites voies aériennes parun processus de remodelage lié à la réparation tissulaire (60). Ce remodelage bronchiolaire désigne les modifications structurales spécifiques de la paroi des bronchioles qui contribuent à la réduction de la lumière bronchique avec limitation du débit aérien (62-64). Ces changements structuraux (tableau 2) incluent des altérations de toutes les structures pariétales de la bronchiole avec une nette prédominance de la métaplasie épithéliale et de la fibrose péribronchiolaire (figure 5) (5, 61, 65, 66). Les atteintes des différents composants de la paroi bronchiolaire seront discutées ci-dessous

Tableau 2. Modifications structurales de la paroi des bronchioles dans la BPCO, adaptées de Baraldo et de Skold (5,67). Estimation semi-quantitative d'importance croissante : (+), +, ++, +++

Modification structurales	Fumeurs	
	BPCO (+)	BPCO (-)
Altérations épithéliales	++	+
Fibrose	+++	
Anomalies musculaires lisses	(+)	
Epaississement de la paroi	+++	+

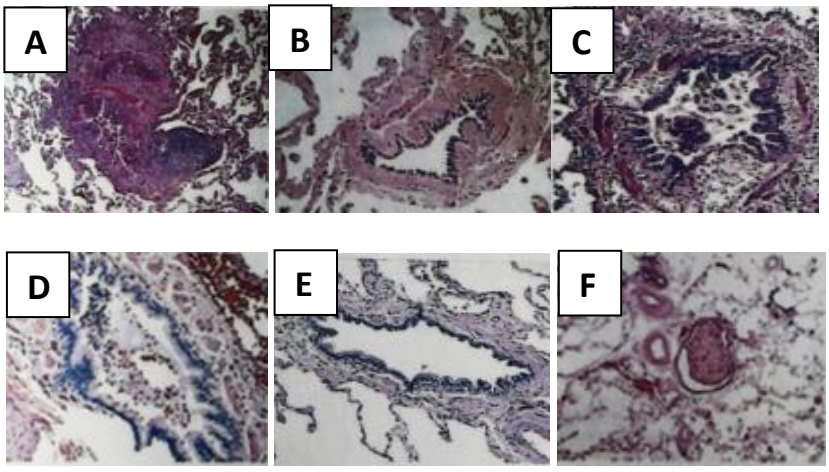


Figure 5. Modifications histologiques des bronchioles après exposition à la fumée de cigarette (16)

A : *accumulation de lymphocytes et d'agrégats lymphoïdes dans la paroi bronchiolaire.* ***B-C :*** *dépôt de tissu fibreux entre la couche musculaire lisse et l'épithélium* ***D-E :*** *accumulation de mucus dans la lumière des petites voies aériennes* ***F :*** *bronchiole normale (68).*

1. Fibrose péri-bronchique

La fibrose péri-bronchique, une des principales caractéristiques anatomopathologiques de l'atteinte bronchiolaire de la BPCO, contribue significativement à l'épaississement de la paroi bronchiolaire (66). Il existe une corrélation entre le déclin de la fonction pulmonaire et le degré de fibrose dans les bronchioles (60, 73).

La fibrose péri-bronchique est caractérisée par une accumulation excessive au niveau de l'adventice de matériel extracellulaire amorphe péri-bronchique, constitué essentiellement de fibres épaisses de **collagène** (74,75). La BCPO est associée à un dépôt accru de **matrice extracellulaire (MEC)**, essentiellement constitué de collagène (I, III et IV), de fibronectine et de laminine au niveau de la paroi des bronches (69-71, 76). Les dépôts de collagène (et spécifiquement ceux de collagènes I et III) au niveau du chorion bronchique et de l'adventice sont significativement augmentés chez des patients BPCO par rapport aux sujets témoins (72). La progression de la BPCO est associée à une augmentation du ratio collagène III sur collagène I dans le tissu bronchique (72). Ces résultats suggèrent un rôle probable des protéines matricielles dans la pathogénie du remodelage bronchique (77).

2. Caractéristiques des myofibroblastes

Les populations de cellules mésenchymateuses pulmonaires résidentes comprennent les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les myofibroblastes (84). Après une lésion pulmonaire aigüe le nombre de myofibroblastes augmente, avec pour fonction de maintenir et de restaurer l'intégrité tissulaire ; une fois cette mission accomplie, ils sont éliminés par apoptose (84).

Dans le remodelage bronchique, l'augmentation du nombre de myofibroblastes persiste, probablement liée à une persistance de recrutement, ou une augmentation de prolifération et/ou une diminution de l'apoptose des myofibroblastes (84, 85). L'association entre l'accumulation de myofibroblastes et la présence de fibrose péri-bronchique a été largement documentée tant chez des patients atteints de BPCO que dans des modèles murins de fibrose pulmonaire (61, 82, 83).

Les myofibroblastes des tissus pulmonaires fibrotiques sont définis par une combinaison de critères ultrastructuraux, immunophénotypiques et morphologiques (84). Une liste partielle de ces critères inclut la présence d'une morphologie fusiforme, une immunoréactivité pour la vimentine et l'α-SMA, un potentiel de prolifération très important, une production excessive de collagène et une accumulation au niveau des foyers fibroblastiques (foci fibroblastiques) (73, 79, 81, 84). Ces propriétés impliquent le myofibroblaste comme cellule effectrice principale de la fibrose pulmonaire (84).

- Les **myofibroblastes sont une source essentielle de la synthèse de la MEC** (73, 78, 79). L'augmentation de l'expression des protéines matricielles bronchique, tant chez l'homme que dans des modèles animaux, serait secondaire à une hausse du nombre de **myofibroblastes**,. Des études immunohistochimiques ont montré une association entre la présence de cellules α-SMA (*alpha smooth muscle Actine)* positives (témoin d'une différenciation myofibroblastique) et l'augmentation de l'expression de collagène dans les foci fibroblastiques (80).
- **Les myofibroblastes sont une source importante de plusieurs cytokines inflammatoires et fibrogéniques** incluant le **TGF-β1** (81). A travers les propriétés inflammatoires de ces cytokines, les myofibroblastes semblent avoir des rôles importants dans la fibrogénèse au-delà de l'induction de dépôt de la matrice extracellulaire (81). Ils contribueraient ainsi au recrutement de cellules inflammatoires, amplifiant et prolongeant ainsi l'inflammation associée à la fibrose (81).
- Les **myofibroblastes présentent la propriété d'être contractiles,** contribuant à la réduction de la compliance du tissu pulmonaire (81). Les myofibroblastes, caractérisés par une augmentation des filaments contractiles, produisent abondamment de la MEC, exprimant ainsi les propriétés des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (84, 86).
- Les myofibroblastes présentent un **potentiel de prolifération très important**

L'origine des myofibroblastes reste controversée et peut être à l'origine de résultats contradictoires dans la littérature (87).

3. Origine des myofibroblastes

Classiquement, trois sources potentielles de myofibroblastes sont décrites:

- ***Fibroblastes résidents :*** Activation des fibroblastes présents localement (résidant dans l'interstitium) en cellules ayant un phénotype de myofibroblastes (73, 84).

  Il est communément admis que les fibroblastes pulmonaires résidents, issus du microenvironnement local, sont les principaux contributeurs du pool de myofibroblastes dans les foyers fibrogéniques (84, 88). Une condition préalable à cette contribution est la migration des fibroblastes vers ces foyers, suivie de leur expansion et différenciation (88). Les fibroblastes résidents pulmonaires se différencient en myofibroblastes en réponse à une variété de stimuli fibrogènes (81). Ces stimuli comprennent des facteurs de croissance tels le TGF-β1, le CTGF (connective tissue growth factor) et le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), ainsi que des chemokines (88). Le TGF-β1 en particulier est un régulateur clé de la

fibrose et induit la transdifférenciation des fibroblastes in vitro (86). Ces données constituent un argument en faveur de ces fibroblastes précurseurs des myofibroblastes (78).

En outre, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire, une induction de myofibroblastes traduite par une expression de novo d'α-SMA a été retrouvée au niveau de l'adventice des vaisseaux sanguins (89). Cette localisation périvasculaire en fait des péricytes et une autre cellule potentiellement précurseur des myofibroblastes (78).

- ***Fibrocytes :*** Infiltration du tissu par des cellules souches d'origine médullaire (fibrocytes ou cellules stromales, non hématopoïétiques) (73, 84).

  Les fibrocytes sont des précurseurs dérivés de moelle osseuse. Ils ont été identifiés pour la première fois comme une sous-population de leucocytes impliquée dans la réparation tissulaire, avec un phénotype de marqueurs leucocytaires (CD34+ et CD45+) mais aussi mésenchymateux (collagène I et vimentine) (90). Ils sont recrutés au niveau du poumon par des chimiokines comme CCR2 ou CCR7 et perdent le marqueur CD34 lorsqu'ils migrent dans le poumon (91).

  Des études *in vitro* et in vivo ont fourni des preuves de différenciation des fibrocytes en fibroblastes et éventuellement en myofibroblastes, suggérant ainsi leur rôle dans la fibrose (88, 92-95).

  — En présence de facteurs profibrotiques tels que le TGF-β ou le PDGF, les précurseurs mononuclés CD34+ sont recrutés au niveau de sites inflammatoires et se différencient en fibrocytes puis en fibroblastes et myofibroblastes avec expression de α-SMA (92).

  — Les fibrocytes sécrètent de la MEC de manière constitutive,

  — Les myofibroblastes néoformés produisent de grandes quantités de collagène et de fibronectine et expriment de l'α-SMA (92) et sont eux-mêmes capables de sécréter des agents profibrosants comme le TGF-β1, le VEFG (*vascular endothelilal growth factor)* et le PDGF (91).

  Mehrad et *al.* ont démontré une augmentation de l'expression de CXCL12 dans le plasma et les poumons au cours de pathologies pulmonaires interstitielles fibrotiques. Cette augmentation de CXCL12 est associée à un nombre élevé de fibrocytes circulants (88, 95). D'autres auteurs ont confirmé la présence des fibrocytes dans la circulation sanguine périphérique et le parenchyme pulmonaire de patients présentant une fibrose pulmonaire idiopathique (95-97). Une augmentation de la quantité de fibrocytes circulants a été corrélée avec les épisodes d'exacerbation aigue avec retour à la valeur de base après résolution de l'épisode aigu (91). Cependant, certains auteurs notamment Yokota et *al*. ont infirmé cette

capacité de transdifférenciation des fibrocytes en myofibroblastes *in vivo* (98). En somme, des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour élucider la contribution des différentes cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse dans la genèse de la fibrose pulmonaire, en particulier chez l'homme (84).

Ainsi, les fibrocytes semblent représenter un état de différenciation intermédiaire obligatoire entre les précurseurs de la lignée monocytaire circulants et les myofibroblastes matures présents au niveau tissulaire.

- ***Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) :*** Conversion de cellules épithéliales au cours d'un phénomène appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (73, 84).

  La TEM est un processus par lequel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent celles normalement associées aux cellules mésenchymateuses (84, 99). Ces changements s'accompagnent d'une augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules et de l'expression de certains facteurs transcriptionnels associées à la TEM (Snail, Slug et Twist) (78, 84). La TEM se produit physiologiquement au cours du développement mais intervient également dans des processus pathologiques comme la carcinogénèse et la fibrose en tant que source de myofibroblastes (84, 99).

  Cela a été confirmé par deux méthodes dans plusieurs études ; 1) procédé de traçage génétique *in vivo* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (100, 101), 2) co-expression de cellules épithéliales et mésenchymateuses sur des coupes de poumons humains présentant des manifestations histologiques de pneumonie interstitielle, corrélat histopathologique de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) (102, 103).

  Bien que les cellules épithéliales puissent acquérir des caractéristiques propres aux cellules mésenchymateuses dans les poumons avec FPI, la contribution de la TEM dans le processus de fibrose pulmonaire reste controversée (104).

  — Plusieurs études sur les fibroses rénale, hépatique et pulmonaire, n'ont obtenu que des précurseurs épithéliaux (78, 105) et non mésenchymateux.

  — Rock et *al.* ont rapporté la première étude de traçage génétique négative pour la TEM dans le poumon: les cellules épithéliales alvéolaires de type II exprimant à l'origine « SP-C » n'ont pas été converties en des cellules exprimant des marqueurs mésenchymateux (α-SMA, S100A4 ou vimentine) en réponse à une lésion expérimentale à la bléomycine. Les cellules exprimant « Scgb1a1 », un marqueur des cellules bronchiques de Clara et éventuellement des cellules progénitrices alvéolaires, ne s'étaient pas converties en des cellules mésenchymateuses (105).

Yamada et *al.* n'ont pas retrouvé des cellules co-exprimant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou du parenchyme pulmonaire de patients présentant une FPI ou une pneumopathie interstitielle non spécifique (106).

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par:

— la TEM pourrait se produire dans la fibrose pulmonaire mais la durée de cette transition pendant laquelle les cellules expriment des niveaux détectables de marqueurs de cellules épithéliales et mésenchymateuses serait trop courte pour être détectée par une double immunohistochimie (106) ;

— la TEM ne surviendrait pas dans la fibrose pulmonaire (106).

— Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de marqueurs mésenchymateux spécifiques (104).

La BPCO est caractérisée par une obstruction bronchique incomplètement réversible associée à des modifications structurales au niveau des voies aériennes distales. Les modifications structurales de ces bronchioles comportent un épaississement de la paroi bronchiolaire avec une fibrose péri-bronchique, associée à une obstruction de la lumière bronchiolaire par des bouchons de mucus. Cette fibrose péri-bronchique est caractérisée par l'activation des myofibroblastes à l'origine d'un dépôt de MEC péri-bronchique constitué de fibres épaisses de collagène, de production de Cytokines inflammatoires. Elle contribue significativement à l'épaississement de la paroi bronchique, un déterminant important de l'obstruction des bronches. Les mécanismes conduisant à la fibrose péri-bronchique dans la BPCO restent mal identifiés.

C. Pathogénie du remodelage bronchique

La pathogénie du remodelage bronchique dans la BPCO est multifactorielle et demeure partiellement inexpliquée (1077). Les rôles de l'inflammation chronique et des cytokines non-inflammatoires sont largement décrits (107).

1. Rôle de l'Inflammation

L'anomalie pathologique première et constante survenant dans les bronches après des agressions pulmonaires répétitives, est l'infiltrat inflammatoire dans la paroi bronchique (62). L'inflammation peut être responsable d'une légère limitation du flux d'air via l'induction d'une constriction fonctionnelle des bronchioles par libération de médiateurs inflammatoires (62). Les agressions

pulmonaires répétitives par les gaz toxiques et les particules inhalées d'origine environnementales (fumée de cigarette notamment) ou professionnelle, activent l'épithélium bronchique et entrainent une exsudation plasmatique et une infiltration persistante du tissu pulmonaire par des cellules inflammatoires et immunes (neutrophiles, macrophages, lymphocytes *natural killer*, cellules dendritiques et lymphocytes B et T) (82, 85, 108). Ces cellules agissent de manière autocrine et paracrine sur les macrophages et les neutrophiles qui produisent des protéases et des radicaux libres, source d'aggravation des lésions pulmonaires existantes (108). L'accumulation des cellules dendritiques dans l'épithélium bronchique contribue au maintien d'une réponse immune adaptative non appropriée, à l'origine d'une inflammation chronique et d'un remodelage tissulaire pulmonaire (108). L'inflammation neurogène a été impliquée dans les réactions inflammatoires des bronchioles : la stimulation des nerfs sensoriels dans l'épithélium des bronchioles libère des tachykinines, dont la substance P et les neurokinines A et B. Les tachykinines provoquent spécifiquement la chimiotaxie et l'adhésion des neutrophiles dans la circulation et stimule la libération de cytokines inflammatoires dans les bronchioles (62).

La chronicité de l'inflammation des bronches modifierait à son tour les relations structure/fonction dans les bronchioles au cours de la BPCO (108). En effet, l'activation épithéliale survenant à la suite des agressions pulmonaires répétitives, induirait une perturbation de l'architecture tissulaire normale, en plus de la production d'infiltrats de cellules inflammatoires dans la paroi bronchique (84, 107). Cette dernière se caractérise par un épaississement de la paroi bronchique, favorisant le rétrécissement des petites voies aériennes et la limitation du débit aérien (108).

2. Rôle de la cytokine non inflammatoire TGF-β1

Le remodelage bronchique provoqué par la fumée de cigarette pourrait être dû à une induction directe de la libération et de l'activation de cytokines, indépendamment de l'inflammation (107, 109, 110). Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, en grande partie dérivée de modèles de fibrose pulmonaire interstitielle, avec production et libération épithéliale de cytokines agissant sur les cellules mésenchymateuses sous-jacentes (107).

Parmi les nombreuses cytokines impliquées dans les processus fibrotiques pulmonaires, l'interleukine-4 (IL-4), l'IL-13 et le TGF-β1 sont les plus importants. Ces cytokines présentent une activité profibrotique significative via le recrutement, l'activation et la prolifération des fibroblastes, des macrophages et des myofibroblastes (85). Nous nous limiterons à la description de l'action du TGF-β1 dans la pathogénèse du remodelage bronchique de la BPCO, puisque ce facteur a été utilisé dans nos conditions d'expérimentation in vitro.

TGF-β : Généralités

Le TGF-β est une cytokine pléïotropique contrôlant la prolifération, la différenciation, la motilité, l'adhésion ou l'apoptose de nombreux types cellulaires (111).

Le TGF-β est une des cytokines profibrotiques les plus largement étudiées (85). Dans le processus de fibrogénèse pulmonaire, son rôle est essentiel pour maintenir un équilibre homéostatique entre les cellules immunitaires, épithéliales et mésenchymateuses (84). Les perturbations des voies homéostatiques induites par le TGF-β, en réponse à une agression chronique répétitive, sont en partie responsables des remodelages bronchiques et parenchymateux observés dans l'asthme chronique, la BPCO et la fibrose pulmonaire (84).

Le TGF-β est synthétisé par la plupart des lignées cellulaires provenant de la moelle osseuse (incluant les lymphocytes T, les macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles) et les fibroblastes.

Il existe 3 isoformes du TGF-β chez l'humain : les TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3 (111). Codées par trois gènes différents portés par trois chromosomes distincts, ces trois isoformes sont très similaires d'un point de vue structural (neuf résidus cystéines conservés, 76 à 80% d'identité entre les séquences protéiques) et leur expression dépend du tissu ou de la pathologie (111). Le TGF-β1 est l'isoforme majoritaire (111).

TGF-β1 : Synthèse et maturation

Le TGF-β1 est synthétisé sous forme d'un précurseur latent (LTGF-β pour *latent TGF-β)* qui requiert une maturation pour se fixer au récepteur et induire une réponse cellulaire (112). Le LTGF-β est constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région aminoterminale, d'une région centrale appelée LAP (pour Latency-Associated Peptide), et d'une région carboxyterminale constituant le TGF-β bioactif après maturation (112). Le LTGF-β peut être sécrété sous forme d'un petit complexe latent (SLC pour Small Latent Complex) ou sous forme d'un large complexe latent (LLC pour Large Latent Complex) lorsque le LAP est associé de façon covalente au LTBP (pour LTGF-β-binding protein) (112). Les peptides LAPs confèrent la latence du complexe alors que les LTBPs permettent le stockage de TGF-β par sa fixation à la matrice extracellulaire (112). Les changements de conformation du LLC ou SLC aboutissent à la libération de la forme bioactive du TGF-β et sont induits par :

- un clivage protéolytique des LAPs par différentes protéases (comme la plasmine, la thrombine, la tryptase, l'élastase, les métalloprotéinases (MMPs 2 et 9 particulièrement))
- ou par des interactions physiques des LAPs avec d'autres protéines, telles que la thrombospondine-1 ou les intégrines (112,113).

TGF-β1 : Transduction du signal

Le TGF-β induit une transduction de signal intracellulaire en se fixant à deux récepteurs membranaires spécifiques ayant une activité de type sérine/thréonine kinase, les récepteurs TβRI et TβRII (112). Le TGF-β se fixe d'abord au récepteur TβRII, formant ainsi un complexe hétérodimérique qui induit par la suite le recrutement et la phosphorylation du TβRII (112). Une fois le récepteur TβRI phosphorylé, la transduction du signal jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques, les Smads (figure 6) (112). Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents : les Smads associées au récepteur ou R-Smads, qui interagissent de façon spécifique avec le TβRI activé (Smad1-3, 5 et 8), les co-Smads (Smad4), médiateurs communs pour tous les membres de la famille du TGF-β et enfin les Smads inhibitrices ou I-Smads (Smad 6 et 7) (109). Il est reconnu que le TGF-β est aussi capable d'activer un très grand nombre de voies de signalisation dites « alternatives » ou « non-Smad » incluant des protéines des voies MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase),* PI3K (*PhosphoInnositide 3 Kinase*)/Akt et RhoA GTPase (114). La coopération entre les voies classiques Smads et alternatives « non Smad » permettent la modulation des effets du TGF-β sur les nombreux processus cellulaires dans lesquels cette cytokine est impliquée (114).

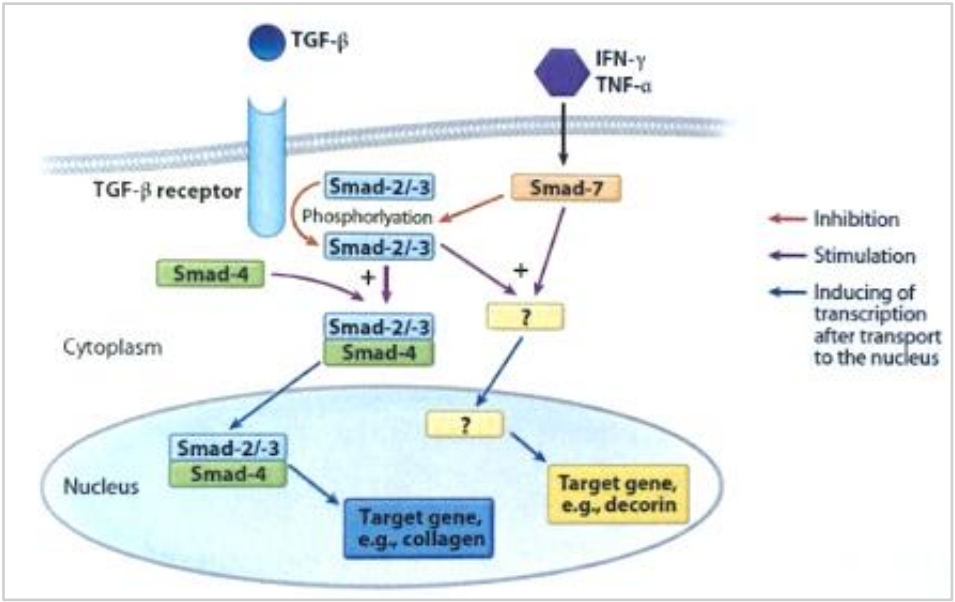


Figure 6. Principaux composants de la voie canonique (Smad) du TGF-β (112)

Abréviations: *TGF-β : Transforming Growth Factor-beta ; IFN-y: Interferon gamma; TNF-α: Tumor Necrosis Factor-alpha.*

TGF-β et fibrose bronchique dans la BPCO

Le rôle fondamental du TGF-β1 dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire est clairement établi, tant sur des modèles expérimentaux que chez des patients atteints de BPCO (84, 109, 112, 115). La surexpression de TGF-β par voie transgénique ou via un vecteur dérivé d'un adénovirus dans les poumons induit de la fibrose dans des modèles de souris (100, 117).

— Production du TGF

- La fumée de cigarette est une source majeure **d'espèces réactives de l'oxygène** (ROS), elle pourrait conduire à l'oxydation directe du LAP et donc à l'activation du pool de TGF-β latent présent dans l'épithélium bronchique (112).
- La fumée de cigarette peut également conduire à l'activation indirecte de TGF-β1 en **recrutant des neutrophiles et des macrophages**, qui sont de riches sources de ROS (112). Wang et *al.* ont démontré le TGF-β1 induisait un remodelage de la paroi trachéale de rats exposés à la fumée de cigarette (115). Pour eux, non seulement la fumée de cigarette entraînait une libération de TGF-β1 actif, mais aussi provoquait une production accrue de TGF-β1 susceptible de créer une boucle de rétroaction positive dans laquelle l'exposition continue à la fumée de cigarette conduirait à augmenter la production de TGF (115).
- Au niveau transcriptomique, Tazikawa et ses collaborateurs ont retrouvé une sur-expression de **l'ARNm du TGF-β1** dans l'épithélium bronchique de patients atteints de BPCO, corrélée à la gravité de l'obstruction des petites voies aériennes (116). Cette surexpression pourrait être secondaire à une réponse directe de l'épithélium à la fumée de cigarette (109).

— Mécanisme d'action du TGF

- Le mécanisme cellulaire le plus largement étudié du TGF-β1 est son ***effet direct sur les cellules mésenchymateuses et particulièrement les fibroblastes*** (112). Le TGF-β favorise la prolifération et l'activation des fibroblastes, et est un des stimulateurs les plus importants de la production de MEC (84, 100). Kenyon et ses collaborateurs ont montré que l'instillation intratrachéale de TGF-β1 recombinant à des souris Balb/C, augmentait le dépôt du collagène sous-épithélial, l'expression des gènes de collagène de type I et III, et la teneur totale en collagène dans les bronches lobaires et distales (115).
- Le TGF-β1 pourrait également induire une réponse fibrotique grâce à des ***mécanismes cellulaires indirects.*** Le TGF-β a le potentiel d'induire une TEM (99, 119). Des études *in vitro* ont ainsi montré que l'exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines au TGF-β1 induisait une TEM caractérisée par une transformation des cellules épithéliales en fibroblastes puis en myofibroblastes exprimant l'actine des muscles lisses (α-SMA), une réorganisation de l'actine-F, une perte du marqueur épithélial E-cadhérine et une production

de collagène I (120). Le TGF-β1 favorise la survie des myofibroblastes par inhibition de leur apoptose (73, 81).

- Les myofibroblastes sont aussi des cellules effectrices, produisant eux-mêmes du TGF-β (109, 118). Cet effet d'auto-induction pourrait favoriser l'action biologique locale du TGF-β amplifiant ainsi leur activité profibrogène (118).
- Les actions de plusieurs autres facteurs de croissance et cytokines profibrotiques (notamment le CTGF ou facteur de croissance tissulaire) sont liées à la fonction du TGF-β (figure 7).

Il existe des **inhibiteurs endogènes de la voie du TGF-β**: Interféron-γ (IFN-γ) et le Smad7 (84). L'inhibition de l'activité du TGF-β réduit de façon significative les fibroses cutanée, rénale et pulmonaire (85).

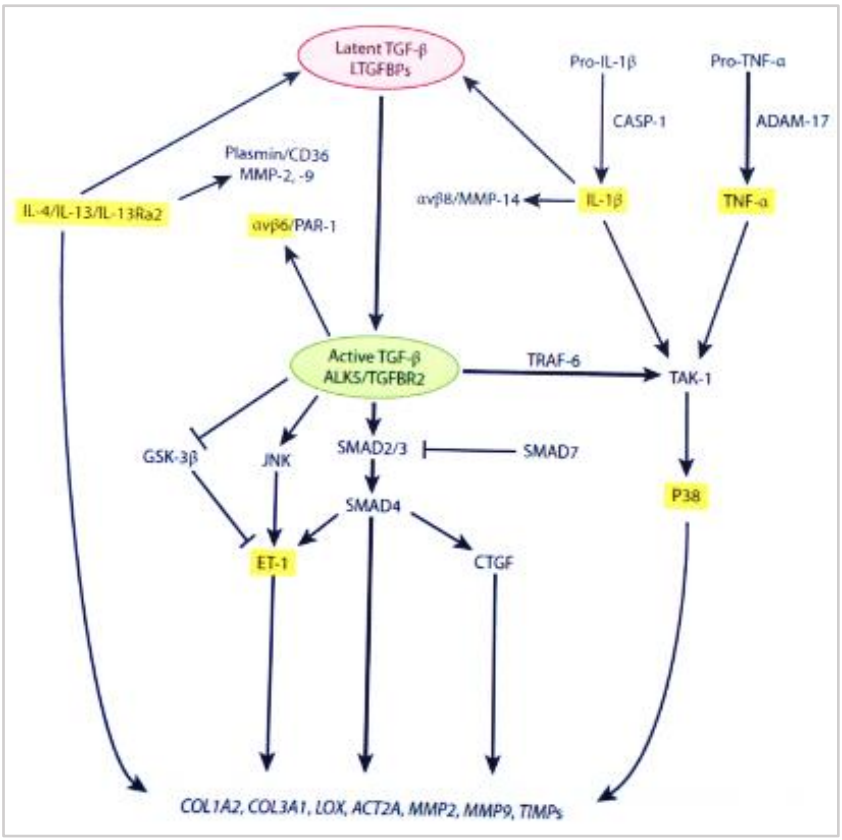


Figure 7. Rôle central du TGF-β dans la fibrogénèse pulmonaire (84)

CASP :caspase ; CTFG : facteur de croissance tissulaire ; ET-1 : endothéline-1 ; GSK : glycogène synthase kinase ; IL : interleukine ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; MMP : métalloprotéinase matricielle ; PAR-1 : récepteur de protéase activée-1 ; TAK-1 : protéine kinase du TGF- β activé-1 ; TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases ; TRAF-6 : récepteur associé au facteur TNF (facteur de nécrose tumorale)-6

L'expression du TGF-β latent peut être augmentée par une variété de cytokines (IL-1β et IL-4 / IL-13). Ces cytokines peuvent activer le TGF- β via une augmentation de l'activation des intégrines (IL-1 β) ou par des mécanismes indépendant des intégrines (IL-4, IL-13). Une fois activé, le TGF- β, soit influence directement l'expression de gène profibrosants (COL1A2, COL3A1, LOX et ACT2) ou l'expression génique de métalloprotéinases (MMP2, MMP9 et TIMP), ou agit comme un point de convergence de multiples voies de signalisation (GSK-3β, p38 et TNF-α) sur d'autres effecteurs fibrogènes (ET-1 et CTFG), contribuant ainsi à la

réponse fibrogénique. Un grand nombre d'entre eux représentent des cibles thérapeutiques pour la BPCO ou la fibrose pulmonaire (surligné en jaune).

Récemment, de nouvelles hypothèses de la fibrogénèse du remodelage bronchique de la BPCO ont émergé incluant la sénescence cellulaire pulmonaire et le stress oxydant.

3. Rôle de la sénescence cellulaire

Les mécanismes biologiques du vieillissement et plus précisément de la sénescence cellulaire font l'objet d'une recherche en plein essor. La sénescence cellulaire pourrait constituer un déterminant commun aux comorbidités liées à l'âge et notamment à certaines pathologies pulmonaires chroniques telles la BPCO ou la fibrose pulmonaire idiopathique (9). Ces comorbidités, classiquement liées à l'âge, telles la déminéralisation osseuse, la fonte musculaire, l'athérosclérose grèvent le pronostic de BPCO (9).

La sénescence se caractérise par une perte complète et irréversible de la capacité réplicative des cellules somatiques conduisant à l'arrêt définitif du cycle cellulaire. Les cellules sénescentes maintiennent une activité métabolique. Les cellules acquièrent une morphologie particulière avec une forme aplatie, un grand cytoplasme et une activité β–galactosidase acide servant de marqueur spécifique de la senescence lors d'études. L'activité lysosomiale accrue serait à l'origine de l'expression de la β-galactosidase active à pH 6.

Deux types de sénescence ont été décrits (figure 8) :

La sénescence réplicative est un processus physiologique défini par la perte des capacités de division de la cellule liée à un raccourcissement des séquences nucléotidiques situées aux extrémités des chromosomes appelées télomères (121). Les ADN polymérases n'ont pas la capacité de répliquer complètement les extrémités de l'ADN. Cette fonction est impartie à une polymérase spécifique, la télomérase (développé *en détails dans la section 2.3)* (122). Dans la BPCO, le raccourcissement des télomères est observé dans les cellules pulmonaires ainsi que les leucocytes. Lorsque la taille des télomères devient critique, un signal de senescence est envoyé à la cellule. Leur raccourcissement conduit à leur dysfonction activant ainsi des protéines comme ATM (ataxia telangiectasia muté), une protéine kinase impliquée dans la reconnaissance de dommage à l'ADN. L'activation d'ATM entraîne alors la transduction d'un signal qui va conduire notamment à l'activation de la protéine clé p21, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire qui inhibe la phosphorylation de Rb (protéine rétinoblastome). Ceci bloque donc la prolifération cellulaire. La sénescence réplicative est une senescence programmée, déterminée par le nombre de réplication (temps mitotique).

La sénescence prématurée ou senescence induite par le stress (SPIS), est un état de sénescence induit par des stimuli extérieurs, comme les rayons UV, l'irradiation ou le tabagisme. Le stress oxydant est probablement l'inducteur majoritaire de SPIS. Elle serait la conséquence des dommages oxydatifs induits notamment au niveau de l'ADN. (11). D'un point de vue signalisation, le stress oxydant conduit à l'activation de p38 MAPK, qui induit l'activation de la voie p53. L'inhibition de p16, est un élément déclencheur de la sénescence. Dans les fibroblastes humains, il a été montré que la sénescence peut être induite par le stress oxydant via le Transforming Growth Factor β (TGF-β). La sénescence prématurée survient sans altération de la taille des télomères. Néanmoins, des lésions télomériques peuvent être retrouvées indépendamment de la longueur du télomère et sans modification de l'expression de La télomérase. Certains agents toxiques moduleraient la fonction de protéines associées aux télomères comme la TRF-1, une protéine clé dans leur stabilité. De plus, la sénescence prématurée induite par le stress oxydant peut se combiner à une sénescence réplicative accélérée lors de certains processus pathologique comme la BPCO.

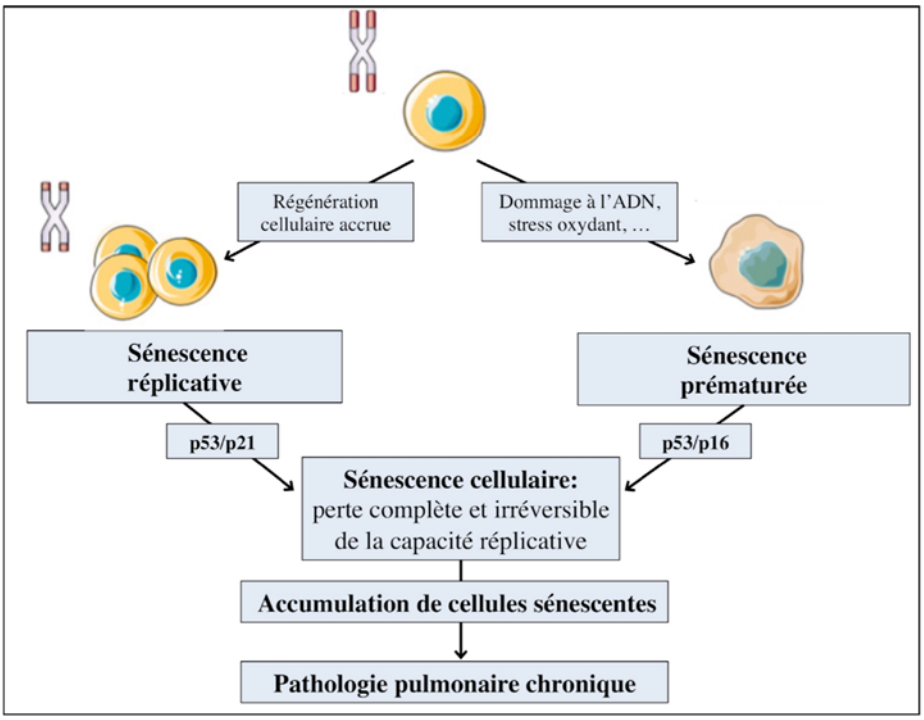


Figure 8. Sénescence réplicative et prématurée (adapté de Adnot et al. 2015 (10)

Les cellules sénescentes acquièrent la capacité de sécréter des facteurs de croissance pro-inflammatoires (*Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP*) **et d'induire la prolifération de cellules adjacentes** (121). Les cellules sénescentes modifient aussi leur environnement en sécrétant des cytokines (IL-6/8), des chemokines, des facteurs de croissance mais également des protéases de la matrice extracellulaire. Chez les patients atteints de BPCO, il a été montré une sénescence accélérée de diverses populations cellulaires : les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules

mésenchymateuses, les cellules alvéolaires de type II, les cellules endothéliales et les lymphocytes du sang périphérique (121-127).

Ces cellules sénescentes contribueraient à la pathogénèse de l'atteinte des bronches de la BPCO par différents mécanismes (127) :

- L'inhibition de la réparation des tissus (les cellules sénescentes demeurent viables mais sont incapables de se diviser et donc de réparer les anomalies tissulaires).
- L'inflammation chronique via le SASP.
- La sénescence accélérée des cellules de Clara pourrait contribuer à une inflammation excessive via l'activation de la MAPK p38 ou induire un remodelage de la matrice extracellulaire, via une augmentation de la sécrétion de métalloprotéases (122, 127).
- L'exposition *in vitro* de fibroblastes pulmonaires humains à la fumée de cigarette induit un phénotype sénescent, accompagné de l'activation des deux voies de signalisation p53 et p16, sans raccourcissement des télomères (128).

En résumé, la sénescence cellulaire (cellules épithéliales, mésenchymateuses bronchiques et immunes) pourrait-être impliquée dans un déficit de la réparation tissulaire, l'inflammation chronique, le remodelage de la matrice extracellulaire et la sensibilité accrue aux infections, qui sont des caractéristiques de la BPCO. Elle contribuerait ainsi à l'apparition et à la progression du remodelage des bronches (122, 123, 125, 127).

4. Rôle du stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants, caractérisé par un excès des oxydants, associé ou non à une déplétion des antioxydants (129 (11). Il existe de multiples sources d'oxydants, à la fois environnementales (tabagisme, ozone, oxydes d'azote, particules diesel), locales (macrophages alvéolaires et neutrophiles activés) et intracellulaires (métabolisme aérobie contrôlé par la respiration mitochondriales) qui aboutissent à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (ERA) (figure 9) (108, 211).). Le stress oxydant induit par la fumée de cigarette joue un rôle central dans le développement de la BPCO, par un excès de ROS. En effet, la fumée de cigarette constitue une source importante d'oxydants exogènes. Pour exemple, le NO (monoxyde d'azote) et le ONOO−(peroxynitrite) sont les composants majeurs de la fumée. Elle contiendrait environ 10^{16} de radicaux libres par bouffée. Les ROS libérées de façon endogène au cours du processus inflammatoire peuvent accentuer ce phénomène et contribuer à la progression de la maladie.

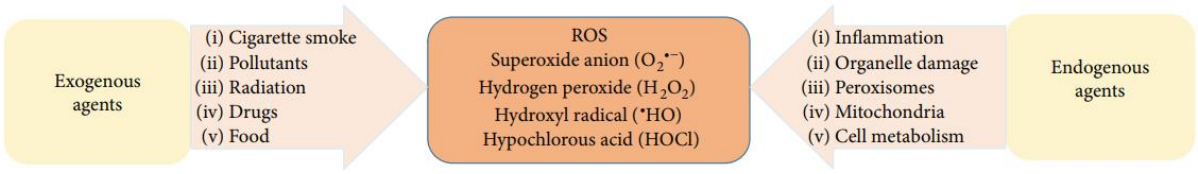


Figure 9. Sources endogènes et exogène des ROS (211)

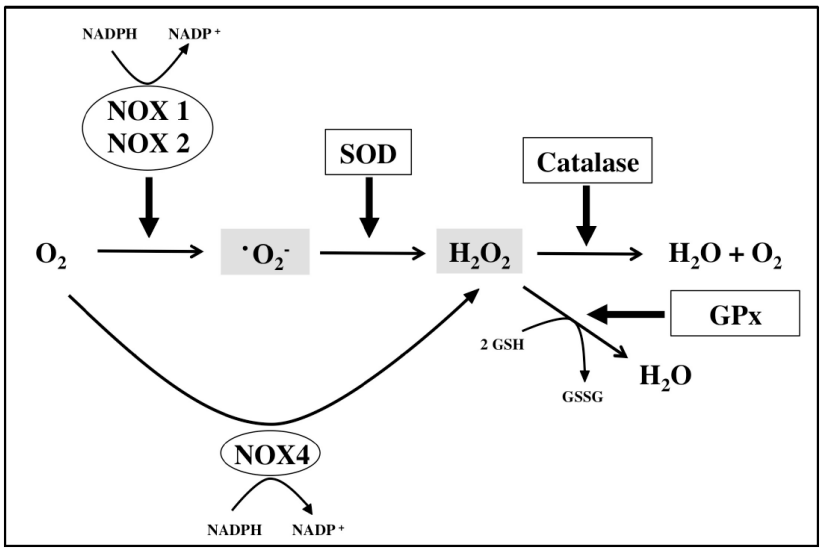


Figure 10. Systèmes enzymatiques pro-oxydants (entourés) et antioxydants (encadrés)
NOX : NADPH oxydase SOD : Superoxyde dismutase, GPx : Glutathion Peroxydase

Les systèmes pro-oxydants et anti-oxydants sont apparus comme possiblement impliqués dans l'apparition de lésions de fibrose tissulaire (figure 10). Le maintien de l'équilibre redox et énergétique intracellulaire via une réponse antioxydante adaptée permet de contrôler les processus inflammatoires et le remodelage tissulaire. La persistance d'une réponse insuffisante conduit à des lésions de remodelage bronchique et d'emphysème (108). Au niveau des voies aériennes, l'épithélium est particulièrement sensible au stress oxydant car les enzymes antioxydantes intracellulaires y sont faiblement exprimées et peu inductibles, notamment après exposition à la fumée de cigarette (108).

a) Système pro-oxydant : NADPH oxydase (Nicotamide Adénine Dinucléotide PHosphate-oxydases ou NOX)

L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut être le résultat d'une augmentation des mécanismes pro-oxydants. Parmi ceux-ci, on identifie la NADPH oxydase (**NOX**) qui catalyse le

transfert d'électrons de son substrat le NADPH à l'accepteur final l'oxygène entraînant la production d'O2°-. La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multi-protéique, situé au niveau de la membrane plasmique. Il existe 7 variantes de la NOX : NOX 1, 2, 3, 4, 5 et DUOX1 et 2 (pour Dual Oxydase). Dans le parenchyme pulmonaire et les voies aériennes, les NOX 1, 2 et 4 ainsi que DUOX1 et 2 sont majoritaires (131).

L'implication de NOX dans les lésions pulmonaires a pu être démontrée :

- Dans les processus fibrosants pulmonaires, la transformation des myofibroblastes sous l'effet du TGF-β implique NOX4 (132, 133).
- NOX4 est surexprimée dans les bronches de patients fumeurs ou BPCO, dans les cellules musculaires lisses de patients BPCO (NOX4 module la production de ROS (134), ainsi que in vitro après l'exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines aux extraits de fumées de cigarette
- Les molécules anti-oxydantes (N-acétyl-cystéine ou Apocynine) peuvent être utilisées pour reverser l'effet de NOX (135).

Il faut souligner que d'autres systèmes de sources d'anion superoxide, existent dans la cellule. Il s'agit de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la xanthine oxidoréductase mais ils semblent mois impliqués.

b) Systèmes Anti-oxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose, de systèmes de défense anti oxydants à la fois enzymatiques et non enzymatiques dans les différents compartiments cellulaires. Ceux non enzymatiques regroupent des petites molécules chargées de piéger les ERO, appelées « scavengers » tandis que les enzymes anti-oxydantes vont dégrader les ERO.

Les mécanismes enzymatiques font appel majoritairement à la SOD (superoxyde dismutase), la catalase et la GPx (glutathion peroxydase) (figure 10).

➢ Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une métalloprotéine qui représente la première ligne de défense contre le stress oxydant en assurant la transformation de l'anion superoxyde O2- en peroxyde d'hydrogène et en oxygène par une réaction de dismutation.

L'implication de la SOD dans les lésions pulmonaires a pu être démontrée :

- Une diminution de l'activité SOD est observée chez des patients fumeurs âgés de plus de 55 ans par rapport à des sujets non-fumeurs (136).
- L'administration d'un activateur de la SOD prévient le développement de l'emphysème dans un modèle murin d'emphysème induit par l'élastase (137)

➢ Catalase

La catalase joue un rôle central dans le système antioxydant pulmonaire, en raison de son aptitude à convertir le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau. Elle est constitutivement exprimée dans les cellules épithéliales des voies respiratoires et les macrophages alvéolaires chez les adultes. Elle semble jouer un rôle essentiel dans la protection des dommages cellulaires induits par la fumée de cigarette. Contrairement à la plupart des antioxydants, la catalase n'est pas augmentée dans l'épithélium bronchique chez les fumeurs sains (138). Une diminution de la catalase dans les voies aériennes des patients BPCO a été observée, dépendante de la durée d'exposition à la fumée de cigarette (139).

➢ Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une enzyme qui catalyse la réduction de H_2O_2 ainsi qu'une grande variété d'hydroperoxydes, en utilisant le glutathion comme agent réducteur et ainsi protège les membranes biologiques et les composants cellulaires contre le stress oxydatif. L'isoforme 1 (GPx-1) est la plus représentée et est impliquée dans le développement de nombreuses pathologies (140).

L'implication de la GPx dans les lésions pulmonaires a pu être démontrée :

- l'activité GPx est significativement réduite chez les fumeurs et les patients atteints de BPCO, suggérant son rôle dans la défense anti-oxydante du poumon (141).
- l'exposition à la fumée de cigarette induit à court terme des niveaux d'inflammation plus importants chez les souris GPx-1 déficiente versus Wild type (142). Ces données suggèrent que la GPx-1 intervient dans le contrôle de l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette.

De nombreux antioxydants endogènes sont produits pour maintenir l'homéostasie de la balance oxydants/antioxydants dans le voies respiratoires (143). Le **gluthation (GSH)** est un antioxydant majeur dans les CEB et les fluides recouvrant les cellules épithéliales, tandis que les CEB servent de source pour l'augmentation de la glutathion peroxydase extracellulaire (143). Le GSH et son système d'oxydoréduction peuvent inactiver les espèces réactives et sont importants pour la détoxification des peroxydes lipidiques ou d'autres métabolites toxiques dans les tissus pulmonaires (143). Un

stress oxydatif modéré améliore les niveaux de glutathion dans les CEB humaines, et est associé à une tolérance cellulaire au stress oxydatif (143). Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté une diminution significative du taux de GSH intracellulaires dans les CEB, parfois jusqu'à l'épuisement total du stock intracellulaire disponible, après exposition à la fumée de cigarette (143). Plus récemment, il a été démontré que les voies de signalisation des systèmes antioxydants pourraient être modifiées par méthylation de l'ADN dans les bronches de patients BPCO (143). Ces résultats indiquent un manque de protection chronique contre le stress oxydatif (143).

c) Stress oxydant et fibrose péri-bronchique

Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogénèse de la BPCO (108) (figure 11).
Près de 200 gènes impliqués dans les phénomènes de stress oxydant sont surexprimés dans les cellules bronchiques de patients fumeurs avec une BPCO comparés à des patients fumeurs sans BPCO (143).
L'augmentation de la charge oxydative dans les cellules des bronches est liée d'une part à la production de ROS par les cellules épithéliales bronchiques (CEB) en réponse à différents stimuli et d'autre part à la production endogène de ROS (143). Les CEB exposées à la fumée de cigarette libèrent des oxydants soit directement après l'agression de l'épithélium bronchique soit indirectement par modulation de l'expression et de l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires redox-sensibles. En effet, les MAPKs et surtout, le facteur nucléaire kappa B (NF-kB) amplifient l'inflammation et l'afflux de cellules inflammatoires (figure 12) (108, 143, 144). NF-κB joue un rôle important dans le SASP.

D'autres facteurs de transcription, comme par exemple l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) sont également activés après exposition à la fumée de cigarette (143). Ces voies de signalisation contribuent toutes à des degrés divers, à l'expression de médiateurs inflammatoires tels que le TGF-β dans les CEB qui vont stimuler la production des constituants de la MEC par les fibroblastes. L'augmentation de la charge oxydative a ainsi pour corollaire une amplification de la réponse inflammatoire et destructrice (143).

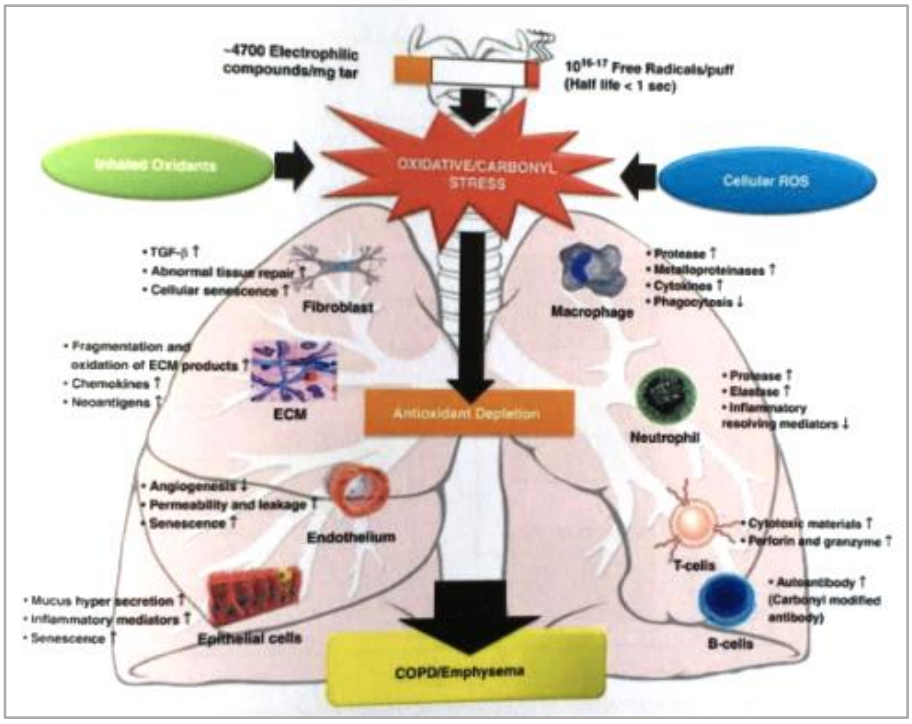


Figure 8. Stress oxydant et BPCO (128).

TGF-β : *Transforming Growth Factor-beta ; ECM : Matrice extracellulaire ; COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease ; ROS : espèces réactives d'oxygène.*

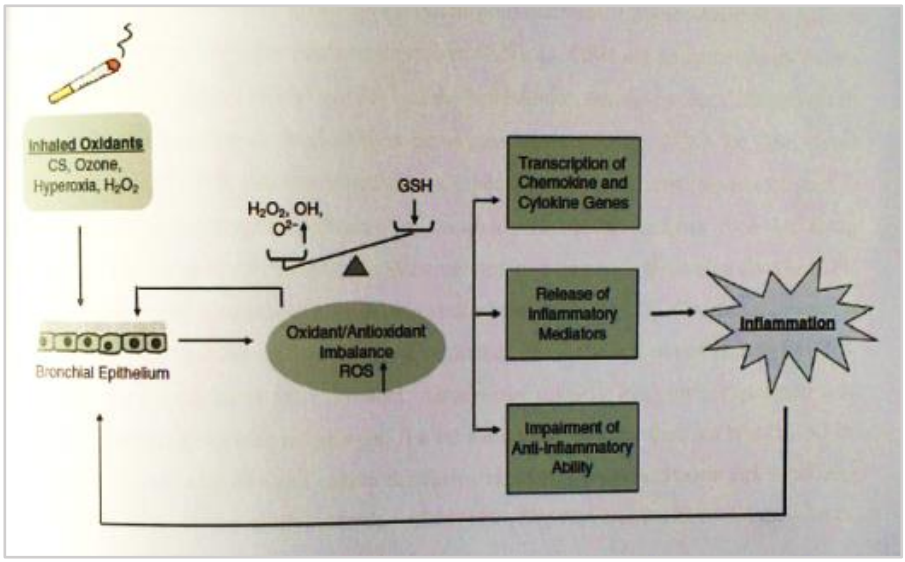


Figure 9. Cellules épithéliales bronchiques et stress oxydant (143)

ROS : *espèces réactives d'oxygène ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; OH^- : ion hydroxyde ; O^{2-} : ion superoxyde ; CS : cigarette smoke.*

Des études récentes indiquent que les NOX (surtout l'isoforme NOX4) seraient en partie responsables de la **génération endogène des ROS** (145) et occuperaient un rôle central dans la

différenciation des myofibroblastes, la production de MEC et la contractilité des myofibroblastes par le TGF-β1.

- Les ROS peuvent induire la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes (146-148) en combinaison avec le TGF-β1 (148). Le TGF-β1 est connu pour augmenter l'activité générale des NOX et provoquer spécifiquement la surexpression de NOX2 et NOX4. Seule l'inhibition de NOX3 provoque une réduction de l'expression de α-SMA et de la fibronectine, ainsi qu'une diminution de la réponse au TGF-β1 (147, 148). Ces résultats témoignent de l'existence d'une association très étroite entre les NOX et les pathologies fibrotiques, basée sur la modulation de la signalisation du TGF-β1 (147, 148).
- Les ROS jouent un rôle central dans la différenciation des myofibroblastes par un processus de TEM, en lien avec le TGF-β1 : inhibition par des antioxydants d'une TEM induite par le TGF-β1 (143, 147, 148). Aussi, les ROS non seulement influencent le comportement des myofibroblastes, mais sont également produits par eux comme agents de signalisation extracellulaires (148).
- les ROS peuvent augmenter à la fois l'obstruction des petites voies aériennes par le mucus *in vivo* et l'expression des gènes de mucine (MUC5AC) *in vitro* par l'activation des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans les CEB (143). L'activation de l'EGFR module en plus la prolifération des CEB induite par le stress oxydant (143).

En résumé le stress oxydant, notamment secondaire à l'exposition à la fumée de cigarette, peut entraîner une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires et l'activation en retour des gènes protecteurs contrôlant la réponse anti-oxydante. Au cours de l'inflammation chronique, l'équilibre entre les gènes des médiateurs inflammatoires et des antioxydants peut être rompu en faveur des médiateurs pro-inflammatoires. Il est possible que le stress oxydant soit augmenté pendant les processus de réparation tissulaire par diminution des taux de GSH, conduisant ainsi à la pathologie (149).

La pathogénèse du remodelage bronchique, et singulièrement de la fibrose péri-bronchique, dans la BPCO demeure un domaine d'investigation intense. La fibrose péri-bronchique est le résultat d'une réparation anormale suite à une blessure de l'épithélium des bronches. Les hypothèses pathogéniques de cette fibrose sont essentiellement :

- Une cicatrisation anormale des bronches en réponse à un phénomène inflammatoire chronique initiateur, au cours duquel l'activation des cellules effectrices conduit à la libération de médiateurs directs de l'inflammation et à la production de cytokines amplifiant le phénomène inflammatoire ;
- Une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance profibrotiques tels le TGF-β, en réponse directe aux stimuli agressifs de l'épithélium bronchique comme la fumée de cigarette,
- Ces facteurs de croissance conduisent à l'activation, la prolifération et la contraction des fibroblastes dans le tissu conjonctif et par conséquent à l'augmentation de la production de MEC.
- Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogénèse de la BPCO

  La sénescence cellulaire inhiberait la réparation bronchique et amplifierait l'inflammation chronique.

II. LA TELOMERASE

L'hypothèse du rôle de la télomérase dans la BPCO a émergé du fait de l'implication de la sénescence dans la pathogénèse de la fibrose péri-bronchique. Des défauts dans la régulation ou l'expression de composants de la télomérase ont été associés à des maladies liées au vieillissement comme la fibrose pulmonaire idiopathique, la fibrose induite par la bléomycine et l'emphysème. (15, 169, 170). Nous exposerons dans cette deuxième partie les éléments tirés de la littérature suggérant l'implication de la télomérase dans les pathologies pulmonaires fibrosantes qui ont justifié le travail expérimental que nous présenterons dans la troisième partie.

A. **Généralités**

Le prix nobel de médecine 2009 a été attribué aux Américains Elizabeth Blackburn, Carol Greider et Jack Szostak, pour avoir résolu un problème majeur de la biologie : « comment les chromosomes peuvent-ils être copiés de façon complète lors de la division cellulaire et comment sont-ils protégés de la dégradation ». La solution est à rechercher aux extrémités des chromosomes ou télomères et dans l'enzyme télomérase (150).

Les télomères sont constituées d'une séquence nucléotidique (5'-TTAGGG-3') répétée non codante associées à six complexes protéiques spécialisées ou shelterin (figure 13) (151). Ils permettent non seulement de protéger le génome d'une perte d'information due à un raccourcissement progressif des chromosomes, mais aussi de protéger les extrémités naturelles des chromosomes contre les fusions bout à bout et les recombinaisons dues aux systèmes de réparations des dommages de l'ADN (152, 153). Les télomères ont des rôles clés dans divers processus cellulaires telle la régulation de l'expression génique et de la division cellulaire, la sénescence cellulaire et le cancer (153).

La télomérase, une ribonucléoprotéine aux propriétés uniques et douée d'une activité transcriptase inverse, permet de rallonger les extrémités télomériques par addition de séquences télomériques spécifiques à leurs extrémités 3', et ainsi de limiter leurs érosions au cours des divisions cellulaires (156, 157). Cette enzyme contient deux composants majeurs indissociables de son activité et plusieurs autres protéines associées dans la dyskérine (figure 14) (158, 159). Le premier composant est la sous-unité catalytique ou transcriptase inverse de la télomérase (hTERT, *human telomerase reverse transcriptase)* ; le second est un ARN (TERC, *telomerase RNA component*), dont une partie de la séquence complémentaire à TTAGGG sert de matrice pour la synthèse *de novo* de séquences télomériques. Si la plupart des cellules somatiques humaines expriment constitutivement la matrice ARN (TERC), ce n'est pas le cas de la sous-unité catalytique (hTERT). Par conséquent, il est considéré

que l'activité de la télomérase dans la cellule dépend de la présence ou de l'absence de hTERT (157, 160).

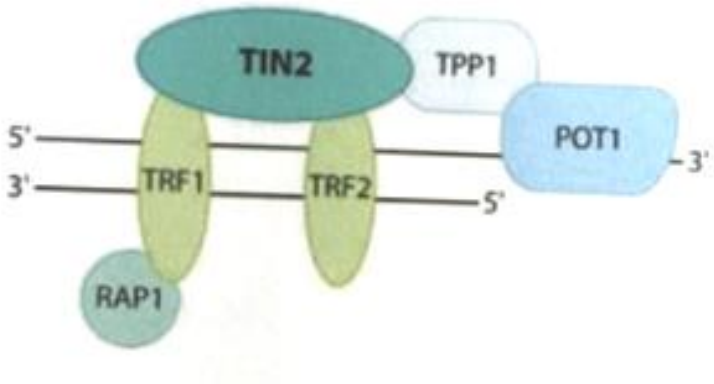


Figure 10. Structure d'un télomère (155).

Abréviations : *POT1 : protection of telomere 1 ; TRF 1et2 : telomeric repeat-binding factor 1et2 ; RAP1: repressor/activator protein 1 ; TIN2 : TRF1- and TRF2-interacting nuclear protein 2 ; TPP1 : protein associated with POT1.*

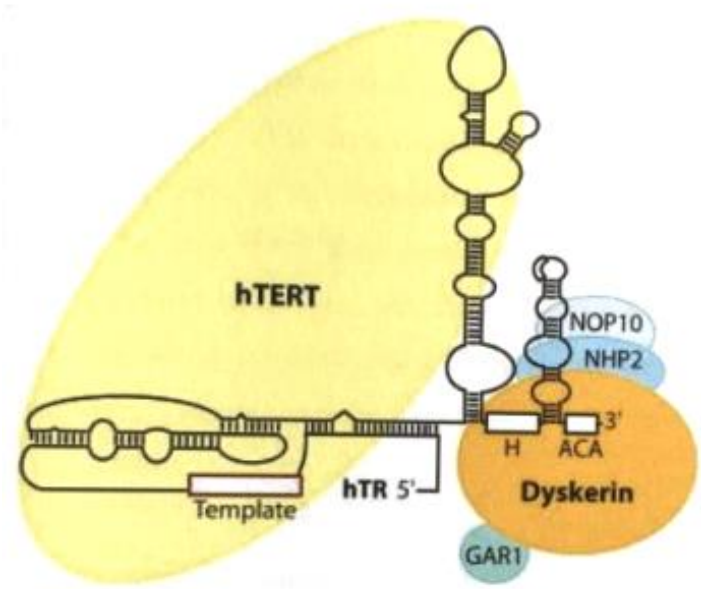


Figure 11. Composants essentiels de la télomérase (155)

hTERT : human telomerase reverse transcriptase ; hTR : human telomerase RNA ; NOP10 ribonucleoprotein ; NHP12 : NHP2 ribonucleoprotein ; H/ACA : small nucleolar RNAs (snoRNAs) ; GAR1: GAR 1 ribonucleoprotein homolog.

B. **Fonctions télomériques de la telomérase**

Dans des cellules dépourvues de télomérase, on assiste à un raccourcissement des télomères au cours des divisions cellulaires. Chaque division cellulaire s'accompagne d'une perte de 30-150 paires de bases d'ADN télomériques dans les cellules somatiques normales (161). Cette perte d'ADN non codant aux extrémités des chromosomes aboutit finalement à une réduction de la longueur es télomères jusqu'à une certaine longueur critique (162, 163). Lorsque des télomères atteignent cette taille, la cellule entre en sénescence réplicative avec pour conséquence l'arrêt de sa prolifération. Aussi les mutations de TERC ou hTERT réduisant l'activité de la télomérase aboutissent en un raccourcissement télomérique tant chez les hommes que les souris. De même, l'activation de la télomérase permet de contrer ou de freiner cette érosion télomérique naturelle ou pathologique par ajout des séquences d'ADN télomériques aux extrémités des chromosomes, confirmant le rôle primaire de la télomérase dans le maintien de la longueur des télomères (164, 165).
Les cellules hautement prolifératives telles les cellules germinales, les trophoblastes, les cellules hématopoïétiques, les cellules endométriales et plus de 95% des cellules tumorales expriment la télomérase à divers degrés (161). La majorité des cellules somatiques présentent une activité télomérase indétectable (161). La télomérase établit pour le télomère une longueur optimum hautement régulée dans la cellule via le shelterin et des kinases qui régulent l'action de la télomérase sur les télomères (165).

C. **Fonctions extra-télomériques de la télomérase**

La télomérase possède en effet des fonctions physiologiques supplémentaires indépendantes de la maintenance de la longueur des télomères (151, 158, 166-168), notamment dans la biologie des cancers (151).
Ces fonctions extra-télomériques incluent (151, 156, 168) :

- la régulation de l'activité mitochondriales,
- la régulation de la prolifération cellulaire,
- la protection contre l'apoptose,
- une meilleure activité de réparation de l'ADN et la modulation de profils d'expression génique (154).
  La régulation des signalisations WNT/β-caténine et NF-kB
- la protection contre le stress oxydant, associée à une réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires (12, 13). Il a été montré expérimentalement que l'absence de télomérase favorisait le stress oxydatif via une diminution de l'activité catalase (14).

D. Télomérase et pathologies fibrosantes

Des défauts dans la régulation ou l'expression de composants de la télomérase ont été associés à des pathologies humaines (169). Par exemple, une régulation positive de la télomérase a été identifiée dans de nombreux cancers humains, tandis qu'une diminution de l'activité télomérase et/ou une présence de télomères courts ont été associées à plusieurs maladies liées au vieillissement prématuré, comme la BPCO ou la fibrose pulmonaire (15, 169, 170).

1. Mutations de la télomérase et pathologies fibrosantes

Récemment, plusieurs processus pathologiques ont été associés à des mutations de la télomérase (15, 155, 171, 172).

- La **dyskératose congénitale** fut la première pathologies associée à une dysfonction des télomères a être observée (173).
- Les mutations hTERT ou hTR conduiraient à un dysfonctionnement de la télomérase et, par conséquent, contribueraient au **développement et à la progression de la FPI** (15, 169, 172). En effet, les mutations de la télomérase ont été retrouvées dans plus de 15% des formes familiales et environ 3% des formes sporadiques ; et les patients atteints de FPI étaient porteurs de mutations en majorité hétérozygotes d'un des gènes de la télomérase (hTERT ou hTR) (173). Aussi, les individus affectés par une FPI conservent approximativement 50% de l'activité de la télomérase, insuffisant pour maintenir une longueur adéquate des télomères (173). Ainsi, les patients atteints de FPI et porteurs de mutations de la télomérase avaient des télomères plus courts par rapport aux autres membres de leurs familles, ayant le même âge et indemne de toute mutation, suggérant que la déficience en télomérase pourrait être la cause sous-jacente de e phénotype (169). Enfin, la FPI est également une manifestation clinique de la DKC, comme en témoigne les 20% d'enfants atteints de DKC développant une FPI (173).

  Par ailleurs, les mutations de la télomérase seraient associées à des phénotypes hétérogènes de maladies pulmonaires au sein d'une même famille (174). Nunes et ses collègues, ont corroboré cette hypothèse en rapportant le cas d'une famille porteuse d'une mutation du gène hTERT de la télomérase. Dans cette famille, plusieurs personnes étaient atteintes d'un emphysème ou d'un syndrome de fibrose pulmonaire et d'emphysème combinés (15, 175). En effet, l'emphysème et la FPI, bien que distinctes, coexistent fréquemment et l'exposition à la fumée de cigarette est connue pour accélérer l'apparition de ces deux pathologies (174, 176, 177). Plus récemment, il a été montré que des mutations de la télomérase

constitueraient un facteur de risque d'emphysème sévère pour les fumeurs (176). Stanley et *al.* ont ainsi rapport 3 cas de mutations de la télomérase chez 292 fumeurs atteints d'emphysème sévère, soit une prévalence d'environ 1% (176). Aussi, d'autres auteurs ont également rapporté la découverte de cas de syndrome de fibrose pulmonaire et d'emphysème combinés dans une famille porteuse d'une mutation de hTERT (un cas) et chez deux sœurs porteuses d'une mutation de hTR avec des antécédents de tabagisme (2 cas) (176).

Au total, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les mutations germinales de la télomérase sont associées à la fibrose pulmonaire, à l'emphysème ou à un syndrome de fibrose pulmonaire et d'emphysème combinés. Pour confirmer cette prédisposition des sujets atteints de ces mutations à développer la FPI et l'emphysème, diverses hypothèses ont été testées sur des modèles animaux.

2. Modulations de la télomérase et pathologies fibrosantes

Plusieurs modèles murins de fibroses pulmonaires, avec ou sans modulation génique ou pharmacologique de l'activité télomérase, ont été utilisé pour étudier les rôles de la télomérase dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire.

Ils ont fourni des résultats contradictoires et leur contribution à l'étude des maladies liées au système télomères/télomérase a été limitée (173, 178, 179). Les lésions pulmonaires consécutives à l'instillation de bléomycine chez l'animal (un modèle expérimental imparfait, mais très utilisé pour mimer la FPI) sont associées à l'induction de la télomérase dans le poumon (169, 178). La bléomycine est un agent conduisant à la formation de radicaux libres.

- Pour Fridlender et *al.* cette induction de l'activité télomérase aurait pour conséquence une diminution de l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires et de la fibrose pulmonaire associée (178).
- Chez les souris déficientes en télomérase (TERT hétérozygotes), l'induction pharmacologique de la télomérase a été associée à une protection contre la fibrose bronchique via une réduction de la sénescence des cellules épithéliales (179).

  Ces résultats démontrent que les cellules épithéliales sont sensibles à l'activation de la télomérase et que l'activité accrue de la télomérase est importante pour le maintien de l'intégrité de l'épithélium et de la survie cellulaire (179)
- Povedana et *al.* ont rapporté un rôle protecteur de la télomérase dans la fibrose pulmonaire par la tolérance de faibles doses de bléomycine par des souris de type sauvage ; à l'inverse

les souris déficientes en télomérase développaient une fibrose pulmonaire secondaire à la sénescence et à l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires avec ces mêmes doses de bléomycine (171).

— Pour Liu et ses collaborateurs, l'activité télomérase serait nécessaire à l'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine chez la souris (181-183). Dans leurs études, les souris déficientes en télomérase (TERT) ont montré une réduction significative de la fibrose pulmonaire (181).

De façon discordante, certains auteurs rapportaient une absence d'effet de la télomérase dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

— Les souris déficientes en télomérase développaient une fibrose pulmonaire similaire à celle développée par les souris témoins en cas d'agression pulmonaire par la bléomycine (180).
— Les souris déficientes en télomérase exposées à la fumée de cigarette pendant 6 mois ont développé un emphysème mais pas de fibrose. Ces modèles de souris n'ont mis en évidence qu'une seule pathologie, l'emphysème, parmi toutes celles observées chez les sujets présentant une déficience en télomérase (173, 177).

La fibrose pulmonaire est caractérisée par l'augmentation du nombre de fibroblastes et leur transformation en myofibroblastes (78). Ces derniers représentent un facteur clé de la synthèse accrue et du dépôt de la MEC caractéristique de la fibrose (184).

Les travaux de Phan et *al.* suggèrent qu'au cours de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, se produit initialement une activation de la télomérase dans les fibroblastes pulmonaires favorisant une accumulation de ces fibroblastes constituant la phase de « fibrose active » (185). Ce résultat suggère que la télomérase pourrait participer à la pathogénèse de la fibrose, à un stade précédant l'émergence des myofibroblastes ou la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (184, 186). L'induction de l'expression de la télomérase dans la fibrose pulmonaire par la bléomycine, pourrait faire intervenir le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), alors que la différenciation myofibroblastique subséquente, pourrait être sous l'influence de l'IL-4 et/ou du TGF-β. Elle se traduirait alors par une baisse de l'activité de la télomérase accompagnée par une expression accrue de l'α-SMA, un indicateur de la différenciation des myofibroblastes (184).

Dans ce modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'inhibition de l'activité ou de l'expression de la télomérase par un traitement pharmacologique induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes alors que l'activation de la de la télomérase par le bFGF bloque cette différenciation de fibroblastes en myofibroblastes (186)

La même équipe a rapporté que la déficience en TERT chez la souris fournissait une protection contre la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, en limitant l'accumulation de fibroblastes dans la phase initiale (170, 181). Cette déficience en TERT a été associée à une réduction du potentiel de prolifération et à une augmentation de la sensibilité à l'apoptose des fibroblastes (170, 181).

En résumé ces résultats suggèrent un rôle régulateur essentiel de la télomérase dans la prolifération des fibroblastes et la transformation de ces fibroblastes en myofibroblastes.

E. Modulation pharmacologique de la télomérase

Des preuves croissantes montrent que le cancer est une maladie associée au vieillissement et que cancer et vieillissement partagent de nombreuses voies moléculaires (187, 188).
Des études récentes ont proposé l'activation de la télomérase en tant que cible thérapeutique potentielle pour les maladies liées à l'âge (REF+++). Une expression anormale de la télomérase et des mutations de la télomérase ont été associées à de nombreux types de tumeurs humaines (187, 188).
Le rôle de la télomérase a été montré non seulement dans l'allongement des télomères, mais aussi dans l'activation de Wnt (gènes impliqués dans les cancers).
Comprendre l'impact physiologique de la régulation de la télomérase est fondamental compte tenu des stratégies thérapeutiques en cours de développement (187, 188).
Il existe deux types de modulateurs de la télomérase : les activateurs comme le TA-65 qui en activant la télomérase pourrait avoir un intérêt pour enrayer le phénomène de vieillissement, à l'opposé les inhibiteurs de la télomérase, comme l'Imetelstat, capable d'endiguer la prolifération non contrôlée de lignées tumorales.
Les principales publications ont étudié les effets télomériques des modulateurs de la télomérase. Mais les effets extra-télomériques restent peu étudiés à ce jour. **Notre travail portera sur l'éventuelle implication** des effets extra-télomériques des modulateurs de la télomérase dans la fibrose péri-bronchique.

1. Activation de la protéine télomérase : TA-65

Astragalus membranaceus est une plante médicinale couramment utilisée dans de nombreuses formulations à base de plantes dans la pratique de la médecine traditionnelle chinoise (MTC). Elle est utilisée pour traiter une grande variété de maladies et de troubles corporels, et commercialisée comme extrait prolongeant la vie pour l'homme en Chine, depuis plus de 2000 ans (189).
Des recherches pharmacologiques menées par des équipes chinoises indiquent que le composant extrait d'*Astragalus membranace*us peut augmenter l'activité de la télomérase et possède des effets

antioxydants, anti-inflammatoires, immunorégulateurs, anticancéreux, hypolipidémiants, antihyperglycémiants, hépatoprotecteurs, expectorants et diurétiques (189).

Le TA-65, une entité chimique isolée de l'extrait de racine d'*Astragalus membranaceus*, permet d'améliorer certains indicateurs de santé, notamment la tolérance au glucose, l'ostéoporose et la condition cutanée, sans augmenter significativement l'incidence globale du cancer chez les souris femelles (190).

a) Effets sur la longueur des télomères (anti-vieillissement) du TA-65

Les télomères courts sont associés au vieillissement et à de nombreuses maladies (191-193).

L'activation de la télomérase pourrait maintenir la longueur des télomères, retarder le vieillissement et inverser la dégénérescence des tissus (194, 195).

L'action du TA-65 sur l'activation de la télomérase et l'allongement des télomères a été montré :

- dans un modèle cellulaire de raccourcissement des télomères - cellules IMR90 (196)
- dans les globules rouges et produire un taux plus élevés de renouvellement des plumes chez les diamants mandarins(oiseaux) en captivité (197).
- dans les fibroblastes embryonnaires de souris haplo-insuffisants et les souris âgées, avec diminution du pourcentage de dommages à l'ADN et régulation de la proportion relative de leucocytes circulants.
- Chez 117 sujets sains, âgés de 53 à 87 ans, séropositifs au cytomégalovirus, une étude clinique randomisée, en double aveugle et contre placebo, a montré que le TA-65 pouvait allonger les télomères (198).

Une étude portant sur 7 000 personnes sur une période de cinq ans a révélé que le TA-65 améliore les marqueurs de la santé métabolique, osseuse et cardiovasculaire, sans effet indésirable, ce qui suggère que le TA-65 pourrait améliorer l'état de santé et réduire le risque de morbidité (199).

b) Effets immunorégulateurs du TA-65.

Le TA-65 exerce des effets sur les populations ces cellules circulantes du système immunitaire avec, notamment une baisse significative du pourcentage de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et de cellules NK sénescentes, en particulier chez les sujets séropositifs au cytomégalovirus sur une période d'un an (200).

Le TA-65 augmente l'activité de la télomérase en régulant la voie spécifique de MAPK et en augmentant l'activité prolifératives des cellules T CD4+ et CD8+ humaines en culture provenant de donneurs sains, (201).

2. Inhibition de la protéine télomérase : Imetelstat

Actuellement, plusieurs molécules, oligonucléotides ou *small-molecule inhibitors,* capables d'inhiber directement la télomérase sont développées à visée thérapeutiques.. Le GRN163L, aussi appelé Imetelstat, est sans doute la molécule la plus avancée (202).

Le GRN163L est un oligonucléotide 13-mer qui agit comme inhibiteur direct de la télomérase par antagonisme de la liaison à la matrice d'ARN de la télomérase (hTR) (202,203).

Les études précliniques utilisant le GRN163L ont montré une inhibition efficace de la télomérase. Le traitement des cellules cancéreuses d'adénocarcinome mammaire a montré une réduction en tumorigénicité cellulaire et en invasivité (204, 205).

Cependant, les effets du traitement à long terme avec les inhibiteurs de la télomérase n'ont pas encore été étudiés et il n'y a actuellement aucune information claire sur leurs effets sur les cellules normales qui expriment de manière transitoire la télomérase, telles que les cellules germinales (206).

Deux études cliniques évaluant l'imetelstat ont été publiées dans l'édition du New England Journal of Medicine du 3 septembre 2015, dans la thrombocythémie essentielle et dans la myélofibrose.

- Actuellement les thérapies utilisées dans les **thrombocythémies essentielles** de haut risque ne font que réduire la numération plaquettaire sans agir sur le mécanisme clonal intrinsèque sous-jacent (207-209). In vitro, l'imetelstat, réduit l'activité télomerase et inhibe la prolifération spontanée des mégacaryocytes obtenus à partir d'échantillons de patients atteints de thrombocytémie essentielle (210). Les résultats d'un essai de phase II, ouvert, multicentrique, international, testant l'efficacité et la tolérance de l'imetelstat chez des patients atteints de thrombocythémie essentielle nécessitant une cytoréduction et n'ayant pas répondu ou ayant mal toléré au moins un traitement préalable ont été présenté en 2015. Dans cette étude, l'Imetelstat a permis d'obtenir un taux de réponse globale dépassant ceux de l'hydroxyurée, de l'interféron alpha et de l'anagrelide, ainsi que des réponses moléculaires partielles, ce qui n'avait jusqu'alors été obtenu que très rarement avec les thérapies conventionnelles. Seize des 18 patients de l'étude ont obtenu une rémission hématologique complète. Les effets indésirables sont pour la majorité de bas grade (18). L'Imetelstat constitue une nouvelle molécule prometteuse pour les patients atteints de thrombocythéme essentielle en rechute après thérapies conventionnelles ou qui y sont intolérants.
- Les médicaments actuels pour la **myélofibrose associée aux néoplasmes myéloprolifératifs**, y compris les inhibiteurs de Janus kinase (JAK), ne provoquent pas de rémission complète ou partielle. L'étude publiée dans le NEJM présente des résultats préliminaires sur l'activité thérapeutique et la sécurité d'imetelstat chez les patients atteints de myélofibrose à risque

élevé ou intermédiaire-2 (19). Trente-trois patients (âge médian: 67 ans) répondaient aux critères d'éligibilité de cette étude ; 48% avaient déjà reçu un traitement par inhibiteur de JAK. Une rémission complète ou partielle est survenue chez 7 patients (21%) sous traitement par l'Imetelstat, avec une durée médiane de réponse de 18 mois (extrêmes: 13 et 20 mois) pour les réponses complètes et 10 mois (intervalle, 7 à 10 mois) pour les réponses partielles (19). La fibrose de la moelle osseuse a été inversée chez les 4 patients ayant présenté une réponse complète, et une réponse moléculaire est survenue chez 3 des 4 patients. Les réponses à l'Imetelstat n'étaient pas liées à longueur des télomères (19).

— Les effets indésirables liés au traitement ont inclus une thrombocytopénie de grade 4 (chez 18% des patients), une neutropénie de grade 4 (chez 12%), une anémie de grade 3 (chez 30%), et une augmentation de grade 1 ou 2 des taux de bilirubine totale (chez 12%), de phosphatase alcaline (dans 21%) et l'aspartate aminotransférase (dans 27%) (19).

En conclusion, cette étude montre que l'Imetelstat s'est révélé actif chez les patients atteints de myélofibrose mais avait également le potentiel de provoquer une myélosuppression cliniquement significative (19).

La télomérase est une transcriptase inverse (RT) qui synthétise de l'ADN télomérique aux extrémités des chromosomes. Elle est au minimum composée d'une sous-unité protéique, hTERT, et d'un composant ARN, hTR. Par ailleurs, en plus de sa fonction canonique de maintenance de la longueur des télomères, il existe des preuves croissantes sur l'existence de fonctions non canoniques de la télomérase. La télomérase, en particulier hTERT, serait impliquée dans le processus du développement, la différenciation cellulaire et certains processus pathologiques. Ainsi une activité télomérase anormale a été associée à la plupart des cancers humains et plusieurs maladies liées au vieillissement prématuré, comme la FPI et l'emphysème. Ces dernières années, l'implication de la télomérase dans la pathogénèse de fibrose pulmonaire a été montrée comme pouvant être multiple :

- Aux niveaux moléculaire et cellulaire, la déficience en télomérase ou l'inhibition de la télomérase augmente la transcription de l'α-SMA, témoin d'une différenciation en myofibroblastes
- Au niveau maladie, les mutations de la télomérase (hTERT ou hTR) associées à la FPI ont mis en évidence la relation causale entre une faible activité de la télomérase et la survenue de fibrose pulmonaire chez l'homme. Des études additionnelles, utilisant des souris déficientes en télomérase, ont confirmé la nécessite de la télomérase pour l'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine.

III. Travail expérimental

Ce travail expérimental a été réalisé au sein de l'Unité INSERM U955, Equipe 4, Faculté de Médecine, Créteil sous la direction du Docteur S.Lanone et sous la responsabilité Scientifique du Docteur F. Schlemmer.Ce travail fait suite à la mise en évidence du rôle protecteur du TA-65 dans le remodelage des petites voies aériennes de la BPCO induite par la fumée de cigarette dans un modèle.

Plusieurs modèles murins de fibroses pulmonaires, avec ou sans modulation génique ou pharmacologique de l'activité télomérase, ont été utilisé pour étudier les rôles de la télomérase dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire(173, 178, 179).Dans les fibroblastes humains, il a été montré que la sénescence peut être induite par le stress oxydant via le Transforming Growth Factor β (TGF-β). Cette sénescence prématurée survient sans altération de la taille des télomères.Cela suggère que l'effet de la télomérase dans ces modèles pourrait résulterer d'un ou plusieurs de ces effets extra-télomériques récemment rapportés dans la littérature.

Expérimentalement l'absence de télomérase favorise le stress oxydant via une diminution de l'activité catalase (14) et dans les processus fibrosants pulmonaires, la transformation des myofibroblastes sous l'effet du TGF-β implique NOX4 (132, 133).

Ces élements suggèrent que les effets extra-télomériques de la télomérase influencent les systèmes pro- et/ou anti-oxydants et pourraient impacter la transformation myofibroblastique, à l'origine de la fibrose péri-bronchique dans la BPCO

A. **Résultats préliminaires**

Un modèle murin consistant à exposer quotidiennement des souris à la fumée de cigarette pendant 4 semaines a été établi dans le laboratoire (16). Dans ces conditions, on observe un épaississement de la paroi des petites voies aériennes (diamètre < 2mm) et au sein de la paroi bronchique, de cellules mésenchymateuses (myofibroblastes caractérisés par l'expression de l'α-SMA (alpha-Smooth Muscle Actine)) et de dépôts de fibres de collagène (révélées par la coloration au rouge picrosirius) témoignant d'un processus fibrosant (fibrose péri-bronchique).

Le traitement des souris par un activateur de la télomérase (TA-65) préalablement et pendant leur enfumage prévient l'épaississement de la paroi bronchique (figure15A) et l'apparition des myofibroblastes au sein de la paroi bronchique (figure 15B). Le traitement des souris par un inhibiteur de la télomérase (Imetelstat) préalablement et pendant leur enfumage semble aggraver la fibrose péri-bronchique et l'apparition de myofibroblastes (figure 15 C et D).

Ces résultats plaident pour un effet protecteur de la télomérase vis à vis du développement de la fibrose dans ce modèle murin, mais les mécanismes de cette action n'ont pas été étudiés.

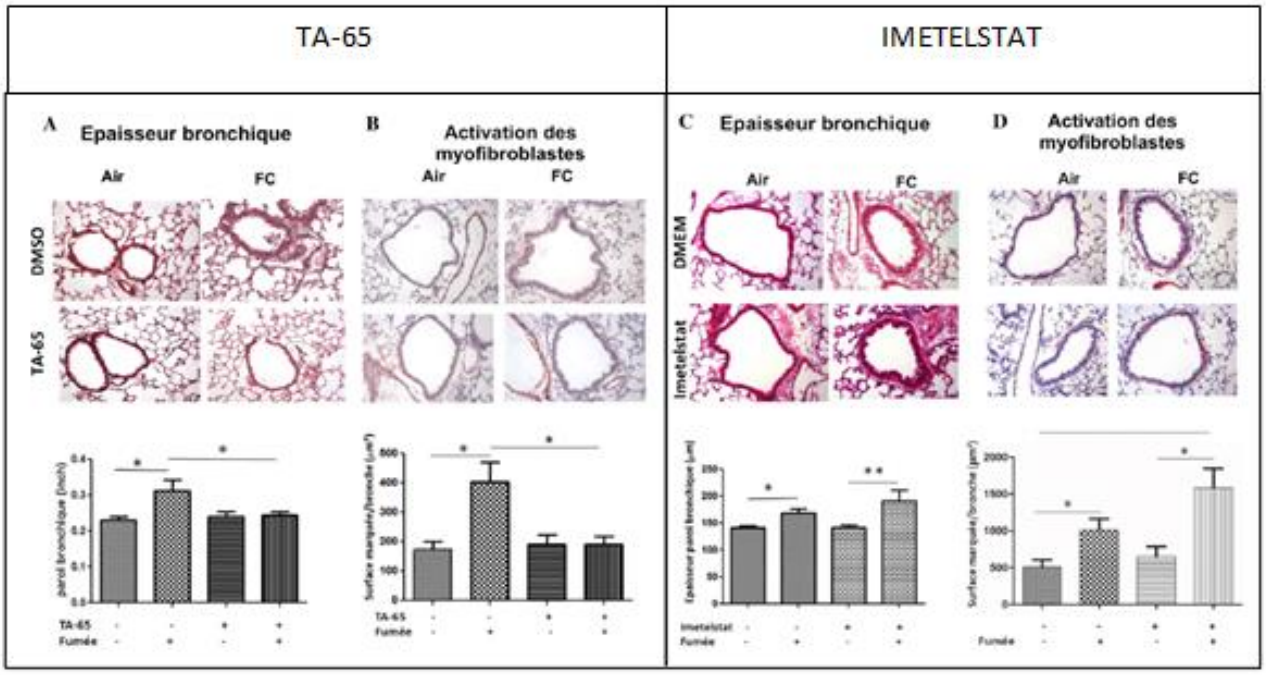


Figure 12. Coloration HES bronchique (A et C) et immunomarquage α-SMA (B et D)
Coupe paraffinée de poumon de souris exposées à 4 semaines de fumée de cigarette (FC) ou d'air et traité ou non par du TA-65 (A et B) ou de l'Imetelstat (C et D)
*n = 6 dans chaque groupe ; * p < 0.05 ; ** p < 0.01*

B. OBJECTIFS DE L'ETUDE (Figure 16)

1. Hypothèses

La production de TGF-β induit la fibrose péribronchique et la génération des myofibroblastes. Cet effet est lié à la production de ROS, dont le niveau dépend de l'activité des principaux enzymes pro et anti-oxydants.

Nous émettons l'hypothèse que les effets extra-télomériques de la télomérase influencent les systèmes pro- et/ou anti-oxydants et pourraient impacter la transformation myofibroblastique, à l'origine de la fibrose péri-bronchique dans la BPCO.

2. Objectifs

1- Confirmer l'effet de la télomérase et des modulateurs pharmacologiques TA-65 et Imetelstat sur la différenciation des fibroblastes bronchiques murins en myofibroblastes à l'origine de la fibrose péri-bronchique secondaire à l'exposition au TGF-β.

2- Explorer la voie de la modulation pharmacologique de la télomérase sur les systèmes enzymatiques anti et pro-oxydants.

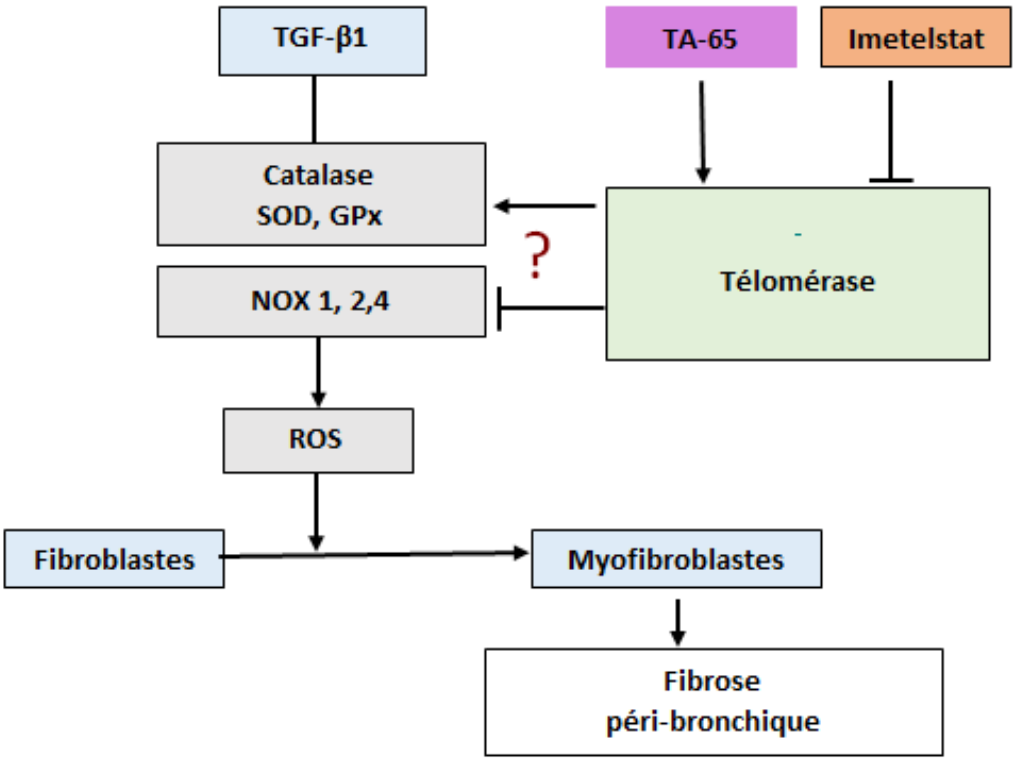


Figure 13. Objectifs

C. Matériels et méthodes

1. Isolement des fibroblastes

a) Fibroblastes bronchiques murins

Les fibroblastes bronchiques murins ont été isolés à partir de souris C57/BL6 (Janvier, France) âgées de 8 semaines non exposées à la fumée de cigarette. Après anesthésie (10% kétamine, 10% xylazine), les 2 bronches souches étaient prélevées après exclusion de la trachée et des 2 blocs pulmonaires. Les fibroblastes étaient isolés en utilisant la méthode des explants décrite par Normand *et al.* (Normand *et al.* 1995) (figure 17). Les explants étaient cultivés pendant 2 à 3 semaines en plaques 24 puits en milieu complet Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) [4.5g de glucose par litre] (Invitrogen, France) additionné de 12.5% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Hyclone, France), de 1% de pénicilline et streptomycine (PAA, France) et 1% de gentamycine (Invitrogen, France), à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2. Les explants étaient ensuite retirés et les cellules étaient cultivées une semaine. Lorsque la confluence était atteinte, les cellules étaient passées (cf légende figure 17). Après un lavage au Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Invitrogen, France), les cellules étaient détachées du support de culture par 150µL de trypsine-EDTA (Invitrogen, France) par puits pendant 3 minutes dans une étuve à 37°C et 5% de CO_2. L'action de l'enzyme était

par la suite stoppée par l'ajout de milieu complet. Après centrifugation à 1200 tours/mn pendant 10 minutes, le culot cellulaire était repris dans 3mL de milieu complet et compté sur lame de Malassez en présence de bleu Trypan (Invitrogen, France). Les cellules étaient par la suite ensemencées en flasque T25 cm^2 à raison de 300000 cellules par flasque pour être cultivées et étaient passées chaque semaine. Les différentes analyses étaient réalisées entre les passages 3 et 7.

Depuis 2 ans au sein du laboratoire de recherche, un problème est survenu suite à une rupture de stock en sérum de veau fœtal (SVF) chez le fournisseur habituel : les fibroblastes bronchiques murins extraits de bronches de souris ne prolifèrent pas et meurent après le premier repiquage faisant suite à l'extrait de l'explant.

Les 3 premiers mois de mon stage ont consisté à tester des SVF provenant de plusieurs fournisseurs différents. Les cellules étaient vivantes et adhéraient au cours des 3 semaines de culture avec l'explant. Pour tous les SVF testés, l'étape de premier passage s'accompagnait d'une mort cellulaire ne permettant pas de poursuivre l'expérimentation. Différentes méthodes ont été testées pour cette étape critique de repiquage : trypsinisation, grattage, EDTA, coating des plaques 6 puits pour permettre une meilleure adhésion cellulaire. Aucun de ces ajustements n'a permis de corriger cette étape cruciale : pas d'adhésion au premier repiquage, taux de mortalité très important. Après de nouvelles recherches dans la littérature, la méthode par digestion enzymatique a été réalisée, sans obtention de meilleurs résultats.

Il a alors été décidé avec l'ensemble de l'équipe d'effectuer les expériences définies préalablement sur une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires murins (d'origine pulmonaire)

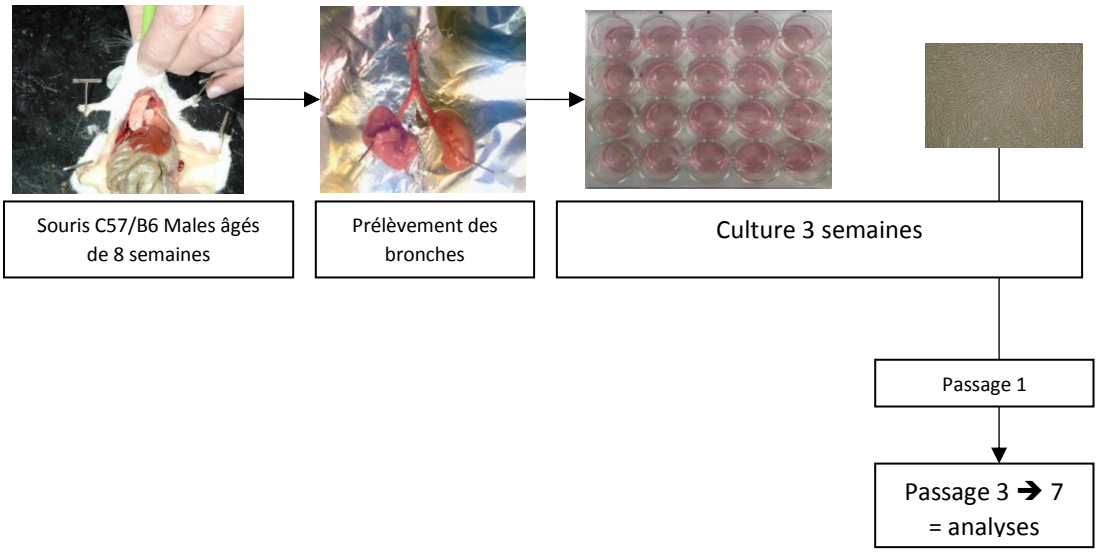
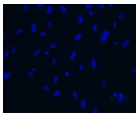
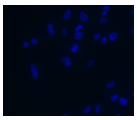
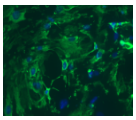
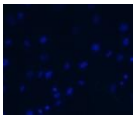


Figure 14. Protocole d'isolement et de culture primaire de fibroblastes bronchiques murins

« un passage » correspond à trypsiner les cellules pour les remettre en suspension, centrifuger, laver le culot en PBS, compter des cellules, remettre en culture à la concentration voulue.

Tableau 3. Caractérisation des fibroblastes en immunocytochimie

	CD31	Cytokératine	Vimentine	αSMA
				
Cellule épithéliales	-	+	-	-
Cellules endothéliales	+	-	-	-
Fibroblastes	-	-	+	-
Myofibroblastes	-	-	-	+

b) Fibroblastes embryonnaire murins (d'origine pulmonaire) en lignée : MEF

Les MEF ont été fourni par l'unité du Dr. Schlemmer. Les MEF étaient cultivés en flasque T75 en milieu complet Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) [4.5g de glucose par litre] (Invitrogen, France) additionné de 12.5% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Hyclone, France), de 1% de pénicilline et streptomycine (PAA, France, 1% de gentamycine (Invitrogen, France), et d'HEPES en poudre à dissoudre dans le milieu pour une concentration de 25mM d'HEPES, à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2. Les cellules étaient repiquées toutes les semaines et les expériences ont été réalisées entre les passages 3 à 7.

c) Phénotypage des fibroblastes

Le phénotype cellulaire était caractérisé par une observation morphologique des cellules en culture ainsi que par l'expression de protéines spécifiques étudiées par immunocytochimie (Tableau 3). Les fibroblastes pulmonaires présentent un marquage positif pour l'anticorps anti-vimentine. L'absence de contamination par des cellules épithéliales ou des cellules endothéliales était vérifiée par un marquage avec les anticorps anti-pancytokératine et anti-CD31 respectivement (Dako Cytomation, France). L'absence de différenciation myofibroblastique était réalisée par le marquage de l'anticorps

anti α smooth muscle actin (α-SMA) (Invitrogen, France). Les anticorps primaires utilisés sont résumés dans le tableau 4.

d) Survie des fibroblastes en culture en présence des molécules activatrice (TA-65) et inhibitrice (Imetelstat) : choix de doses in vitro, Dosage MTT

- **Le TA-65**, sous licence exclusive de TA-Sciences (Geron Corporation, USA), est une molécule activatrice de la télomérase dérivée d'un extrait de plante, *Astragalus membranaceous,* couramment utilisée en médecine traditionnelle chinoise. Il est obtenu par ultra purification et concentration d'un des nombreux composés bioactifs présents dans la racine d'astragale (180)
- **Le GRN163L ou Imetelstat** (Geron Corporation, USA) est un inhibiteur de la télomérase (201). Il s'agit d'un composé synthétique lipidique qui est complémentaire à la région enzymatique RNA de la télomérase (hTR).
- Evaluation de la survie des fibroblastes par dosage MTT

Principe MTT

Le dosage MTT permet d'évaluer la survie cellulaire et donc la cytotoxicité potentielle des traitements. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT. L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes et permet de déterminer les concentrations optimales de molécules actives, ici le TA-65 et l'Imetelstat.

Protocole de traitement des fibroblastes

- Choix des doses optimales non cytotoxiques

Les fibroblastes étaient ensemencés en plaque 96 puits et cultivés pendant 48h. Les cellules étaient ensuite exposées à différentes doses de TA-65 ou d'Imetelstat pendant 96h ou non exposées (contrôle). Après lavage, les cellules étaient incubées avec une solution MTT à 0.5mg/ml pendant 1h30 à l'abri de la lumière et à 37°C. La solution MTT était ensuite éliminée et les cristaux de formazan formés étaient solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La lecture s'effectuait en utilisant un lecteur de plaque Infinite M200 Pro (Tecan, France) à la densité optique de 595 nm. Les résultats étaient exprimés en pourcentage par rapport aux contrôles (Figure 18)

Doses utilisées pour les traitements *in vitro* (doses optimales non cytotoxiques) :

- 1 µM pour le TA-65 (dilué dans du DMSO)
- 1 µM pour l'Imetelstat (dilué dans du milieu complet)

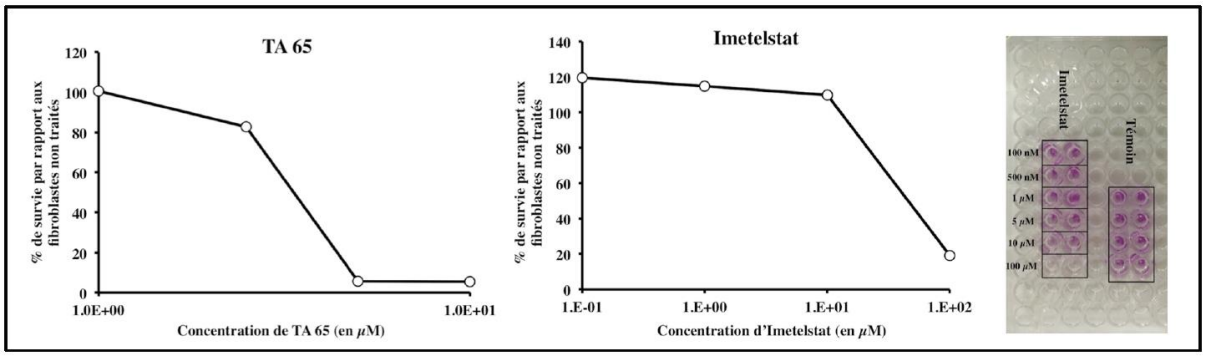


Figure 15. Tests de cytotoxicité du TA-65 et de l'Imetelstat sur des fibroblastes murins.

— <u>Conditions de culture des fibroblastes In vitro en présence des molécules actives</u> (figure 19)

- — **H-48** : Les fibroblastes étaient ensemencés et cultivés.
- — **H0** : Un pré-traitement par du TA-65, de l'Imetelstat ou du DMEM était administré
- — **H24** : Une induction par du TGF-β à 10ng/mL (Sigma, France) était réalisée en complément des autres traitements.
- — **H72** : Le traitement était renouvelé pour une durée de 24h.
- — **H96** : les analyses étaient effectuées : ICC (support : labteks 8 puits), WB (support : flasque T75cm2), sondes (support : plaques 6 puits), activité enzymatique (support : lysats)
    - Etude de l'expression des enzymes du stress oxydant (***NOX 1, NOX 2,* NOX 4, catalase et GPx)**: ImmunoCytoChimie et Western-blot**.**
    - Activité Télomérase : TRAP assay.
    - Différenciation myofibroblastique : marquage spécifique ***α-SMA (ICC).***
    - Production **ROS totaux** et **mitochondriaux :** *sondes H_2-DCFH-D et* Mitosox, respectivement.
    - Activité enzymatique de la catalase : test Amplex Red Catalase assay.
    - Activité enzymatique de la GPx : test GPx cellular activity assay.

Au total, huit conditions différentes de culture étaient réalisées : témoin ; TFG-β seul ; TA-65 seul ; Imetelstat seul ; TA-65 + Imetelstat ; TA-65 + TFG-β ; Imetelstat + TFG-β ; TA-65 + Imetelstat + TFG-β

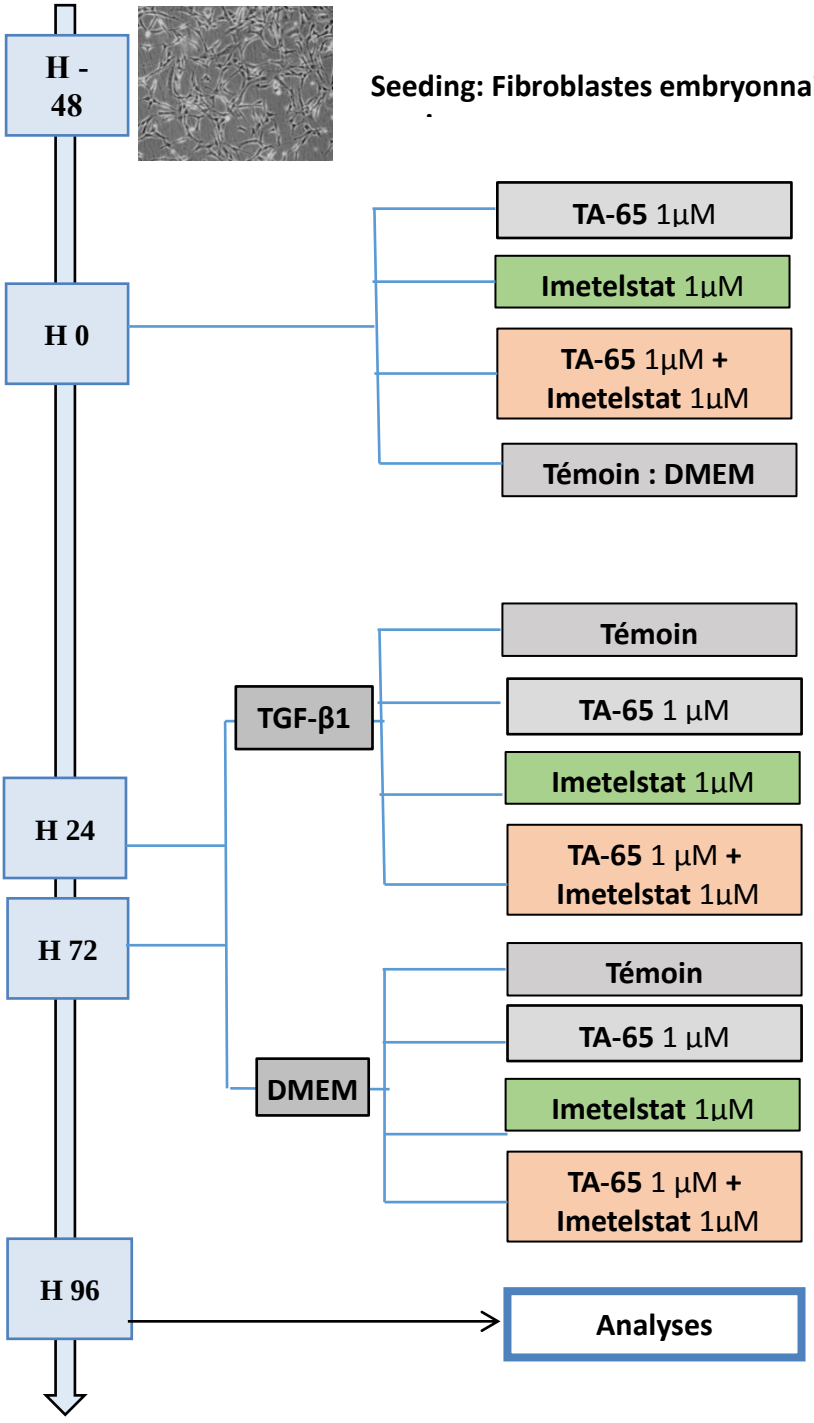


Figure 16. Protocole de traitement des fibroblastes bronchiques murins/MEF

2. Détection de proteines d'intérêt dans les cultures de fibroblastes

a) Immunocytochimie (ICC)

Principe

L'ICC est une technique permettant le marquage d'antigène dans les cellules à l'aide d'anticorps primaires spécifiques, détectés par la suite à l'aide d'anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome. L'expression des complexes enzymatiques NOX1, NOX2, NOX4, de la catalase, de la GPx et de l'α-SMA dans les fibroblastes bronchiques murins était évaluée en ICC.

Protocole

Les fibroblastes pulmonaires étaient ensemencés en système de chambre de culture sur lame Nunc Lab-Tek II Chamber Slide (Thermofisher, France) à raison de 10000 cellules par puits. A H-96, les cellules étaient fixées pendant 15 minutes à 4°C en chambre humide par du paraformaldéide 4%. Les cellules étaient ensuite perméabilisées pendant 15 minutes avec une solution de Triton 100X à 0.1% (Sigma, France) afin de permettre l'accès des anticorps aux protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Les sites aspécifiques étaient bloqués avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 2% pendant 30 minutes à température ambiante et en chambre humide.

Les cellules étaient ensuite incubées sur la nuit, en chambre humide, à 4°C, avec les anticorps primaires dilués dans une solution de BSA 1% (***tableau 4***). Le lendemain après lavage au PBS, les cellules étaient incubées 45 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante avec les anticorps secondaires en fonction de l'anticorps primaire utilisé. La Lab-Tek était démontée, puis un milieu de montage Prolong Gold contenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Invitrogen, France) était déposé sur les lames afin d'éviter la diminution de fluorescence et permettre une contre coloration des noyaux. Les préparations étaient observées avec un microscope Axioplan 1 imaging (Carl Zeiss SAS, France) couplé au logiciel de prise d'image Axio Vs40 Software, version 4.5.0.0 (Carl Zeiss SAS, France).

La quantification nécessite la prise de 8 photos par condition. Le nombre de noyaux marqués au DAPI était compté, reflétant la quantité totale de cellules, ainsi que les cellules marquées pour les différentes protéines étudiées. Le pourcentage de cellules marquées ou l'intensité du marquage (logiciel Image J) était déterminé par rapport au nombre de cellules totales identifiées par le marquage au DAPI.

Tableau 4. Récapitulatif des anticorps utilisés en ICC et en WB pour la caractérisation cellulaire et l'étude des systèmes anti-oxydants, dilution (fournisseur)

	Immuno-Cyto-Chimie		**Western-Blot**		
Proteine	Ac primaire	Ac secondaire	Ac primaire	Ac secondaire	Substrat
NOX1	1/500 (NovusBio, USA)	anti-IgG de lapin, biotinylé (Clinisciences, France)	1/1000, 5% lait (NovusBio, France)	Anti-IgG total de lapin conjugué HRP (GE Healthcare, France)	ECL (GE Healthcare, France)
NOX2	1/500 (Abcam, France)		1/1000, 5% lait (Abcam, France)		
NOX4	1/500 (Abcam, France)		1/1000, 5% lait (Abcam, France)		
Catalase	1/300 (Abcam, France)		1/2000, 5% lait (Abcam, France)		
GPx-1	1/300 (Abcam, France)		1/1000, 5% lait (Abcam, France)		
β-actine			1/5000, 5% lait (Abcam, France)	Anti-IgG total de souris conjugué AP (Bio-Rad, France)	Immun-Star AP (Bio-Rad, France)
Vimentine	1/100 (Dako Cytomation, France)	anti-IgG de souris, biotinylé (Clinisciences, France)			
Cytokératine	1/50 (Dako Cytomation, France)				
CD31	1/50 (Dako Cytomation, France)				
αSMA	1/200 (Dako Cytomation, France)				

b) Western Blot (WB)

Principe

Le WB est une technique permettant de détecter et d'identifier des protéines spécifiques dans un échantillon biologique au moyen d'un transfert sur nitrocellulose des protéines séparées par électrophorèse et l'utilisation d'anticorps spécifiques. L'expression des protéines impliquées dans les systèmes antioxydants et pro-oxydants était évaluée par WB.

Protocole

— Culture : Les fibroblastes pulmonaires étaient ensemencés en flasque T75 cm^2 . A H96, les cellules étaient synchronisées à l'aide d'un milieu contenant peu de sérum (0.8%) pendant 24h. Après lavage au PBS, les cellules étaient détachées du support de culture en présence de trypsine-EDTA (Invitrogen, France) puis lysées dans une solution contenant 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 150mM NaCl, 10 mM Hepes, Saccharose 500 mM, Na2 EDTA 1mM et 1.0% NP-40, ainsi que 10% anti-protéase et 1% anti-phosphatase (Sigma, France).

— Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS : les gels étaient préparés à partir d'une solution stock d'acrylamide à 40% (Bio-Rad Laboratories, France). Les gels étaient préparés extemporanément, en tampon Tris-HCL à pH 8.8 pour le gel de séparation, et en tampon Tris-HCl pH 6.8 pour le gel de concentration. Les lysats cellulaires à étudier étaient dans un premier temps soniqués pendant 30 secondes pour libérer les protéines nucléaires puis centrifugés pour éliminer les morceaux de membranes. Les protéines étaient dosées par la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories, France) avec de la BSA comme standard. Les échantillons étaient dénaturés en présence d'un agent réducteur, le Laemmli, et des dépôts de 40µg étaient effectués.

— Transfert sur membrane de PVDF (Millipore) : le gel était transféré sur membrane de PVDF préalablement polarisée. Un transfert liquide était réalisé sur la nuit à 20 mV et 4°C. La qualité du transfert était vérifiée par coloration au rouge Ponceau des protéines fixées sur la membrane et des protéines résiduelles dans le gel au bleu de Coomassie. Après rinçage, les membranes étaient saturées avec une solution de lait à 10%, en tampon TBS-T (Tris Buffer Saline Tween) (10% lait avec les anticorps primaires dirigés contre la protéine recherchée, dilués dans une solution de TBS-T contenant 5% de lait ou de BSA selon l'anticorps utilisé. Le lendemain, après lavage au TBS-T, les membranes étaient incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) (GE Healthcare Europe, France) ou à la phosphatase alcaline (Bio-Rad Laboratories, France) pour la β-actine, dilué dans du lait 5% pendant 1 heure. Finalement les membranes étaient mises en contact avec le substrat correspondant, soit l'ECL (GE Healthcare Europe, France) si l'anticorps secondaire était couplé à la peroxydase, soit Immun-star AP (Bio-Rad Laboratories, France) si l'anticorps

secondaire était couplé à la phosphatase alcaline. Les membranes étaient lues par un système d'imagerie numérique G:Box (Syngene, France). Les anticorps primaires et secondaires, les dilutions ainsi que les substrats utilisés pour la révélation des différentes protéines sont résumés dans le tableau 3.

c) Sonde DCFH2-DA et MitoSOX

Principe

Afin d'évaluer l'implication du stress oxydant, la production de ROS globale était évaluée à l'aide du dichlorodihydrofluorescéine diacétate ($DCFH_2$-DA) (Life Technologies, France), une sonde devenant fluorescente lorsqu'elle est oxydée par les ROS. La production de ROS mitochondriale était évaluée de manière similaire avec la sonde MitoSOX (Life Technologies, France).

Protocole

A H96, Les fibroblastes cultivés en plaque 6 puits étaient incubées pendant 30 minutes avec la sonde ($DCFH_2$-DA) à 5µM et des mesures de fluorescence étaient réalisées à T0 et T60 minutes, constituant le maximum de fluorescence détectée, par lecteur de plaque Infinite M200Pro (Tecan, France).

Le principe était similaire pour la sonde MitoSOX avec une incubation de 15min à 5µ% et une lecture à T15 minutes.

3. Détection des activités Enzymatiques

a) Activité Catalase

Principe

L'activité catalase a été évaluée à l'aide de l'Amplex Red Catalase Assay Kit (Life Technologies, France). Cette technique consiste à mesurer la capacité de liaison à forte affinité de la catalase au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'HRP, l'Amplex Red réagit stoechiométriquement avec l' H_2O_2 pour générer de la résorufine qui être lue en fluorescence. Par conséquence, plus l'activité catalase augmente, plus le signal de résorufine diminue.

Protocole

A H96, , les fibroblastes étaient lysés comme décrit précédemment. Les lysats cellulaires, déposés en plaque 96 puits, étaient incubés en présence de 40µM d'H_2O_2 pendant 30 min puis en présence de 100µM d'Amplex Red et 0.4U/mL d'HRP pendant 30min. La fluorescence était mesurée par un lecteur de plaque Infinite M200Pro (Tecan, France) en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 545 nm et d'émission-détection à 590 nm.

b) Activité Glutathion Peroxydase GPx

Principe

L'activité glutathion peroxydase a été évaluée à l'aide du Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma, France). Il s'agit d'une méthode de détermination indirecte basée sur l'oxydation du glutathion (GSH) en glutathion oxydé (GSSG), catalysée par la GPx, qui est ensuite couplé au recyclage de GSSG en GSH en utilisant la glutathion réductase (GR) et la NADPH. La diminution de l'absorbance du NADPH au cours de l'oxydation de NADPH en NADP+ est indicative de l'activité de la GPx.

Protocole

Les lysats cellulaires étaient obtenus comme décrit précédemment puis mis en présence de 25µL d'une solution contenant de la NADPH à 5 mM, de la GSH 42 mM et de la glutathion réductase à 10 unités par mL puis de 5µL d'une solution contenant de l'hydroperoxyde de *tert*-butyle à 30 mM. Après un délai de 15 secondes, l'absorbance était mesurée à 340 nm toutes les 10 secondes pendant une minute à l'aide d'un spectrophotomètre BioPhotometer Plus (Eppendorf, France).

c) Activité Télomérase

L'activité télomérase a été quantifiée dans les fibroblastes bronchiques murins à H96 à l'aide du kit TeloTAGGG Telomerase PCR Elisa^{PLUS} kit (Roche Diagnostics, France) utilisant la méthode du TRAP (*Telomere Repeat Amplification Protocol*). Cette technique est composée de deux phases, la première permet l'élongation *in vitro* d'un fragment télomérique synthétique par la télomérase contenue dans l'extrait cellulaire, la deuxième permet la détection de ces produits d'élongation par amplification par PCR.

4. Analyses Statistiques

Dans ce mémoire il n'est pas possible de présenter d'étude statistique des résultats en raison du faible nombre de déterminations des données. Une fois les expériences renouvelées pour augmenter la taille des effectifs, des tests non paramétriques seront utilisés.

Le test d'analyse de variance de Kruskall-Wallis sera utilisé afin de détecter une différence entre les 8 groupes expérimentaux, suivi en cas de positivité d'analyses deux par deux à l'aide du test de Mann-Whitney. Les valeurs de $p < 0.05$ seront considérées comme significatives. L'analyse des résultats sera effectuée à l'aide du logiciel SAS 9.3 (SAS Institute, Inc., USA).

D. RESULTATS

Objectif 1 : Confirmation de l'effet de la télomérase et des modulateurs pharmacologiques TA-65 et Imetelstat sur la différenciation des fibroblastes embryonnaires murins en myofibroblastes à l'origine de la fibrose péri-bronchique secondaire à l'exposition au TGF-β.

1. Le TA-65 augmente l'activité de la protéine télomérase dans les fibroblastes embryonnaires murins.

L'activité de la protéine télomérase était augmentée dans les fibroblastes embryonnaires traités par TA-65 par rapport au témoin (figure 20).

L'Imetelstat n'induisait qu'une réduction modeste de cette activité mais prévenait l'augmentation de l'activité télomérase induite par le TA-65 en cas de traitement concomitant avec les deux molécules.

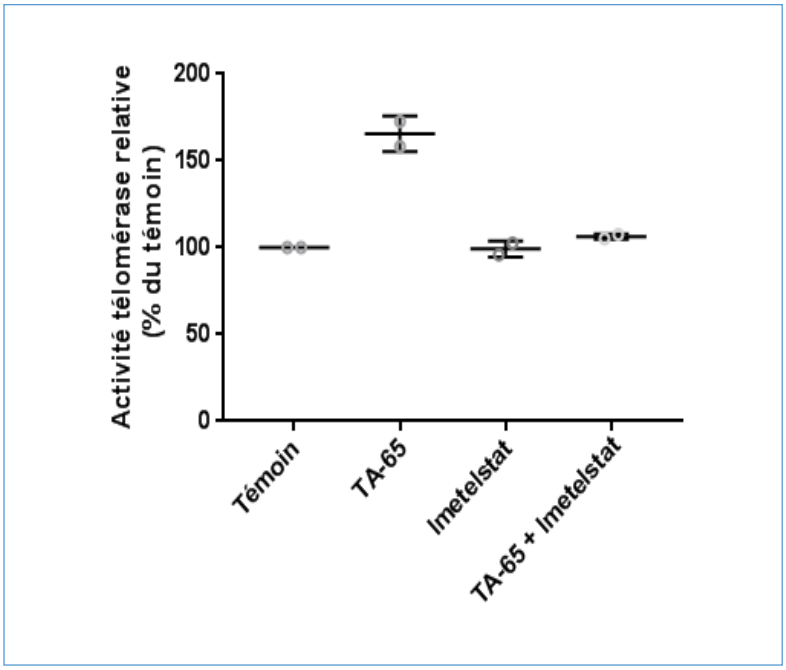


Figure 17. Mesure de l'activité télomérase in vitro par la méthode TRAP dans les fibroblastes embryonnaires murins (n=2 par groupe)

2. Le TA-65 prévient la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-β *in vitro*.

L'exposition des fibroblastes au TGF-β induisait une augmentation de l'expression de l'α-SMA traduisant leur différenciation myofibroblastique comparativement à des fibroblastes non exposés (figure 21).
L'activation de la protéine télomérase par le TA-65 semble prévenir la différenciation myofibroblastique de fibroblastes bronchiques exposés au TGF-β.
Le traitement par Imetelstat ne semblait pas modifier la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-β.
Le traitement conjoint TA-65 et Imetelstat produit un résultat intermédiaire, suggérant une réduction de l'effet produit par le TA-65.

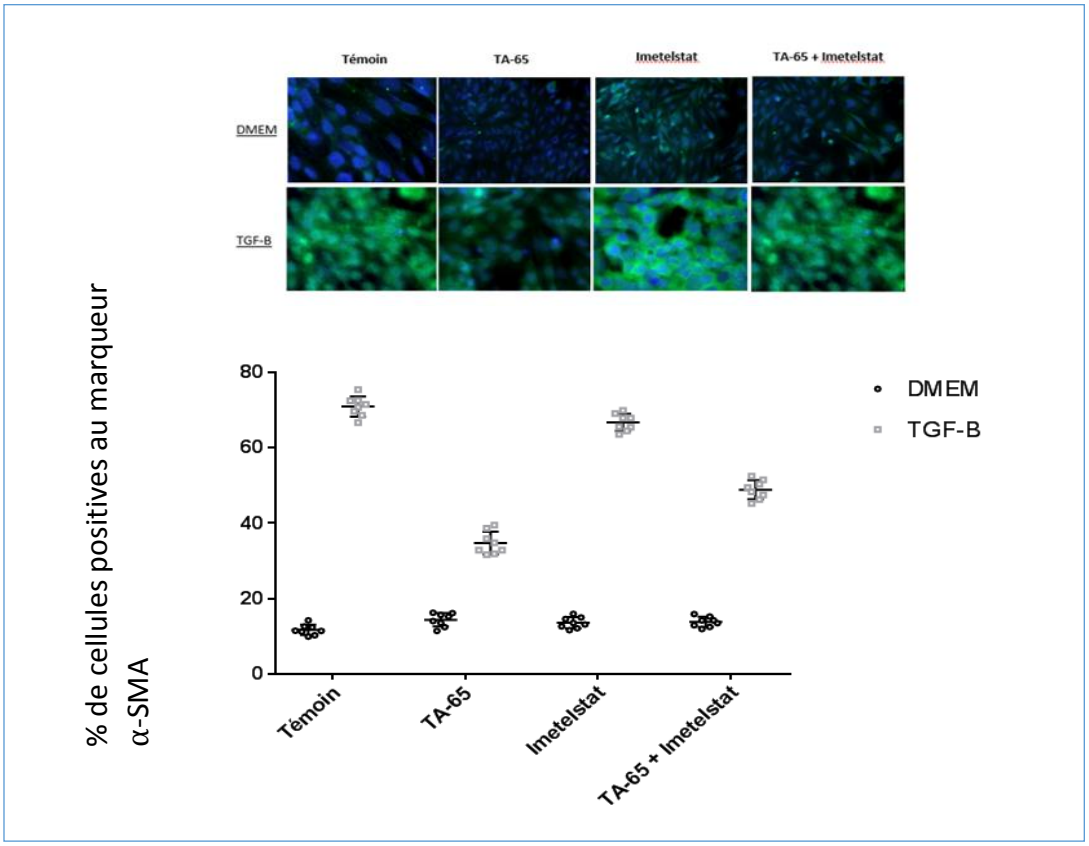


Figure 18. Effet de la modulation de l'activité télomérase sur la différenciation myofibroblastique (marquage αSMA en immunocytochimie) dans des fibroblastes embryonnaires murins exposés au TGF-β ; n = 1 passage, Grossissement X200, 4 photos par conditions.

Objectif 2- Analyser l'effet de la modulation pharmacologique de la télomérase sur les systèmes enzymatiques anti et pro-oxydants

3. Le TA-65 diminue la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les fibroblastes exposés in vitro au TGF-β.

Afin de déterminer si la modulation pharmacologique de la différenciation myofibroblastique par le TA-65 était associée à une variation du niveau de stress oxydant, la production de ROS totaux a été évaluée dans les différentes conditions (figure 22).

L'exposition des fibroblastes au TGF-β induisait une augmentation de la production de ROS totaux. Cette augmentation est réduite par le traitement conjoint TGF-β + TA-65.

L'association TGF-β + Imetelstat induisait une augmentation de production de ROS totaux, atteignant un niveau supérieur à celui obtenu avec le TGF-β seul.

Ces résultats suggèrent une influence de l'activité télomérase sur le niveau de production des ROS totaux par les fibroblastes exposés au TGF-β.

La sonde Mitosox pour quantifier les ROS mitochondriaux a donné des résultats non exploitables (problème commun aux autres chercheurs de l'équipe). Nous pensons à un défaut de la sonde (en cours d'exploration : conservation ? problème d'hybridation ?). En conséquence seuls les ROS totaux ont été mesurés.

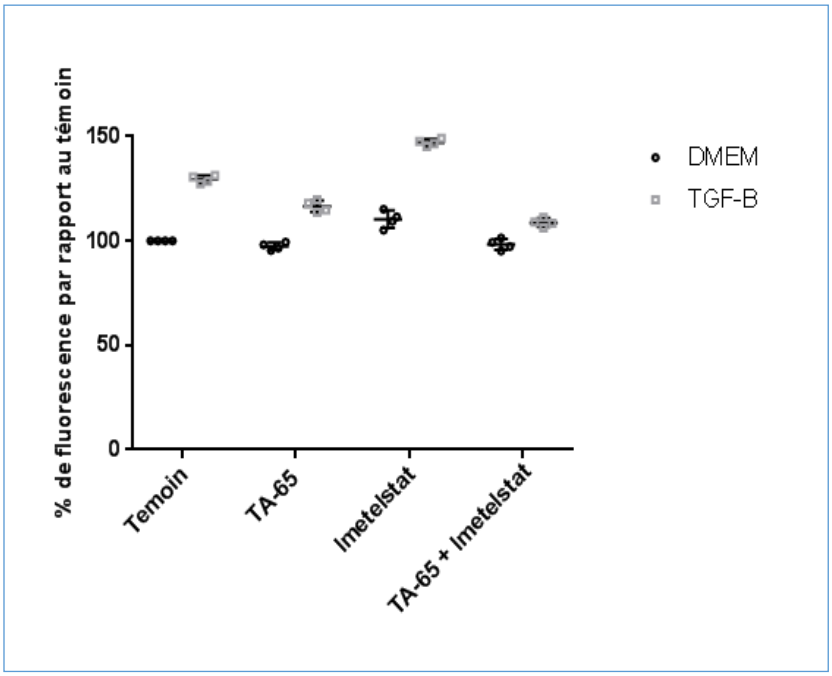


Figure 19 Mesure des ROS totaux. n= 2 passages différents, réalisé 2 fois sur chaque passage

.

4. Influence de l'activité Télomérase sur les systèmes enzymatiques pro- et anti-oxydant

a) Expression des NADPH oxydases et modulation de l'activité télomérase

L'expression protéique de NOX1 (figure 23 A), NOX2 (figure 23 B) et NOX4 (figure 23 C) a été évaluée par immunomarquage en ICC et par WB dans les MEF traités ou non par du TA-65, de l'Imetelstat ou TA-65 + Imetelstat et exposés ou non au TGF-β (figure 23).

- NOX1

L'exposition au TGF-β entraine une discrète augmentation de l'expression de NOX1 dans les 4 conditions d'expériences : témoins, + TA-65, + Imetelstat, TA-65 + Imetelstat

Dans les fibroblastes non exposés au TGF-β, le TA-65 induisait une réduction de l'expression de NOX1 en ICC par rapport aux fibroblastes traités par l'Imetelstat mais était similaire aux témoins. L'exposition au TGF-β ne permettait pas de maintenir cette réduction : l'expression de NOX1 dans les fibroblastes traités par TA-65 ou par Imetelstat était similaire au témoin. Ces résultats étaient confirmés par WB.

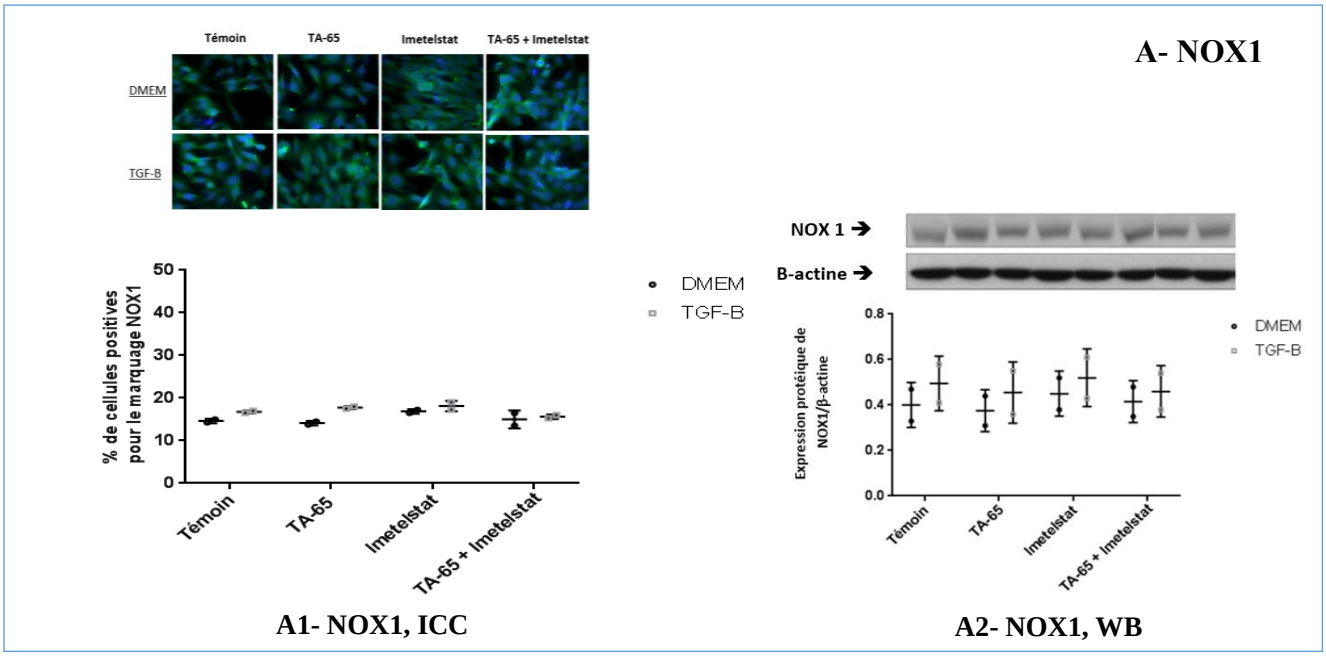


Figure 20. Immunomarquage en ICC (A1, B1, C1) et expression protéique en WB (A2, B2, C2) de NOX1 (A), de NOX 2 (B) et NOX4 (C) dans les fibroblastes embryonnaire murins +/- TA-65 , +/- Imetelstat, +/-TGF-β. grossissement X20, 4 clichés par condition, n = 2 passages différents, ICC et WB réalisés 1 x/passage.

- NOX 2

L'exposition au TGF-β entraine une discrète augmentation de l'expression de NOX2 dans le groupe Témoin, sans modification apparentes dans les autres groupes d'expériences.

Ces résultats étaient confirmés par WB.

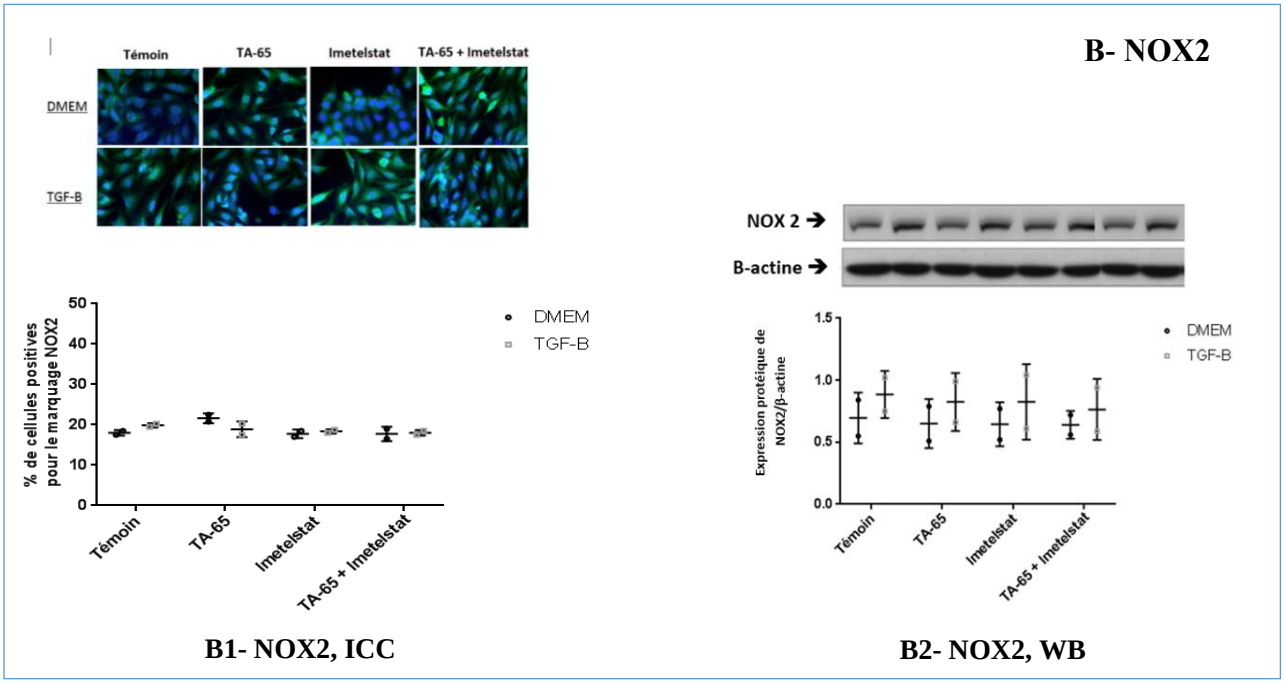


Figure 23. Immunomarquage en ICC (A1, B1, C1) et expression protéique en WB (A2, B2, C2) de NOX1 (A), de NOX 2 (B) et NOX4 (C) dans les fibroblastes embryonnaire murins +/- TA-65 , +/- Imetelstat, +/-TGF-β. grossissement X20, 4 clichés par condition, n = 2 passages différents, ICC et WB réalisés 1 x/passage.

- NOX4

L'exposition au TGF-β induit une augmentation nette de l'expression de NOX4 dans les groupes Témoin et Traités par Imetelstat par rapport aux fibroblastes non exposés.

L'augmentation de l'expression de NOX4 n'est pas observée dans les fibroblastes traités par TA-65, exposés au TGF-β.

Ces résultats suggèrent que l'exposition au TGF-β entraine une augmentation discrète de NOX1 et NOX2, et une augmentation nette de NOX4.

L'activité télomérase ne semble jouer un rôle que dans l'expression de NOX4, induite par TGF-β, à bien sûr confirmer par la reproduction de ces expériences.

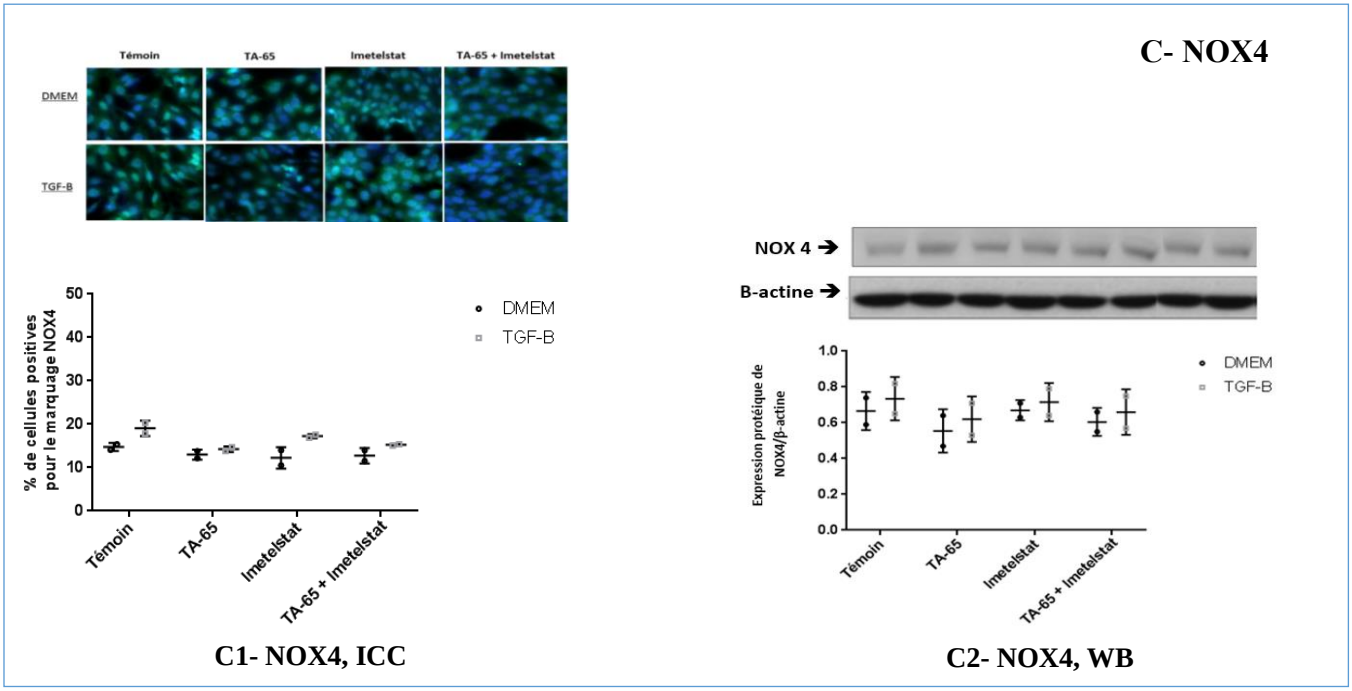


Figure 23. Immunomarquage en ICC (A1, B1, C1) et expression protéique en WB (A2, B2, C2) de NOX1 (A), de NOX 2 (B) et NOX4 (C) dans les fibroblastes embryonnaire murins +/- TA-65 , +/- Imetelstat, +/-TGF-β. grossissement X20, 4 clichés par condition, n = 2 passages différents, ICC et WB réalisés 1 x/passage.

b) Expression et activité de la glutathion peroxydase 1 et modulation de l'activité télomérase

L'exposition au TGF-β entraine une discrète augmentation de l'expression de GPx (ICC) dans les 4 conditions d'expériences : témoins, + TA-65, + Imetelstat, + TA-65+Imetelstat (figure 24 A). L'exposition au TGF-β induit une augmentation de l'activité Gpx-1 dans les fibroblastes témoins (figure 24 C).

En l'absence d'exposition au TGF-β, le TA-65 induit une augmentation significative de l'activité GPx-1 par rapport au témoin.

Ces résultats étaient confirmés par WB (figure 24 B).

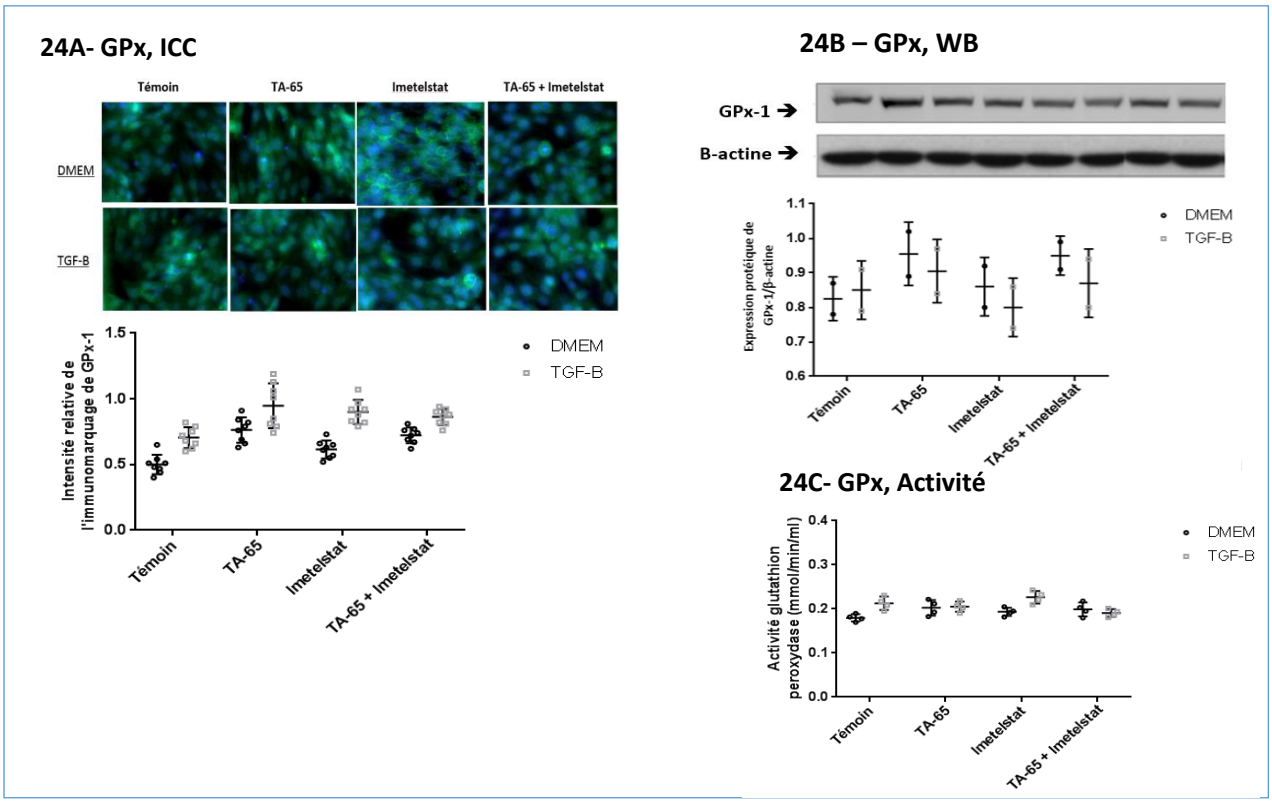


Figure 21. Immunomarquage en ICC (A), expression protéique en WB (B) et activité (C) de la Glutathion Peroxydase 1 dans les fibroblastes embryonnaires murins +/- TA-65 , +/- Imetelstat, +/-TGF-β. grossissement X20, 4 clichés par condition,, n = 2 passages différents, ICC et WB réalisé 1x/passage ; B et C n, activité 2x/passage.

c) Expression et activité de la catalase et modulation de l'activité télomérase

L'exposition au TGF-β est associée à une nette augmentation de l'expression de la catalase (ICC) dans les 4 conditions d'expériences : témoins, + TA-65, + Imetelstat, + TA-65+Imetelstat (figure 25 A), et est également associée à une nette augmentation de l'activité catalase versus les fibroblastes témoins non exposés au TGF-β (figure 25 C).

En l'absence d'exposition au TGF-β, le TA-65 induit une augmentation de l'expression et de l'activité de la Catalase. L'Imetelstat ne modifie ni l'expression, ni l'activité de la catalase. Le double traitement TA-65+Imetelstat réduit l'augmentation de l'expression et de l'activité de la catalase induites par le TA-65 seul.

Ces résultats étaient confirmés par WB (figure 25 B).

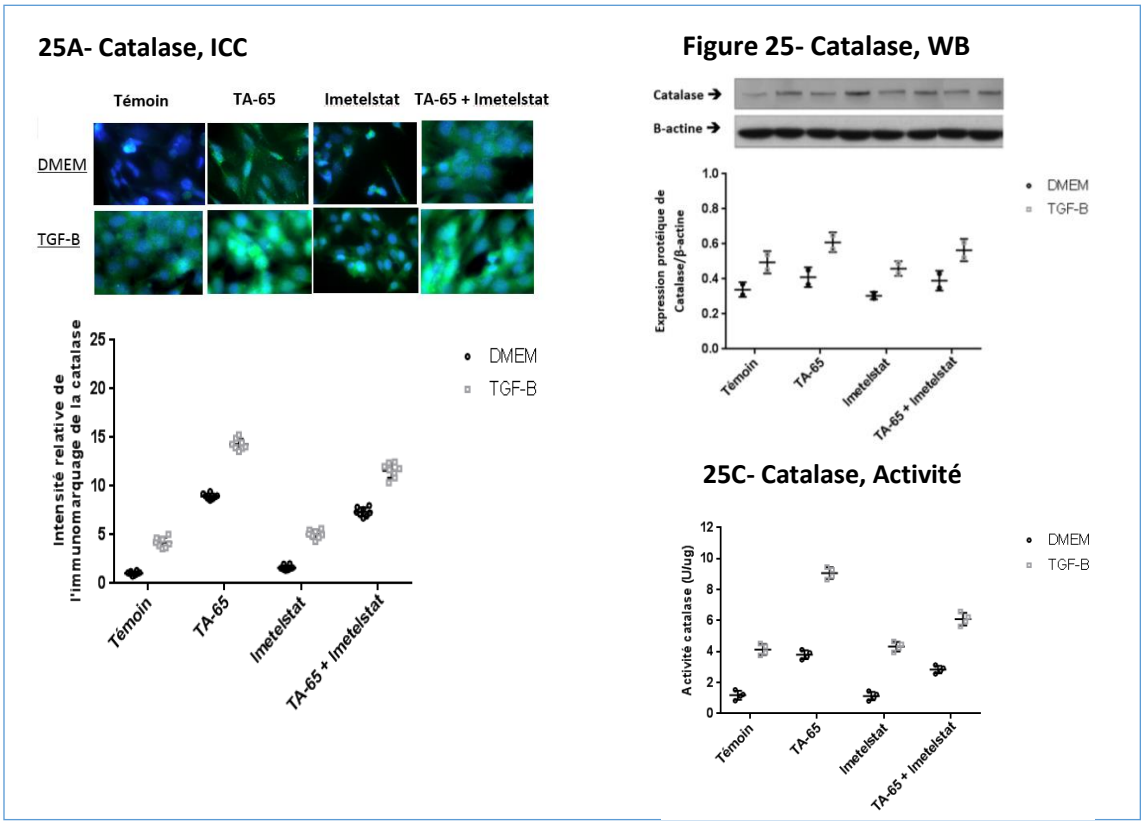


Figure 22. Immunomarquage en ICC (A), expression protéique en WB (B) et activité (C) de la catalase dans les fibroblastes embryonnaires murins (+ TA-65, + Imetelstat, +TA-65 + Imetelstat, +/- TGF-β. ; **A** : grossissement X20, 8 clichés/condition, n=2 passages, ICC et WB réalisé 1x/passage ; activité réalisés 2x/passage.

d) Expression et activité de la SOD et modulation de l'activité télomérase

L'étude de la SOD n'a pas pu être réalisée en raison de l'absence de livraison des réactifs spécifiques dans les temps impartis (fin mai 2018). Elle sera réalisée courant juillet 2018.

IV. Discussion

A. Discussion du travail expérimental

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de la modulation de la télomérase par des activateurs et inhibiteurs pharmacologiques sur la différenciation des fibroblastes murins en myofibroblastes, induite par le TGF-β. Il visait plus particulièrement à explorer les mécanismes de cette action en étudiant l'expression des enzymes anti et pro-oxydantes impliquées dans la production des ROS.

Le myofibroblaste est considéré comme l'effecteur final commun de la fibrogénèse qui participe au remodelage bronchique (203). La fibrose péribronchique est caractérisée par une accumulation de myofibroblastes aboutissant à une sécretion exagérée de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, protéases). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes dépend en grande partie de l'effet du TGF-β sécrété par les cellules lors de situations d'agression aigue (80).

1. Discussion des conditions expérimentales

a) Cultures cellulaires

L'étude de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes peut se faire *in vivo* sur des modèles murins comme celui developpé dans notre laboratoire (16) ou *in vitro* sur des cultures primaires de fibroblastes pulmonaires parenchymateux ou sur des lignées cellulaires fibroblastiques embryonnaires murines d'origine pulmonaire. Elles sont considérées comme un modèle adapté pour comprendre les mécanismes impliqués dans la fibrose péri-bronchique.

Nous avons initialement essayé de mettre au point une culture primaire de fibroblastes bronchiques isolés à partir de la technique des explants, décrite par Normand *et al*. (212). Nous avons rencontré de nombreuses difficultés à mettre en œuvre cette culture par la méthode d'explants ou par digestion enzymatique et nous ne sommes pas parvenus à obtenir des quantités suffisantes de cellules viables pour mener à bien nos expériences. Après de 3 mois de tests infructueux, nous avons décidé de réaliser les expériences sur une lignée cellulaire fibroblastique embryonnaire murine d'origine pulmonaire. Les expériences sur lignées cellulaires peuvent apparaitre moins pertinentes mais permettent d'obtenir des quantités importantes de matériel bien caractérisé. C'est d'ailleurs la technique utilisée par Le Saux *et al* (182) dans l'étude à laquelle nous nous réferons à plusieurs reprises dans ce mémoire.

b) Modulation de l'activité de la télomerase

La télomérase est une enzyme qui, lorsqu'elle est activée, permet de maintenir la longueur des télomères lors de chaque cycle cellulaire, prévenant ainsi la sénescence réplicative. Récemment,

plusieurs fonctions cellulaires de la télomérase indépendantes de son rôle de maintenance des télomères ont été décrites, notamment dans la biologie des cancers (151). La télomérase est surexprimée dans certaines pathologies (cancer) et à l'inverse est déficiente dans un certain nombre de situations pathologiques ou physiologiques, notamment lors du processus de vieillissement tissulaire (10). Cela a justifié la recherche et le développement de molécules capables d'inhiber ou accroître l'activité de la télomérase.

Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire expérimentale, l'activation pharmacologique de la télomérase diminue la fibrose (216). Cette observation suggère que l'activation de la protéine télomérase pourrait également atténuer la fibrose péri-bronchique dans la BPCO, possiblement via un effet antioxydant.

La modulation de l'activité télomérase peut être envisagée de manière pharmacologique ou par modification de l'expression génétique de certains composants notamment via une transfection virale (217). Nous avons choisi d'utiliser une modulation pharmacologique, dans un objectif d'application thérapeutique potentielle.

Plusieurs molécules sont connues pour moduler l'activité télomérase comprenant des dérivés activateurs naturels (TA-65) ou synthétiques (GRN 510) du cycloastragénol. L'inhibition pharmacologique de l'activité télomérase, a été étudiée, notamment dans les pathologies myéloprolifératives, avec une seule molécule, l'Imetelstat (19).

Des études antérieures du laboratoire ont montré que l'administration quotidienne de TA-65 pendant 4 semaines dans un modèle murin *in vivo* induisait une augmentation significative de l'expression de TERT au niveau bronchique (16). Dans ce modèle l'effet inhibiteur de l'Imetelstat n'a pas été mis en evidence. Dans nos expériences *in vitro* sur MEF (définir MEF) nous avons testé le TA-65, l'Imetelstat et leur association.

2. Discussion des résultats

Nos résultats mettent en évidence une **augmentation significative de l'activité télomérase dans les fibroblastes pulmonaires après traitement par le TA-65**. L'Imetelstat ne diminue pas cette activité. Néanmoins, l'Imetelstat diminue l'activation de la télomérase induite par le TA-65, témoignant d'une capacité inhibitrice effective.

Ces observations s'accordent avec celles de plusieurs travaux qui ont suggéré que l'inhibition de l'activité télomérase par l'Imetelstat ne s'observait que dans des situations où celle-ci était surexprimée, comme au cours des pathologies cancéreuses (218), en particulier des syndrômes myéloprolifératifs (19).

Ce résultat est également en accord avec ceux de Le Saux *et al.* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire idiopathique induite par la bléomycine : l'effet protecteur induit par un activateur de télomerase le GNR510 est inhibé par l'adjonction d'Imetelstat (GNR163L).

Nous avons exploré **les conséquences de la modulation de la télomérase sur les systèmes oxydant-antioxydants**.

Dans notre modèle de culture de lignée fibroblastique, **le TA-65 augmente l'activité de la télomérase, cette augmentation prévient la différenciation myofibroblastique et la production de ROS induites par le TGF-β.**

Cet effet antioxydant semble majoritairement induit par une diminution de l'expression de NOX4 et par une augmentation de l'expression protéique et de l'activité de la catalase.

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Bien que le remodelage bronchique soit un déterminant majeur et précoce de l'obstruction bronchique dans la BPCO, il existe peu de données sur la physiopathologie de la fibrose péri-bronchique dans la BPCO (67). Il a été montré, d'une part, que le TA-65 augmentait l'activité télomérase via une voie MAPK-dépendante et d'autre part que TGF-β était impliqué dans le développement de lésion de fibrose pulmonaire via la NOX4 (219). Perez-Rivero *et al.* ont mis en évidence que les fibroblastes embryonnaires murins déficients pour la sous-unité ARN (TERC) de la télomérase avaient une production accrue de ROS consécutive à une diminution de l'activité catalase. La restauration de l'activité télomérase induisait une augmentation de l'activité catalase. Ceci est en accord avec nos données *in vitro* suggérant l'effet antioxydant de la télomérase via une augmentation de l'activité catalase. Ces auteurs montraient également une production accrue d'anion superoxyde que nous n'avons pas observée. En effet, l'expression des NOX pourvoyeuse d'anion superoxyde (NOX1 et NOX2) n'étaient pas modifiés par le TA-65. Néanmoins, du fait de l'instabilité thermodynamique de l'anion superoxyde (dismutation rapide en H_20_2) et de l'absence de mesure de la SOD, il ne nous est pas possible de conclure quant à l'action de la télomérase sur la production d'anion superoxyde dans notre étude.

Par ailleurs, le DMSO dans lequel était dilué le TA-65 a une capacité anti-oxydante propre. En l'absence de témoin contenant du DMSO, l'effet antioxydant du TA-65 a pu être sur-estimé. Néanmoins, l'effet antixoydant propre à l'*Astragalus membranaceus* (TA-65) ayant déjà été mis en évidence, l'hypothèse d'un effet antioxydant seulement induit par le DMSO dans notre étude est peu probable (220).

3. Limites de notre travail

Nous avons confirmé l'activation pharmacologique de la télomérase par le TA-65 et mis en évidence des effets bénéfiques sur la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-β en utilisant une modulation pharmacologique de la télomérase. Notre travail présente plusieurs limites.

Le TA-65 augmente l'activité de la télomérase, cette augmentation prévient la différenciation myofibroblastique et la production de ROS induites par le TGF-β.
Cet effet antioxydant semble majoritairement induit par une diminution de l'expression de NOX4 et par une augmentation de l'expression protéique et de l'activité de la catalase. L'inhibiteur de la telomerase Imetelstat inhibe partiellement l'effet du TA-65.

Nous avons montré l'implication de la télomérase dans la différenciation des fibroblastes murins en myofibroblastes et dans la modulation du stress oxydant induits par le TGF-β. Ces premiers résultats méritent :

- La confirmation sur un nombre suffisant de déterminations permettant une validation statistique.
- La télomérase a un effet sur le maintien de la longueur des télomères. Les effets dépendants de la longueur des télomères n'ont pas été étudiés dans notre travail en parallèle des effets sur les systèmes oxydant-anti-oxydant.
- La confirmation de nos résultats sur des cultures primaires de fibroblastes pulmonaires parenchymateux et chez des souris déficientes pour la télomérase (TERT KO).
- L'utilisation d'autres inducteurs du stress oxydant. Nous avons exposé les fibroblastes murins au TGF-β. La mesure du stress oxydant et l'étude de sa modulation par la télomérase peut-être discutable du fait que le TGF-β n'est pas le seul inducteur du stress oxydant. Mattiussi *et al.* ont observé une modulation similaire du stress oxydant par la télomérase après une exposition au TNF-α. Dans des fibroblastes humains, la surexpression de hTERT (par transduction virale) réprimait fortement la production de ROS induite par le TNF-α (221).

Ces données ouvrent des perspectives dans le modèle murin de BPCO developpé au laboratoire (16) et dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans les phases précoces de BPCO.

B. Perspectives

1. La télomérase, facteur clé du vieillissement global

Les patients porteurs de mutations dans des gènes cruciaux de la maintenance des télomères montrent des phénotypes de vieillissement accélérés. C'est le cas des patients porteurs de mutations des gènes TERT, TERC ou autres gènes de maintien des télomères, qui conduisent à un syndrome de vieillissement accéléré connu sous le nom d'adyskératose congénitale (DC) (222).

La DC englobe un éventail de pathologies incluant la pigmentation anormale de la peau, la dystrophie des ongles, la leucoplasie et la pancytopénie (223). La gravité des pathologies est corrélée à

l'abondance des télomères courts chez les patients porteurs de mutations de TERT et TERC (phénomène appelé "anticipation génétique") (224).

Fait intéressant, les syndromes de télomères humains récapitulent de près les phénotypes de modèles de souris précédemment générés pour le déficit en télomérase. En particulier, les souris génétiquement déficientes en télomérase présentent une multitude de pathologies généralement caractérisées par la perte de régénération tissulaire et la fonction des organes (225-226). Outre les défauts des tissus hautement prolifératifs tels que l'os la moelle ou la peau, les souris et les humains présentant un déficit en télomérase présentent également des pathologies dans des tissus plus quiescents, tels que la cardiomyopathie, la résistance à l'insuline et la fibrose pulmonaire et hépatique (227, 228).

Plus récemment, deux études indépendantes ont démontré que l'activation de la télomérase retarde le vieillissement sans augmenter l'incidence de cancer chez un modèle de vieillissement accéléré chez la souris (souris TERT-KO de dernière génération) ou chez la souris naturelle (souris de type sauvage âgées de 1 et 2 ans) (229, 230).

Ces études soutiennent l'idée que le raccourcissement des télomères est l'un des mécanismes moléculaires du vieillissement cellulaire et de la modulation de la durée de vie, et plus particulièrement, ils démontrent que la réactivation de la télomérase chez les adultes ou personnes âgées a un effet positif sur le vieillissement, et peut être séparé de son rôle dans le cancer lorsque son expression est aberrante. Les travaux futurs devraient porter sur la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels la télomérase retarde le vieillissement et la maladie dans différents organes et tissus.

2. Régulation de la télomérase dans le cancer

Le rôle de la télomérase dans le cancer a été largement étudié. Presque tous les cancers humains présentent l'activation de la télomérase comme caractéristique, probablement comme mécanisme permettant une prolifération cellulaire illimitée des cellules tumorales (231). Bien que l'activation de la télomérase puisse être un événement précoce dans le cancer, elle n'est pas nécessaire pour déclencher le cancer (232).

Cependant, la télomérase peut stimuler la progression de la tumeur en assurant le maintien de télomères au-dessus d'une longueur critique, empêchant ainsi l'induction de la sénescence cellulaire ou de l'apoptose. Plusieurs mécanismes ont été rapportés pour activer la télomérase dans le cancer, tels que différents oncogènes, notamment Myc et Wnt, qui agissent comme régulateurs de la transcription de la télomérase (233-235).

En plus du rôle canonique de la télomérase dans le maintien des télomères au-dessus d'une longueur critique, la télomérase a également été proposée pour réguler d'autres voies qui pourraient avoir un impact sur le développement du cancer, telles que la régulation des cibles et du métabolisme des Wnt (236).

Cependant, neutraliser la télomérase peut également être problématique; le manque de télomérase pourrait conduire à une instabilité chromosomique accrue, laquelle pourrait à son tour être à l'origine du cancer lorsque des barrières de suppression tumorale sont ignorées (237). En effet, des preuves récentes ont démontré que les télomères courts seuls pouvaient entraîner une instabilité génomique et le cancer (238).

Ainsi, le point de vue actuel est que le déficit en télomérase peut contribuer aux premières étapes du développement du cancer en alimentant l'instabilité chromosomique, tandis que l'activation ultérieure de la télomérase peut être nécessaire pour permettre la croissance tumorale et la progression tumorale vers des états plus malins (239).

3. Cibles thérapeutiques de la télomérase

a) Intérêt du TA-65 dans l'activation de la télomérase

La longueur des télomères et la fonction cellulaire peuvent être préservées par la transcriptase inverse humaine télomérase (hTERT), qui synthétise le nouvel ADN télomérique à partir d'une matrice d'ARN, mais est normalement limitée aux cellules nécessitant une capacité proliférative élevée, telles que les cellules souches. En conséquence, des thérapies basées sur l'activation de la télomérase pour allonger les télomères courts sont développées, dont certaines ont atteint avec succès le stade des essais cliniques (241, 242, 243).

Le cycloastragénol, disponible sous le nom de **TA-65**, dérivé de la racine d'Astragalus membranaceus), est vendu comme complément alimentaire depuis 2013. Il a été identifié comme un activateur efficace de la télomérase dans les cellules immunitaires (activation transitoire la télomérase dans les lymphocytes T, associée au retardement du raccourcissement des télomères, à l'augmentation du potentiel prolifératif et à une réponse fonctionnelle accrue, les kératinocytes néonataux et les fibroblastes, agissant via l'activation de la voie ERK et l'amélioration subséquente de l'expression de la télomérase (241, 242, 243).

Le TA-65 a été proposée pour le traitement de l'immunosénescence accélérée chez les patients VIH afin d'augmenter le nombre de cellules T CD8 mémoire (241, 242).

Dans une petite étude pilote, le TA-65l a été utilisé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et s'est avéré améliorer les marqueurs de la santé métabolique, osseuse et cardiovasculaire (244, 245). Une augmentation modérée de la longueur des télomères leucocytaires a été observée chez l'homme (246). Cependant, le nombre de patients dans ces études était limité et certains effets avaient une importance limitée. Les études prospectives à long terme concernant les effets bénéfiques ou indésirables sont manquantes.

b) Intérêt de l'Imetelstat dans l'inhibition de la télomérase

La télomérase participe également au processus de tumorigenèse et 90% de toutes les tumeurs malignes utilisent la télomérase pour obtenir l'immortalité. Ainsi, l'inhibition de la télomérase dans les cellules tumorales est une stratégie potentielle pour traiter le cancer (240).

Les inhibiteurs naturels et synthétiques de télomérase, représentent des stratégies récentes de traitement. Il a été démontré que les oligonucléotides antisens et les acides nucléiques chimiquement modifiés inhibent la télomérase et induisent un raccourcissement des télomères associé à l'apparition subséquente de la sénescence et / ou de l'apoptose dans les cultures cellulaires (247-250).

Ces inhibiteurs agissent directement ou indirectement (en induisant l'apoptose). Les cibles comprennent la matrice d'ARN, la protéine hTERT et les protéines associées. Par exemple, l'Imetelstat, inhibiteur de l'oligonucléotide thio-phosphoramidate, cible la matrice d'ARN pour hTERT en se liant au site catalytique de la télomérase (251).

La faible expression de la télomérase dans les tissus normaux, associée aux télomères plus longs dans les cellules souches normales fournit un certain degré de spécificité avec un faible risque de toxicité (240).

Cependant, l'inhibition à long terme de la télomérase peut entraîner des effets négatifs dans les cellules hautement prolifératives nécessitant la télomérase pour survivre, et peut interférer avec les fonctions physiologiques indépendantes des télomères. Ces limitations peuvent expliquer les taux de réussite modérés dans de nombreuses études cliniques.

L'**Imetelstat** (GRN163L) a été testé avec succès sur les glioblastome (252). Ce type de cancer laisse un temps suffisant à la croissance de la tumeur et au raccourcissement des télomères jusqu'à des niveaux critiques qui déclenchent la sénescence cellulaire. Des études cliniques de phase II sont prévues pour les cancers du sein et du poumon.

Aucun effet indésirable significatif n'a été observé et des thérapies combinatoires possibles avec des régimes bien établis pour les néoplasmes myéloprolifératifs et la leucémie myéloïde aiguë sont à l'étude (18).

L'Imetelstat s'est avéré actif chez les patients atteints de myélofibrose, mais risque de provoquer une myélosuppression cliniquement significative (18). Des réponses hématologiques et moléculaires rapides et durables ont été observées chez des patients présentant une thrombocytémie essentielle et traités par Imetelstat (19).

L'ensemble de ces études concerne les activateurs ou les inhibiteurs des effets télomériques de la télomérase. Peu d'études se sont intéressées aux effets extra-télomériques.

4. Effets extra-télomériques de la télomérase

Les humains présentant un déficit en télomérase présentent également des pathologies dans des tissus plus quiescents, tels que la cardiomyopathie, la résistance à l'insuline et la fibrose pulmonaire et hépatique (227, 228).

L'hypothèse de notre travail était de savoir, si un déficit en effets extra-télomériques de la Télomérase induisait une fibrose-péribronchique médiée par le stress oxydant.

Pour cela, l'objectif de ce travail était d'étudier, sur un modèle murin, l'effet de la modulation de la télomérase par des activateurs et inhibiteurs pharmacologiques sur la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, induite par le TGF-β. . Il visait également, afin de répondre à l'hypothèse émise , à explorer les mécanismes de cette action en étudiant l'expression des enzymes anti et pro-oxydantes impliquées dans la production des ROS.

V. Conclusion

Le cancer et le vieillissement ont été étudiés en tant que maladies indépendantes. De plus en plus de preuves suggèrent que le cancer est une maladie associée au vieillissement et que cancer et vieillissement partagent de nombreuses voies moléculaires.

La télomérase est un système enzymatique impliqué dans les mécanismes associés au vieillissement et aux cancers. Une expression anormale de la télomérase ou des mutations de cette enzyme sont associés à différents types de tumeurs humaines et à des maladies liées au vieillissement comme l'emphysème et la BPCO.

La fonction la mieux connue de la télomérase est le maintien de la taille des télomères. Récemment, des fonctions extra-télomériques de cette enzyme ont été décrites : régulation de l'apoptose, régulation des dommages à l'ADN…

La connaissance des fonctions de la télomérase ont conduit au développement d'inhibiteurs et d'activateurs de la télomérase.

Parmi les inhibiteurs de la télomérase, une molécule, l'Imetelstat a démontré son efficacité thérapeutique dans la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose.

Parmi les activateurs, le TA-65, composé naturel d'Astragalus Membranaceus, produit de la pharmacopée traditionnelle Chinoise a été utilisé dans un but de thérapeutique anti-âge. Cet effet est difficile à mettre en évidence dans des essais cliniques car le vieillissement est un phénomène multifactoriel. Quelques publications suggèrent un bénéfice à la prise de TA-65 au cours de pathologies liées au vieillissement.

Expérimentalement, l'induction de l'activité télomérase par le TA-65 prévient partiellement le remodelage bronchiolaire après l'exposition à la fumée de cigarette dans un modèle murin.

Notre travail, s'est intéressé aux mécanismes de l'effet protecteur de la télomérase vis-à-vis de la transformation myofibroblastique, étape clé dans la génèse de la fibrose péri-bronchique. Nous avons pu montrer que cet effet pourrait être médié par une modulation des principaux systèmes enzymatiques anti et pro-oxydant, plus particulièrement Catalase et NOX4. La confirmation et l'approfondissement de ces résultats expérimentaux documenteraient les mécanismes par lesquels le TA-65 protège les bronchioles du remodelage et fourniraient de nouvelles perspectives dans la compréhension de la pathogénèse et le traitement de la BPCO.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. **Kumar M**, Seeger W, Voswinckel R. Senescence associated secretory phenotype and its possible role in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(3):323-33
2. **Perez T,** Garcia G, Roche N, Bautin N, Chambellan A, Chaouat A, et al. Société de pneumologie de langue française. Recommandation pour la pratique clinique. Prise en charge de la BPCO. Mise à jour 2012. Exploration fonctionnelle respiratoire. Texte long, Rev Mal Respir. 2014(31): 263-94.
3. **Disease GOLD**. Global Strategy for diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Lung Disease. (Update 2016). http://goldcopdorg/global-strategy-diagnosis-management-prevention-copd-2016/. 2016.
4. **Milot J,** Morisette M. Maladie pulmonaire obstructive chronique/ Bronchopneumopathie chronique obstructive. In : Boeck D, editor. Physiopathologie respiratoire appliquée. Canada 2014.p.111-39.
5. **Baraldo S,** Turato G, Saetta M. Pathophysiology of the small airways in chronic obstructive pulmonary disease. Respiration. 2012;84(2):89-97.
6. **Pera T,** Zuidhof A, Valadas J, Smit M, Schoemaker RG, Gosens R, et al. Tiotropium inhibits pulmonary inflammation and remodeling in a guinea pig model of COPD. Eur Respir J. 2011; 38(4):789-96.
7. **Biselli PJ,** Lopes FD, Moriya HT, Rivero DH, Toledo AC, Saldiva PH, et al. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. Braz J Med Biol Res 2011; 44(5):460-8.
8. **Bourdin A,** Burger PR, Chanez P, Garcia G, Perez T, Roche N. Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities. Eur Respir Rev. 2009;18(114):198-212.
9. **Boyer L,** Savale L, Boczkowski J, Adnot S. Sénescence cellulaire et pathologies pulmonaires : exemple de la BPCO. Rev Mal Respir. 2014;(9)893-902.
10. **Adnot** S, Amsellem V, Boyer L, Marcos E, Saker M, Houssaini A, Kebe K, Dagouassat M, Lipskaia L, Boczkowski J. Telomere Dysfunction and Cell Senescence in Chronic Lung Diseases: Therapeutic Potential. Pharmacol. Ther. 2015;153:125-34.
11. **Frippiat** C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. J Biol Chem. 2001;276(4):2531-7.

12. **Armstrong L**, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, Hole N, von Zglinicki T, Lako M. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. Stem cells. 2005;23(4):516-29.

13. **Haendeler J**, Drose S, Buchner N, Jakob S, Altschmied J, Goy C, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Brandt U, Dimmeler S. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29(6):929-35.

14. **Perez-Rivero G**, Ruiz-Torres MP, Diez-Marques ML, Canela A, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Puyol M, Blasco MA, Rodriguez-Puyol D. Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. Free Radic Biol Med. 2008;45(9):1243-51.

15. **Gansner JM**, Rosas IO. Telomeres in lung diseases. Transl Res. 2013;162(6):343-52

16. **Tiendrébéogo A**, « Rôle du TA-65 dans le remodelage des petites voies aériennes de la bronchopneumopathie chronique obstructive induit par la fumée de cigarette », Thèse de Doctorat en Sciences, sous la direction de S. Lanone, Paris, 2016.

17. **Ping L**, Haiping Z, Yumin L. Anti-Aging Implications of Astragalus Membranaceus (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic. Aging Dis. 2017;8(6):868-886

18. **Baerlocher GM**, Oppliger Leibundgut E, Ottmann OG, Spitzer G et al. Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. N Engl J Med. 2015;373(10):920-8

19. **Tefferi A**, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, et al. A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. N Engl J Med. 2015;373(10):908-19

20. **Atsou K,** Annesi-Maesano I, Chouaid C. BPCO: définition, prévalence, étiologie et évaluation medico-économique. J Fran Viet Pneu. 2012 ;03(08):1-65

21. **Fournier M,** Huchon G. Broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO). In : Flammarion M-S, editor. Traité de Pneumologie, 2^{ième} édition. France 2009.p.640-56.

22. **Roche N,** Zureik M, Vergnenègre A, Huchon G, Neukirch F. Données récentes sur la prévalence de la bronchopneumopathie chronique obstructive en France. Bull Epidemiol Hebd. 2007(27-28) :245-8.

23. **Furhman C,** Delmas M-C, SPLF. Pgéercdl. Epidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. Rev Mal Respir 2010 ;(27):160-8.

24. **Toelle BG**, Xuan W, Bird TE, Abramson MJ, Atkinson DN, Burton DL, et al. Respiratory symptoms and ilness in older Australians: the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) study. Med J Aust. 2013; 198(3):144-8.

25. **Han MK**, Martinez CH, Au DH, Bourbeau J, Boyd CM, Branson R, et al. Meeting the challenge of COPD care delivery in the USA: a multiprovider perspective. Lancet Respir Med. 2016; 4(6):473-526.

26. **Zysman M,** Patout M, Miravitlles M, van der Molen T, Lokke A, HausenT, et al. ((COPD and perception of the new GOLD document in Europe. Workshop from the Société de pneumologie de langue francaise (SPLF)). Rev Mal Respir. 2014;31(6):499-510.

27. **Patou M,** Zysman M, Raherison Semjen C, Perez T, Cuvelier A, Roche N. (EPidemiology and COPD screening in France. Workshop from the Societe de Pneumologie de Langue Francaise (SPLF)). Rev Mal Respir. 2014;31(8):692-9.

28. **Raherinson C,** Biron E, Nocent-Ejnaini C, Taille C, Tillie-Leblond I, Prudhomme A. (Are there specific characteristics of COPD in women ?). Rev Mal Respir. 2010; 27(6):611-24.

29. **Buist AS,** McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD study): a population-based prevalence study. Lancet. 2007; 370(9589):741-50

30. **Halbert RJ,** Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. Eur Respir J 2006;28(3):523-32.

31. **Mannino DM,** Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. Lancet. 2007;370(9589):765-73.

32. **Salvi SS,** Barnes PJ, Chronic Obstructive pulmonary disease in non-smokers. Lancet. 2009; 374(9691):733-43.

33. **Pauwels RA,** Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Lancet. 2004;364(9434):613-20.

34. **Vannimenus-Hayem C.** Bronchopneumopathie obstructive (BPCO) et environnement. Air Pur. 2007(71) :29-32.

35. **FARES.** Aide à l'arrêt du tabagisme chez les patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (Recommandations aux professionnels de santé). http://wwwfaresbe/fr/recommandations-bpco/ accessed August 16, 2016.

36. **Bouland C,** Jonckheer P. BPCO : Les données de l'IBGE « Interface Santé et Environnement », Observatoire des données de l'Environnement. In : Environnement B, editor. 2008.

37. **Pauwels RA,** Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, Committee GS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163(5):1256-76.

38. **Fletcher C,** Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. BMJ. 1977; 1(6077):1645-8.

39. **Chen J.** Age au moment du diagnostic d'une maladie liée à l'usage du tabac. Rapports sur la santé. 2003;14(2):9-20.

40. **Ameille J,** Dalphin JC, Descatha A, Pairon JC. (Occupationnal chronic obstructive pulmonary disease: a poorly understood disease). Rev Mal Respir. 2006;23(4 Suppl): 13S119-30.

41. **Becklake MR.** Occupational exposure: evidence for a causal association with chronic obstructive pulmonary disease. Am Rev Respir Dis. 1989;140(3 Pt 2):S85-91.

42. **Balmes JR.** Occupational contribution to the burden of chronic obstructive pulmonary disease. J Occup Environ Med. 2005;47(2):154-160.

43. **Jouneau S.** Facteurs de risques de la BPCO: au-delà de la cigarette. Rev Mal Respir. 2006;23 (5-C2):20-4.

44. **Pison C.** Broncho-pneumopathie chronique obstructive (227). Corpus Medical – Faculté de Médecine de Grenoble 2002:1-25.

45. **Bridevaux PO,** Rochat T. COPD 2011: are there other risk factors than tobacco?. Rev Med Suisse. 2011;7(317):2232-5.

46. **Matheson MC,** Benke G, Raven J, Sim MR, Kromhout H, Vermeulen R, et al. Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 2005;60(8):645-51.

47. **Salvi SS.** Tobacco Smoking and Environnemental Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Clin Chest Med. 2014(35):17-27.

48. **Allain YM,** Roche N, Huchon G. (Atmospheric air pollution: a risk factor for COPD ?). Rev Mal Respir. 2010;27(4):349-63.

49. **Sanchez-Salcedo P,** Divo M, Casanova C, Pinto-Plata V, de Torres JP, Cote C, et al. Disease progression in young patients with COPD ; rethinking the Fletcher and Peto model. Eur Respir J. 2014;44(2):324-31.

50. **(CEP) CdEdP.** BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE (BPCO) Item 205. In: SPLF, editor. Polycopié National 2015. P. 1-28.

51. **Kokturk N,** Kilic H, Baha A, Lee SD, Jones PW. Sex Difference in Chronic Obstructive Lung Disease. Does it Matter? A Concise Review. COPD. 2016 ;13(6):799-806.

52. **Eisner MD,** Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, et al. An official American Thoracic Society public policy statement : Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(5):693-718.

53. **Petrache I,** Diab K, Knox KS, Twigg HL, 3rd, Stephens RS, Flores S, et al. HIV associated pulmonary emphysema: a review of the literature and inquiry into its mechanism. Thorax. 2008;63(5):463-9.

54. **Drummond MB,** Huang L, Diaz PT, Kirk GD, Kleerup EC, Morris A, et al. Factors associated with abnormal spirometry among HIV-infected individuals. AIDS. 2015;29(13):1691-700.

55. **Sorroche PB,** Fernandez Acquier M, Lopez Jove O, Giugno E, Pace S, Livellara B, et al. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in COPD Patients: A cross Sectional Study. Arch Bronconeumol. 2015;51(11):539-43.

56. **Wan ES,** Silverman EK. Genetics of COPD and emphysema. Chest. 2009;136(3):859-66

57. **Hu G,** Shi Z, Hu J, Zou G, Peng G, Ran P. Association between polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase and COPD : results from meta-analyses. Respirology. 2008;13(6):837-50.

58. **Ito M,** Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E, Katsuyama Y, et al. The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with the emphysema phenotype of COPD in Japanese. Internal medicine. 2008;47(15):1387-94.

59. **Huang S-L,** Su C-H, S-C. C. Tumor Necrosis Factor alpha gene polymorphism in Chronic Bronchitis. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:1436-9.

60. **Silverman EK,** Palmer LJ, Mosley JD, Barth M, Senter JM, Brown A, et al. Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Am J Hum Genet. 2002;70(5):1229-39.

61. **Hogg JC,** Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. New Engl J Med. 2004;350(26):2645-53.

62. **Martin C,** Frija J, Burgel PR. Dysfunctional lung anatomy and small airways degeneration in COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2013;8:7-13.

63. **Burgel PR,** Bourdin A, Chanez P, Chabot F, Chaouat A, Chinet T, et al. Update on the roles of distal airways in COPD. Eur Respir Rev. 2011;20(119):7-22.

64. **Cosio Piqueras MG,** Cosio MG. Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J Suppl. 2001;34:41s-9s.

65. **Aoshiba K,** Nagai A. Differences in airway remodeling between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Clinical reviews in allergy and immunology. 2004;27(1):35-43.

66. **Redington AE.** Fibrosis and airay remodeling. Clin Exp Allergy. 2000;30 Suppl 1:42-5.

67. **Burgel PR.** The role of small airways in obstructive airway diseases. Eur Respir Rew. 2011;20(119):23-33.

68. **Graham S,** Carl P, Peter J B. Small airways: an important but neglected target in the treatment of obstructive airway diseases. Trends Pharmacol Sci. 2008;29(7):340-5.

69. **Skold CM.** Remodeling in asthma and COPD-differences and similarities. Clin Respir J. 2010;4 Suppl 1:20-7.

70. **Beasley MB.** Smoking-related Small airway disease—a review and update. Adv Anat Pathol. 2010;17(4):270-6.

71. **Corsico A,** Milanese M, Baraldo S, Casoni GL, Papi A, Riccio AM, et al. Small airway morphology and lung function in the transition from normality to chronic airway obstruction. J Appl Physiol. 2003;95(1):441-7.

72. **Jeffery PK,** Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164(10 Pt 2):S28-38.

73. **Caramori G,** Di Gregorio C, Carlstedt I, Casolari P, Guzzinati I, Adcock IM, et al. Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Histopathology. 2004;45(5):477-84.

74. **Burgel PR,** Bourdin A, Pilette C, Garcia G, Chanez P, Tillie-Leblond I. Structural abnormalities and inflammation in COPD : a focus on small airways. Rev Mal Respir. 2011;28(6):749-60.

75. **Araya J**, Cambier S, Markovics JA, Woltres P, Jablons D, Hill A, et al. Squamous Metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. J Clin Invest 2007;117(11):3551-62.

76. **Bonniaud P.** Mécanismes de la fibrogenèse pulmonaire. Rev Mal Respir. 2005;22:6S 101-6S 5.

77. **Wright JL,** Postma DS, Kerstjens HA, Timens W, Whittaker P, Churg A. Airway remodeling in the smoke exposed guinea pig model. Inhal Toxicol. 2007;19(11):915-23.

78. **Wynn TA,** Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. J. Exp. Med.. 2011;208(7):1339-50.

79. **Kranenburg AR,** Willems-Widyastuti A, Moori WJ, Sterk Pj, Alagappan VK, de Boer WI, et al. Enhanced bronchial expression of extracellular matrix proteins in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Clin Pathol. 2006;126(5):725-35.

80. **Salazar LM,** Herrera AM. Fibrotic response of tissue remodeling in COPD. Lung. 2011;189(2):101-9.

81. **Phan SH**. Genesis if the myfibroblast in lung injury and fibrosis. Proc Am Thorac Soc. 2012;9(3):148-152.

82. **Karvonen HM**, Lehtonen ST, Harju T, Sormunen RT, Lappi-Blanco E, Makinen JM, et al. Myofibroblast expression in airways and alveoli is affected by smoking and COPD. Respir. Res. 2013;14:84.

83. **Phan SH**, Zhang K, Zhang HY, Gharaee-Kermani M. The myofibroblast as an inflammatory cell in pulmonary fibrosis. Curr Top Pathol. 1999;93:173-82.

84. **Phan SH,** The myofibroblast in pulmonary fibrosis. Chest. 2002;122(6 Suppl):286S-9S.

85. **Chung KF,** Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. Eur Respir J. 2008;31(6):1334-56.

86. **Burgel PR.** (Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease). Presse Med. 2009;38(3):406-12.

87. **Araya J,** Nishimura SL. Fibrogenic reactions in lung disease. Annu Rev Pathol. 2010;5:77-98.

88. **Wilson MS,** Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. Mucosal Immunol. 2009;2(2):103-21.

89. **Hinz B,** Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The Myofibroblast: one function, multiple origins. Am J Pathol. 2007;170(6):1807-16.

90. **Rosas IO,** Kottmann RM, Sime PJ. New light is she on the enigmatic origin of the lung myfibroblast. Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(7):765-6.

91. **Lekkerkerker AN,** Aarbiou J, van Es T, Janssen RA, Cellular players in lung fibrosis. Curr Pharm Des. 2012;18(27):4093-102.

92. **Zhang K,** Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. Am J Pathol 1994;145(1):114-25.

93. **Bucala R,** Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A, Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol. Med. 1994;1(1):71-81.

94. **Bonniaud P.** Fibrogénèse pulmonaire, cellules mésenchymateuses et fibrocytes. Rev Mal Respir. 2007;24(ATS):75-7.

95. **Bellini A,** Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. Lab Invest. 2007;87(9):858-70.

96. **Maharaj S,** Shimbori C, Kolb M. Fibrocytes in pulmonary fibrosis: a brief synopsis. Eur Respir Rev. 2013;22(130):552-7.

97. **Strieter RM,** Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. Chest. 2009;136(5):1364-70

98. **Mehrad B,** Keane MP, Gomperts BN, Strieter RM. Circulating progenitor cells in chronic lung disease. Expert Rev Respir Med. 2007;1(1):157-65.

99. **Andersson-Sjoland A,** De Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, et al. Fibrocyte are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(10):2129-40

100. **Moeller A,** Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2009;179(7):588-94.

101. **Yokota T,** Kawakami Y, Nagai Y, Ma JX, Tsai JY, Kincade PW, et al. Bone marrow lacks transplantable progenitor for smooth muscle type alpha-actin-expressing cells. Stem-cells. 2006;24(1):13-22.

102. **Kalluri R,** Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119(6):1420-8.

103. **Degryse AL,** Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, Boomershine CS, et al. TGF-beta signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;300(6):L887-97.

104. **DeMaio L,** Buckley ST, Krishnaveni MS, Flodby P, Dubourd M, Banfalvi A, et al. Ligand-independent transforming growth factor-beta type I receptor signaling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. J Pathol. 2012;226(4):633-44.

105. **Kim KK,** Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(35):13180-5.

106. **Marmai C,** Sutherland RE, Kim KK, Dolganov GM, Fang X, Kim SS, et al. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol. 2011;301(1): L718.

107. **Kage H,** Borok Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship. Curr Opin Pulm Med. 2012;18(5):517-23.

108. **Rock JR,** Barkauskas CE, Cronce MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(52):E1475-E83.

109. **Yamada M,** Kuwano K, Maeyama T, Hamada N, Yoshimi M, Nakanishi Y et al. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal in pulmonary fibrosis. Histochem Cell Biol . 2008;129(4):453-62.

110. **Churg A,** Tai H, Coulthard T, Wang R, Wright JL. Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174(12):1327-34.

111. **Aubier M,** Marthan R, Berger P, Chambellan A, CHanez P, Aguilaniu B, et al. (COPD and inflammation: statement from a French expert group: inflammation and remodeling mechanisms). Rev Mal Respir. 2010;27(10):1254-66.

112. **Aschner Y,** Downey GP. Transforming growth factor-beta: Master regulator of the Respiratory System in Health and Disease. Am J Respir Cell Mol Biol.2016;54(5):647-55.

113. **Wang RD,** Tai H, Xie C, Wang X, Wright JL, Churg A. Cigarette smoke produces airway wall remodeling in rat tracheal explants. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(10):1232-6.

114. **Govinden R,** Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. Pharmacol. Ther. 2003;98(2):257-65.

115. **Javelaud D,** Mauviel A. (Transforming growth factor-betas : smad signaling and roles in physiopathology). Pathol Biol . 2004;52(1):50-4.

116. **Tatler AL,** Jenkins G. TGF-beta activation and lung fibrosis. Proc Am Thorac Soc. 2012;9(3):130-6.

117. **Zhang YE.** Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. Cell Res. 2009 ;19(1):128-39.

118. **Wang RD,** Wright JL, Churg A. Transforming growth factor-beta 1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants. Am J Respir Cell Mol Biol.2005;33(4):387-93.

119. **Takizawa H,** Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, et al. Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Am J Respir Crit Care Med. 2001;163(6):1476-83.

120. **Bonniaud P,** Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, et al. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in " fibrosis-resistant" BALB/c mouse lungs. Am J Respir Cell Mol Biol.2004;31(5):510-6.

121. **Sampson N,** Berger P, Zenzmaier C. Therapeutic targeting of redox signaling in myofibroblast differentiation and age-related fibrotic disease. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:458276.

122. **Siani A,** Tirelli N. Myofibroblast differentiation: main features, biomedical relevance, and the role of reactive oxygen species. Antioxid Redox Signal. 2014;21(5):768-85.

123. **Rahman I.** Oxydative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. Cell Biochem Biophys. 2005;43(1):167-88.

124. **Adnot S,** Frossard N, Adnot S, Artaud-Macari E. Telomeres and cellular senescence in respiratory disease. Rev Mal Respir. 2011;3(3):202-7.

125. **Boyer L,** Savale L, Boczkowski J, Adnot S. [Cellular senescence and pulmonary disease: COPD as an example]. Rev Mal Respir. 2014;31(10):893-902.

126. **Aoshiba K.** Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2009;6(7):596-601.

127. **Aoshiba K.** [Roles of apoptosis, cell senescence, and DNA damage in the pathogenetic mechanisms of COPD]. Nihon Rinsho. 2011;69(10):1754-7

128. **Chilosi M,** Carloni A, Rossi A, Poletti V. Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. Transl Res. 2013;162(3):156-73.

129. **Gorowiec MR,** Borthwick LA, Parker SM, Kirby JA, Saretzki GC, Fisher AJ. Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF-beta1-dependent mechanism. Free Radic Biol Med. 2012;52(6):1024-32.

130. **Zhang M,** Zhang Z, Pan Hy, Wang DX, Deng ZT, Ye XL. TGF-beta1 induces human bronchial epithelial cell-to-mesenchymal transition in vitro. Lung. 2009;187(3):187-94

131. **Bernard** K, Hecker L, Luckhardt TR, Cheng G, Thannickal VJ. NADPH Oxidases in Lung Health and Disease. Antioxid Redox Signal. 2014;20(17):2838-53.

132. **Amara N,** Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGF-β1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. Thorax. 2010;65(8):733-8.

133. **Sato** N, Takasaka N, Yoshida M, Tsubouchi K, Minagawa S, Araya J, Saito N, Fujita Y, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Hara H, Kadota T, Yanagisawa H, Hashimoto M, Utsumi H, Wakui H, Kojima J, Numata T, Kaneko Y, Odaka M, Morikawa T, Nakayama K, Kohrogi H, Kuwano K. Metformin attenuates lung fibrosis development via NOX4 suppression. Respir. Res.. 2016;17(1):107.

134. **Hollins** F, Sutcliffe A, Gomez E, Berair R, Russell R, Szyndralewiez C, Saunders R, Brightling C. Airway smooth muscle NOX4 is upregulated and modulates ROS generation in COPD. Respir. Res. 2016;17(1):1-5.

135. **Milara** J, Peiro T, Serrano A, Cortijo J. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. Thorax. 2013;68(5):410-20.

136. **Kondo T,** Tagami S, Yoshioka A, Nishimura M, Kawakami Y. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. Am J Respir Crit Care Med. 1994;149(1):178-82.

137. **Tanaka K,** Sato K, Aoshiba K, Azuma A, Mizushima T. Superiority of PC-SOD to other anti-COPD drugs for elastase-induced emphysema and alteration in lung mechanics and respiratory function in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012;302(12):L1250-61.

138. **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(3 Pt 1):331-43.

139. **Betsuyaku T,** Fuke S, Inomata T, Kaga K, Morikawa T, Odajima N, Adair-Kirk T, Nishimura M. Bronchiolar epithelial catalase is diminished in smokers with mild COPD. Eur Respir J 2013;42(1):42-53.

140. **Lubos E,** Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2011;15(7):1957-97.

141. **Bentley AR,** Emrani P, Cassano PA. Genetic variation and gene expression in antioxidant related enzymes and risk of COPD: a systematic review. Thorax. 2008;63(11):956-61.

142. **Duong C,** Seow HJ, Bozinovski S, Crack PJ, Anderson GP, Vlahos R. Glutathione peroxidase-1 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010;299(3):L425-33.

143. **Hagimoto N,** Kuwano K, Inoshima I, Yoshima M, Nakamura N, Fujita M, et al. TGF-beta1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. J Immunol . 2002;168(12):6470-8.

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

145. **Rahman I,** MacNee W. Antioxidant pharmacological therapies for COPD. Cur Opin Pharmacol. 2012;12(3):256-65.

146. **Gao W,** Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, et al. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? Respirology. 2015;20(5):722-9

147. **Fischer BM,** Voynow JA, Ghio AJ, COPD: balancing oxydants and antioxydants. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2015;10:261-76.

148. **Barnes JL,** Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis : role of NAD(P)H oxidases. Kidney Int. 2011;79(9):944-56.

149. **Hinz B,** Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. Am J Pathol. 2012;180(4):1340-55.

150. **Zhou F,** Onizawa S, Nagai A, Aoshiba K. Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. Respir. Res. . 2011;12:78.

151. **Nyunoya T,** Monick MM, Klingelhutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR ; Hunninghake GW. Cigarette smoke induces cellular senescence. Am J Respir Cell Mol Biol.2006;35(6):681-8.

152. **Hodge G,** Jespermann H, Tran HB, Roscioli E, Holmes M, Reynolds PN, et al. Lymphocyte senescence in COPD is associated with decreased histone deacetylase 2 expression by pro-inflammatory lymphocytes. Respir. Res. 2015 ;26 :130.

153. **Nau J.** Les télomères et la télomérase. Rev Med Suisse. 2009

154. **Martinez P,** Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. Nat. Rev. Cancer. 2011 ;11(3) :161-76

155. **Mason M,** Schuller A, Skordalakes E. Telomerase structure function. Curr Opin Struct Biol. 2011; 21(1): 92-100.

156. **Hu B,** Tack DC, Liu T, Wu Z, Ulllenbruch MR, Phan SH. Role of Smad3 in th regulation of rat telomerase reverse transcriptase by TGFbeta. Oncogene. 2006 ;25(7) :1030-41.

157. **Vera E,** Bernades de Jesus B, Foronda M, Flores JM, Blasco MA. Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. PLoS One. 2013 ;8(1):e53760.

158. **Armanios M.** Syndromes of telomere shortening. Annu Rev Genomics Hum Genet.. 2009 ;10 :45-61.

159. **Lai SR,** Cunningham AP, Huynh VQ, Andrews LG, ollefsbol TO. Evidence of extra-telomerase effects of hTERT and its regulation involving a feedback loop. Exp Cell Res. 2003 ;19(3) :322-30.

160. **Rufer N,** Nabholz M.Telomerase, elixir of life for human cells ?. Med Sci (Paris) . 2003 ;19(3) :345-50.

161. **Lee J,** Sung YH, Cheong C, Choi YS, Jeon HK, Sun W, et al. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. Oncogene. 2008 ;27(26) :3754-30.

162. **Blackburn EH.** Switching and signalling at the telomere. Cell. 2001 ;106(6) :661-73.

163. **Cohen SB,** Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition catalytically active human telomerase from immortal cells. Science. 2007 ;315(5820) :1850-3.

164. **Poole JC,** Andrews LG, Tollefsbol TO. Axtivity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). Gene. 2001 ;269(1-2) :1-12.

165. **Chiu CP,** Harley CB. Replicative senescence and cell immortality : the role of telomeres and telomerase. Proc Soc Exp Biol Med. 1997 ;214(2) :99-106.

166. **Auxetier C,** Greider CW. Telomerase and cancer : revisiting the telomere hypothesis. Trends Biochem Sci . 1996 ;21(10) :387-91.

167. **Gilson E,** Geli V. How telomeres are replicated. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 ;8(10) :825-38.

168. **Strong MA,** Vidal-Cardenas SL, Karim B, Yu H, Guo N, Greider CW . Phenotypes in mTERT(+)/(-) and mTERT (-)/(-) mice are due to short telomeres, not telomere-independent functions of telomerase reverse transcriptase. Mol. Cell. Biol. 2011 ;31(12) :2369-79.

169. **Kang HJ,** Choi YS, Hong SB, Kim KW, Woo RS, Won SJ, et al. Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. J Neurosci. 2004;24(6):1280-7.

170. **Cong Y,** Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. Cell research. 2008;18(7):725-32.

171. **Masutoma K,** Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005,102(23):8222-7.

172. **Tsang AR,** Wyatt HD, Ting NS, Beattle TL. hTERT mutations associated with idiopathic pulmonary fibrosis affect telomerase activity, telomere length, and cell growth by distinct mechanisms. Aging cell. 2012;11(3):482-90.

173. **Liu T,** Yu H, Ding L, Wu Z, Gonzalez De Los Santos F, Liu J, et al. Conditional Knockout of Telomerase Reverse Transcriptase in Mesenchymal Cells Impairs Mouse Pulmonary Fibrosis. PLoS One. 2015;10(11):e0142547.

174. **Povedano JM,** Martinez P, Flores JM, Mulero F, Blasco MA. Mice with Pulmonary FIbrosis Driven by Telomere Dysfunction. Cells reports. 2015;12(2):286-99.

175. **Diaz de Leon A,** Cronkhite JT, Katzenstein AL, Godwin JD, Raghu G, Glazer CS, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. PLoS One. 2010;5(5):e10680.

176. **Calado RT.** Telomeres in lung diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2014;125:173-83.

177. **Nunes H,** Monnet I, Kannengiesser C, Uzunhan Y, Valeyre D, Kambouchner M, et al. I telomeropathy the explanation for combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome?: report of a family with TERT mutation. Am J Respir Crit Care Med. 2014;189(6):753-4.

178. **Armanios M.** Reply: telomerase makes connections between pulmonary fibrosis and emphysema. Am J Respir Crit Care Med. 2014;189(6):754-5.

179. **Stanley SE,** Chen JJL, Podlesky JD, Alder JK, Hansel NN, Mathias RA, et al. Telomerase mutations in smokers with severe emphysema. J Clin Invest. 2015;125(2):563-70.

180. **Alder JK,** Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy Al, et al. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184(8):904-12.

181. **Friedlender ZG,** Cohen PY, Golan O, Arish N, Wallach-Dayan S, Breuer R. Telomerase activity in bleomycin-induced epithelial cell apoptosis and lung fibrosis. Eur Respir J. 2007;30(2):205-13.

182. **Le Saux CJ,** Davy P, Brampton C, Ahuja SS, Fauce S, Shivshankar P, et al. A novel telomerase activator suppresses lung damage in a murine model of idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One. 2013;8(3):e58423.

183. **Degryse AL,** Xu XC, Newman JL, Mitchell DB, Tanjore H, Polosukhin VV, et al. Telomerase deficiency does not alter bleomycin-induced fibrosis in mice. Exp Lung Res. 2012;38(3):124-34.

184. **Liu T,** Chung MJ, Ullenbruch M, Yu H, Jin H, Hu B, et al. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Clin Invest. 2007;117(12):3800-9.

185. **Liu T,** Ullenbruch M, Young Choi Y, Yu H, Ding L, Xaubet A, et al. Telomerase and telomere length in pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol.2000;23(4):460-5.

186. **Nozaki Y,** Liu T, Hatano K, Gharaee-Kermani M, Phan SH. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 ;23(4):460-5.

187. **De Jesus BB**, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. Circ Res. 2012; 111:97–109.

188. **Collado M,** Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. Nat Rev Cancer. 2006; 6:472–476.

189. **Ping L,** Haiping Z, Yumin L. Anti-Aging Implications of Astragalus Membranaceus (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic. Aging Dis. 2017 ;8(6):868-886.

190. **Bernardes DJB,** Schneeberger K, Vera E, Tejera A, Harley CB, Blasco MA (2011). The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. Aging Cell, 10:604-621.

191. **Vaziri H,** Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, et al. (1993). Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. Am J Hum Genet, 52: 661-667.

192. **Counter CM,** Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB (1994). Telomerase activity in human ovarian carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 2900-2904.

193. **Harley CB,** Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature, 345: 458-460.

194. **Bodnar AG,** Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science, 279: 349-352.

195. **Jaskelioff M,** Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, et al. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. Nature, 469: 102-106.

196. **Ait-Ghezala G,** Hassan S, Tweed M, Paris D, Crynen G, Zakirova Z, et al. (2016). Identification of telomerase-activating blends from naturally occurring compounds. Altern Ther Health Med, 22 Suppl 2: 6-14.

197. **Reichert S,** Bize P, Arrive M, Zahn S, Massemin S, Criscuolo F (2014). Experimental increase in telomere length leads to faster feather regeneration. Exp Gerontol, 52: 36-38.

198. **Salvador L,** Singaravelu G, Harley CB, Flom P, Suram A, Raffaele JM (2016). A natural product telomerase activator lengthens telomeres in humans: a randomized, double blind, and placebo controlled study. Rejuvenation Res, 19: 478-484.

199. **Harley CB,** Liu W, Flom PL, Raffaele JM (2013). A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: metabolic and cardiovascular response. Rejuvenation Res, 16: 386-395.

200. **Harley CB,** Liu W, Blasco M, Vera E, Andrews WH, Briggs LA, et al. (2011). A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program. Rejuvenation Res, 14: 45-56.

201. **Molgora B,** Bateman R, Sweeney G, Finger D, Dimler T, Effros RB, et al. (2013). Functional assessment of pharmacological telomerase activators in human T cells. Cells. 2013 Jan 14;2(1):57-66.

202. **Chiappori AA,** Kolevska, T, Spigel DR, Hager S, Rarick M, Gadgeel S, Blais N, Von Pawel J, Hart L, Reck M, et al. A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 2015 ;26(2):354-62..

203. **Asai A,** Oshima Y, Yamamoto Y, Uochi TA, Kusaka H, Akinaga S, Yamashita Y, Pongracz K, Pruzan R, Wunder E, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. Cancer Res. 2003; 63, 3931–3939.

204. **Gellert GC,** Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW. Effects of a novel telomerase inhibitor,GRN163L, in human breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 2006; 96, 73–81.

205. **Hochreiter AE,** Xiao H, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Miller KD, Badve S, Sledge GW, Herbert BS. Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. Clin. Cancer Res. 2006; 12, 3184–3192.

206. **Herbert B,** Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 1999; 96, 14276–14281.

207. **Harrison CN,** Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. N Engl J Med 2005 ; 353 : 33-45.

208. **Gisslinger H,** Gotic M, Holowiecki J, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. Blood 2013 ; 121 : 1720-8.

209. **Quintas-Cardama A,** Abdel-Wahab O, Manshouri T, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon a-2a. Blood 2013 ; 122 : 893-901.

210. **Brunold C,** Braschler TR, Go N, et al. Imetelstat, a potent telomerase inhibitor, inhibits the spontaneous growth of CFU-Meg in vitro from essential thrombocythemia patients but not from healthy individuals. Presented at the 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011. abstract.

211. Boukhenouna S, Wilson MA, Bahmed K, Kosmider B.Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:5730395

212. **Normand** J, Karasek MA. A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1995; 31(6):447-55.

213. **McAnulty RJ**. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. Int J Biochem Cell Biol . 2007;39(4):666-671.

214. Nyunoya T, Monick MM., Klingelhutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW. Cigarette smoke induces cellular senescence. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006; 35(6):681-8.

215. **Alder JK,** Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy AI, Walsh MF, Sussan T, Biswal S, Mitzner W, Tuder RM, Armanios M. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184(8):904-12.

216. **Tarkanyi I,** Aradi J. Pharmacological intervention strategies for affecting telomerase activity: future prospects to treat cancer and degenerative disease. Biochimie. 2008;90(1):156-72.

217. **Ouellette MM,** Wright WE, Shay JW. Targeting telomerase-expressing cancer cells. J. Cell. Mol. Med . 2011;15(7):1433-42.

218. **Xu X,** Li F, Zhang X, Li P, Zhang X, Wu Z, Li D. In vitro synergistic antioxidant activity and identification of antioxidant components from Astragalus membranaceus and Paeonia lactiflora. PLoS One. 2014;9(5):e96780.

219. **Mattiussi M,** Tilman G, Lenglez S, Decottignies A. Human telomerase represses ROS dependent cellular responses to Tumor Necrosis Factor-alpha without affecting NF-kappaB activation. Cell Signal. 2012;24(3):708-17.

220. **Calado RT,** Young NS. Telomere diseases. N Engl J Med. 2009 ;361:2353–2365.

221. **Dokal I.** Dyskeratosis congenita. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:480–6

222. **Armanios M.** Syndromes of telomere shortening. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009; 10:45–61.

223. **Martinez P,** Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere binding proteins. Nat Rev Cancer. 2011; 11:161–176

224. **Beier F,** Foronda M, Martinez P, Blasco MA. Conditional TRF1 knockout in the hematopoietic compartment leads to bone marrow failure and recapitulates clinical features of Dyskeratosis congenita. Blood. 2012; 120:2990–3000.

225. **Leri A,** et al. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. EMBO J. 2003; 22:131–139.

226. **Basel-Vanagaite L,** et al. Expanding the clinical phenotype of autosomal dominant dyskeratosis congenita caused by TERT mutations. Haematologica. 2008; 93:943–944.

227. **Bernardes de Jesus B,** et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. EMBO Mol Med. 2012; 4:1–14.

228. **Jaskelioff M,** et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice. Nature. 2011; 469:102–106.

229. **Shay JW,** Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer. 1997;33:787–791.

230. **Hackett JA,** Greider CW. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. Oncogene. 2002; 21:619–626.

231. **Wu KJ,** et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. Nat Genet. 1999; 21:220–224.

232. **Hoffmeyer K,** et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. Science. 2012; 336:1549–1554.

233. **Greider CW.** Molecular biology. Wnt regulates TERT--putting the horse before the cart. Science. 2012; 336:1519–1520.

234. **Park JI,** et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. Nature. 2009; 460:66–72.

235. **Feldser DM,** Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. Cancer Cell. 2007; 11:461–469.

236. **Begus-Nahrmann Y,** et al. Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis. J Clin Invest. 2012; 122:2283–2288.

237. **Ding Z,** et al. Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. Cell. 2012; 148:896–907.

238. **Jäger K,** Walter M. Therapeutic Targeting of Telomerase. Genes (Basel). 2016 Jul 21;7(7). pii: E39

239. **Fauce SR,** Jamieson BD, Chin AC, Mitsuyasu RT, Parish ST, et al. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes. J. Immunol. 2008; 181, 7400–7406

240. **Dock JN**, Effros RB. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. Aging Dis. 2011; 2, 382–397.

241. **Harley CB,** Liu W, Blasco M, Vera E, Andrews WH, Briggs LA, Raffaele JM. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program. Rejuven. Res. 2011; 14, 45-56.

242. **Dow CT,** Harley CB. Evaluation of an oral telomerase activator for early age-related macular degeneration-a pilot study. Clin Ophthalmol. 2016; 10, 243–249.

243. **Harley CB,** Liu W, Flom PL, Raffaele JM. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: Metabolic and cardiovascular response. Rejuven. Res. 2013; 16, 386–395.

244. **Salvador L,** Singaravelu G, Harley CB, Flom P, Suram A, Raffaele JM. A Natural Product Telomerase Activator Lengthens Telomeres in Humans: A Randomized, Double Blind, and Placebo Controlled Study. Rejuvenation Res. 2016 Dec;19(6):478-484.

245. **Pitts AE,** Corey DR. Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 95, 11549–11554

246. **Herbert B,** Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96, 14276–14281.

247. **Corey DR.** Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials. Oncogene. 2002 ;21(4):631-7.

248. **Asai A,** Oshima Y, Yamamoto Y, Uochi TA, Kusaka H, Akinaga S, Yamashita Y, Pongracz K, Pruzan R, Wunder E, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. Cancer Res. 2003; 63, 3931–3939.

249. **Harley CB.** Telomerase and cancer therapeutics. Nat. Rev. Cancer 2008; 8, 167–179.

250. **Marian CO,** Cho SK, McEllin BM, Maher EA, Hatanpaa KJ, Madden CJ, Mickey BE, Wright WE, Shay JW, Bachoo RM. The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. Clin. Cancer Res. 2010; 16, 154–163.

251. **Sprouse A.A,** Steding CE, Herbert BS. Pharmaceutical regulation of telomerase and its clinical potential. J. Cell. Mol. Med. 2012; 16, 1–7.

252. **Calin O Marian**, Steve K. Cho, Brian M. McEllin, Elizabeth A. Maher et al. The Telomerase Antagonist Imetelstat Efficiently Targets Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Leading to Decreased Proliferation and Tumor Growth. Clin Cancer Res. 2010 ; 16(1): 154–163

RESUME

Contexte: La BPCO est une maladie fréquente des voies respiratoires qui pose un réel problème de santé publique, puisqu'elle touche actuellement plus de 300 millions de personnes dans le monde. Cette maladie plurifactorielle résulte au niveau bronchique de l'apparition d'une fibrose péri-bronchique caractérisée par la transformation de fibroblastes en myofibroblastes. Parmi les mécanismes physiologiques potentiels, une accumulation de ROS au niveau de l'arbre bronchique dû à une modification de l'activité télomérase pourrait jouer un rôle dans la BPCO. Nos **objectifs** étaient de confirmer l'effet de la télomérase par une modification pharmacologique de son activité : effecteur TA-65, inhibiteur Imetelstat et d'explorer l'impact de cette modulation sur les systèmes enzymatiques anti et pro-oxydants suite à une exposition ou non au TGF-β. **Méthode :** L'étude a été conduite sur une lignée de MEF d'origine pulmonaire traités pdt 1 semaine à différentes conditions : témoin, TA-65, Imetelstat, TA-65 + Imetelstat, exposés ou non au TGF-β. **Résultats :** Le TA-65 augmente l'activité de la protéine télomérase dans les MEF, ce qui prévient la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes induite par le TGF-β *in vitro*. Le TA-65 diminue la production de ROS dans les MEF exposés *in vitro* au TGF-β principalement en inhibitant l'expression de NOX-4 et en augmentant l'activité de la catalase.

Mots clés : BPCO, Télomérase, Modulation, TA-65, systèmes anti- pro- oxydants.

RESUME ANGLAIS

Context: COPD is a common respiratory disease that poses a real public health problem, as it currently affects more than 300 million people worldwide. This multifactorial disease results at the bronchial level of the appearance of peribronchial fibrosis characterized by the transformation of fibroblasts into myofibroblasts. Among the potential physiological mechanisms, an accumulation of ROS in the bronchial tree due to a change in telomerase activity could play a role in COPD. **Our objectives** were to confirm the effect of telomerase by pharmacological modification of its activity: effector TA-65, inhibitor Imetelstat and to explore the impact of this modulation on anti and pro-oxidant enzyme systems following exposure or no to TGF-β. **Method:** the study was conducted on a pulmonary MEF line treated for 1 week under different conditions: control, TA-65, Imetelstat, TA-65 + Imetelstat, or not exposed to TGF-β. **Results:** TA-65 increases the activity of telomerase protein in MEFs, which prevents fibroblast differentiation into TGF-β-induced myofibroblasts in vitro. TA-65 decreases ROS production in MEFs exposed in vitro to TGF-β primarily by inhibiting NOX-4 expression and increasing catalase activity. **Key words:** COPD, telomerase, modulation, TA-65, anti and pro-oxidant systems.

Discipline

Toxicologie/Pneumologie

Intitulé/Adresse Laboratoire

Unité INSERM U955, Equipe 4, Faculté de Médecine, 8 Rue du Général Sarrail, 94000 Créteil