

Je dédie ce travail à

à Mes parents,

à Jeanne,

à Pauline.

AVANT-PROPOS

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a été effectué dans les laboratoires de Pathologie Immuno-Allergique Respiratoire, INSERM U 416, que dirige le Professeur Tonnel, et de Pathologie Respiratoire Expérimentale et de Pollution Atmosphérique, que dirige le Professeur Voisin. Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Communauté Européenne du Charbon et de l'Acier (CECA contrat n° : 7280-03-018).

Je remercie Monsieur le Professeur Dhainaut, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur Housset et au Professeur Aubier de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

Je remercie le Professeur Vargaftig de l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'en être examinateur.

Cette thèse a été dirigée par le Professeur Voisin. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité et pour la confiance qu'il a su m'accorder.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur Tonnel et au Docteur Joseph pour leur participation efficace à l'élaboration de ce travail, et pour leur accueil qu'ils m'ont réservé au début de ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Wallaert et le Docteur Gosset pour l'intérêt qu'ils ont manifesté au cours de nombreuses réunions, et pour leur participation efficace à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie tous les membres du Laboratoire d'Immuno-Allergologie Respiratoire de l'Institut Pasteur de Lille, pour leur soutien sans réserve et leur aide tout au long de ces années de travail en commun :

Melle Tsicopoulos, Mr Pestel, Mr Lassalle,
Mr et Mme Delneste, Mme Tillie-Leblond,
Mme Marchandise, Mr Vorng.

Je remercie tous les membres de Pathologie Respiratoire Expérimentale et de Pollution Atmosphérique de l'Institut Pasteur de Lille, pour leur accueil si sympathique et leurs encouragements permanents :

Mr Marquillies, Melle Fourneau, Melle Merdy,
Mme Szeremeta.

Je remercie le Professeur Capron qui dirige le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, ainsi que tous les membres de son laboratoire pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au début de mon DEA.

RESUMÉ

Parmi les pathologies affectant l'interstitium pulmonaire, la pneumoconiose du mineur de charbon est une des maladies pulmonaires fibrosantes les plus répandues. Causée par l'inhalation de poussières de charbon, elle se divise en deux groupes : la Pneumoconiose Simple (PS, lésions fibrotiques limitées, opacités radiologiques inférieures à 1 cm) et la Fibrose Massive Progressive (FMP, réaction fibrosante périfocale et extensive avec altérations sévères de la fonction respiratoire). Bien que sa physiopathologie ne soit pas complètement élucidée, de nombreux travaux suggèrent la participation du macrophage alvéolaire (MA) dans la réaction inflammatoire caractérisée par une alvéolite principalement de type macrophagique. De par sa capacité à produire un large panel de médiateurs (métabolites de l'oxygène, enzymes, métabolites de l'acide arachidonique, cytokines) les MA jouent un rôle primordial dans la réaction inflammatoire pulmonaire.

Après avoir démontré la capacité des poussières de mine à activer le MA *in vitro* (Gosset et al, 1991), la détection des ARN messagers TNF et IL-6 dans le tissu pulmonaire de patients pneumoconiotiques nous a permis de démontrer l'activation du MA *in vivo*. Au niveau cellulaire le pourcentage de MA exprimant les ARN messagers est significativement plus élevé chez les patients présentant une FMP par comparaison aux PS et aux sujets témoins. Au niveau tissulaire les messagers TNF et IL-6 sont uniquement observés pour les patients présentant une fibrose massive progressive. Les messagers IL-6 sont détectés au niveau des macrophages, mais d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales (CE) apparaissent elles aussi positives. La synthèse des protéines correspondantes est confirmée par immunohistochimie. Nous avons donc confirmé l'activation macrophagique chez les patients pneumoconiotiques ainsi que de l'existence d'une activation de l'endothélium vasculaire.

A coté d'une réaction inflammatoire chronique, la pneumoconiose du mineur de charbon est aussi caractérisée par un processus fibrosant. Il était donc primordial de déterminer le rôle des différents facteurs de croissance pour les fibroblastes sécrétés par le MA : PDGF, IGF-1, TGF β . Le premier est connu pour être un facteur de croissance du type "compétence", l'IGF-1 : un facteur du type "progression". Le TGF β est lui considéré comme un facteur de régulation de la prolifération fibroblastique. Tandis que les deux facteurs profibrosants : PDGF et IGF-1 sont sécrétés spontanément par les MA de patients et de façon exagérée par les MA de patients présentant une FMP comparativement aux PS, le TGF β est détecté dans les surnageants de MA de patients présentant une PS. La détection de ces facteurs dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire confirme un profil de sécrétion identique *in vivo*. Compte tenu de la dualité fonctionnelle du TGF β , ces résultats préliminaires ont permis de bâtir l'hypothèse selon laquelle le TGF β serait un facteur potentiel de protection du développement de la fibrose pulmonaire ainsi que de la réaction inflammatoire observée dans la pneumoconiose du mineur de charbon.

Dans la première partie nous avons démontré l'activation de la CE dans le poumon pneumoconiotique. De par sa situation elle joue un rôle important dans le contrôle de l'afflux cellulaire, dans le cas présent de macrophages, vers l'alvéole par l'expression de molécule d'adhérence cellulaire : principalement ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1. Afin d'étudier le comportement de la CE dans une situation de réaction inflammatoire chronique, nous avons mis en place un modèle *in vitro* de réaction chronique mimée par l'addition répétée d'un stimulus inflammatoire : le TNF. Nous avons évalué la réaction de la cellule endothéliale dans deux conditions : réaction inflammatoire aiguë et réaction inflammatoire chronique. Le modèle de réaction inflammatoire chronique nous montre que, contrairement à la situation aiguë (une dose unique de TNF), l'addition de TNF de façon répétée induit une expression importante et persistante de l'ICAM-1. De plus l'expression est maintenue même en absence de TNF détectable dans le surnageant de culture. Il semble donc qu'une très faible addition de TNF suffise à maintenir l'expression maximale de l'ICAM-1. Ces résultats permettent d'envisager un mécanisme nouveau dans la régulation de l'expression des molécules d'adhérence et en particulier de l'ICAM-1 au cours de la pneumoconiose.

Les macrophages alvéolaires sont présents en grand nombre dans les poumons de patients présentant une **Pneumoconiose du mineur de charbon**. Chez ces patients ces cellules produisent des taux accrus d'un large panel de médiateurs et de cytokines. Alors que la charge en particules inhalées est souvent similaire chez les mineurs de charbon, et malgré la capacité intrinsèque des poussières d'induire la production de tous les médiateurs, les différences qualitatives et quantitatives des sécrétions macrophagiques peuvent représenter une explication intéressante des différences observées entre **Pneumoconiose Simple** et **Fibrose Massive Progressive**. Certains mineurs, en raison d'un profil de sécrétion des cytokines différents peuvent développer, malgré une exposition au risque similaire, une forme plus sévère de pneumoconiose avec des lésions pulmonaires plus étendues et une diminution de la fonction respiratoire. Il apparaît donc que l'évaluation du profil de sécrétion des cytokines, et en particulier le TGF β , puissent ouvrir de nouvelles issues dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la pneumoconiose mais aussi probablement d'autres pathologies interstitielles affectant le tissu pulmonaire.

PUBLICATIONS

1991

Gosset P, Lassalle P, Vanhée D, Wallaert B, Aerts C, Voisin C, Tonnel AB. 1991. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 by human alveolar macrophages exposed *in vitro* to coal mine dust. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5 : 431-436.

1992

Tran A, Vanhée D, Capron A, Vorng H, Braquet P, Joseph M. 1992. Separate induction of human blood platelet aggregation or cytotoxicity by different concentrations of PAF-acether and thrombin. *Agents Actions.* 36 : 39-43.

1993

Vanhée D, Joseph M, Vorng H, Tonnel AB. 1993. A colorimetric assay based on the reduction of a tetrazolium salt to evaluate the immune reactivity of blood platelets. *J Immunol. Methods.* 159 : 253-259.

1994

Vanhee D, Delneste Y, Lassalle P, Gosset P, Joseph M, Tonnel AB. 1994. Modulation of endothelial cell adhesion molecule expression in a situation of chronic inflammatory stimulation. *Cell Immunol.* Sous presse.

Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB. 1994. Role of macrophage-derived cytokines in coal workers' pneumoconiosis. In "Cells and Cytokines in lung inflammation". Chignard M, Pretolani M, Renesto P, Vargaftig BB Editors. *Ann NY Acad Sci.* Sous presse.

Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. 1994. Evaluation of proinflammatory cytokine expression in alveolar macrophages and in the lung of pneumoconiotic patients. In "Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres." NATO A.S.I. Series. Davies JMG, Jauran MC Editors. Springer Verlag Ed. Berlin-heidelberg. Sous press.

Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis : increased production of PDGF and IGF-1 in progressive massive fibrosis, and control of fibroblast growth by TGF β in simple pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis.* Sous presse.

1994

Vanhée D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB. Secretion and mRNA expression of TNF α and IL-6 in alveolar macrophages and in the lung of pneumoconiotic patients. *Am Rev Respir Dis*. Soumis.

1994

(manuscript en préparation)

Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB.
Cytokine network in coal workers' pneumoconiosis.
revue générale pour l'Eur Respir J.

Vanhée D, Boitelle A, Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB.
Aluminium salt treatment of coal mine dust prevent macrophage activation *in vitro*.

COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS ORALES

Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. Secretion and mRNA expression of TNF α and IL-6 in the lung of pneumoconiotic patients. European Respiratory Society. 1993. Florence.

Tonnel AB, Gosset P, Vanhee D, Wallaert B. Role of macrophages in pulmonary diseases.
Symposium : "Cytokines in the lung". 1993. Paris.

Vanhée D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB. Secretion and mRNA expression of TNF α and IL-6 in the lung of pneumoconiotic patients.
Workshop "Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres". Paris.

POSTER

Vanhée D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB. Secretion and mRNA expression of TNF α and IL-6 in the lung of pneumoconiotic patients.
American Thoracic Society. International Conference. 1993. San Francisco

Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB.
Mechanisms of fibrosis in Coal Workers' Pneumoconiosis : Respective role of PDGF, IGF-1 and TGF β .
American Thoracic Society. International Conference. 1994. Boston.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE	1
INTRODUCTION.....	2
DÉFINITION	4
GENESE DE LA PNEUMOCONIOSE DU MINEUR DE CHARBON.....	9
LA FIBROSE MASSIVE PROGRESSIVE	12
APPROCHE PHYSIOPATHOLOGIQUE	16
DONNÉES ANAMNESTIQUES	16
Influence de l'empoussiérage.....	17
Théorie infectieuse.....	18
Théorie immunologique.....	19
Facteurs génétiques.....	21
En conclusion.....	21
BIOLOGIE DE LA PNEUMOCONIOSE DU MINEUR DE CHARBON.....	22
Modèles animaux de pneumoconiose expérimentale.....	23
Activation du macrophage alvéolaire après exposition in vitro aux particules minérales	27
OBJECTIFS DU PRÉSENT TRAVAIL.....	34
SELECTION DES POPULATIONS	36
TECHNIQUE DE RECUEIL DU MATERIEL CELLULAIRE	36
PATIENTS	36
Groupes des mineurs de charbon	36
Groupes des sujets témoins.....	37
MÉTHODE D'ÉTUDE DU LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE	37
Technique du lavage broncho-alvéolaire (LBA) [71, 97, 98].....	37
Méthode d'étude du lavage broncho-alvéolaire.....	37
DEUXIEME PARTIE.....	40
SECRETION ET EXPRESSION DES ARN MESSAGERS CODANT POUR LE TNF ET L'IL-6 PAR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES ET DANS LES POUMONS DE PATIENTS PNEUMOCONIOTIQUES	41
INTRODUCTION.....	41
MATÉRIELS ET MÉTHODES	42
Patients.....	42
Isolement et mise en culture des macrophages alvéolaires	42
Dosages des cytokines dans les surnageants de culture des macrophages alvéolaires.....	43
Préparation des cyto centrifugations de macrophages alvéolaires et des coupes de tissu pulmonaire.....	44
Sondes nucléiques.....	45
Hybridation in situ	45
Immunohistochimie.....	46
Analyse statistique.....	47
RESULTATS.....	47
Expression des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 par les cellules isolées du lavage bronchoalvéolaire.....	47

Corrélation entre la présence de poussières de mines et l'expression de l'ARN messager codant pour le TNF.....	4 8
Corrélation entre l'expression des ARN messagers et la sécrétion des monokines	5 0
Détection des ARN messagers pour le TNF et l'IL-6 dans le poumon normal et le poumon pneumoconiotique	5 1
DISCUSSION.....	5 6
SECRÉTION DE MEDIATEURS PROFIBROSANTS PAR LES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES DE PATIENTS PNEUMOCONIOTIQUES.....	6 2
INTRODUCTION.....	6 2
MATERIELS ET METHODES.....	6 3
Patients.....	6 3
Isolement et mise en culture des macrophages alvéolaires	6 4
Méthode d'exposition des macrophages alvéolaires aux particules minérales	6 4
Mesure de l'activité Lactate déshydrogénase.....	6 5
Dosages des cytokines.....	6 5
Mesure de la prolifération des fibroblastes.....	6 7
Analyse statistique.....	6 8
RESULTATS.....	6 8
Effets des particules minérales sur la production de PDGF, IGF-1 et TGFb par les macrophages alvéolaires	6 8
Détection du PDGF, IGF-1 et TGFb dans les liquides de lavages.....	6 9
Sécrétion de cytokines par les macrophages alvéolaires après 3 H de culture.	7 0
Prolifération de fibroblastes pulmonaires en réponse à un surnageant de macrophage alvéolaire ou au TGFb purifié.....	7 3
DISCUSSION.....	7 5
REPONSE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE DANS UNE SITUATION DE STIMULATION INFLAMMATOIRE CHRONIQUE.....	8 0
INTRODUCTION.....	8 0
Réactifs.....	8 4
Culture des cellules endothéliales humaines.....	8 4
Conditions de stimulation des cellules endothéliales par le TNF.....	8 4
ELISA sur cellule endothéliale.....	8 7
Adhérence de cellules U937 aux cellules endothéliales.....	8 7
Dosage du TNF.....	8 8
Détermination de la viabilité cellulaire.....	8 8
RESULTATS.....	8 9
Cinétique d'expression des molécules d'adhésion après une stimulation unique par le TNF : le modèle de la réaction inflammatoire aiguë (RIA).....	8 9
Cinétique d'expression des molécules d'adhésion après une stimulation répétée par le TNF : le modèle de la réaction inflammatoire chronique (RIC).....	9 1
Cinétique d'expression des molécules d'adhésion dans le cadre d'une réaction inflammatoire chronique interrompue.....	9 2
L'expression de l'ICAM-1 est en relation avec une augmentation de l'adhérence des cellules U937 à la cellule endothéliale.....	9 3
DISCUSSION.....	9 5

TROISIEME PARTIE.....	100
DISCUSSION GENERALE.....	101
HYPOTHESES PATHOGENIQUES	103
INITIATION, PERENNISATION ET REGULATION DE LA REACTION INFLAMMATOIRE.....	107
LES MECANISMES DE FIBROSE	110
L'INSTALLATION DES LESIONS EMPHYSEMATEUSES.....	113
Définition et pathogénie de l'emphysème.....	113
Emphysème et Pneumoconiose du mineur de charbon.....	115
DESORDRES IMMUNOLOGIQUES	117
ET LEURS CONSEQUENCES.....	117
PERSPECTIVES DE RECHERCHE	119
INITIATION, PÉRENNISATION ET RÉGULATION DE LA RÉACTION INFLAMMATOIRE.....	119
LES MÉCANISMES DE FIBROSE	122
Expression des ARN messagers spécifiques des mediateurs profibrosants par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques.....	123
Approche in vitro de la modulation de l'expression et de la sécrétion des facteurs de croissance et en particulier du TGFb.....	124
Analyse des coopérations entre macrophages alvéolaires et fibroblastes.....	125
INSTALLATION DES LÉSIONS EMPHYSEMATEUSES.....	127
CONCLUSION.....	130
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 131

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION

Les pneumoconioses sont des affections caractérisées par le dépôt de poussières inorganiques, minérales ou métalliques, au niveau du tissu pulmonaire. L'appareil respiratoire dispose de moyens de protection et d'épuration visant à le protéger contre la pénétration des particules, et à éliminer celles qui s'y déposent. Le développement d'une **Pneumoconiose** suppose que ces moyens naturels de défense soient débordés, entraînant l'accumulation de poussières au niveau du tissu pulmonaire.

Certaines de ces poussières n'exercent pas d'actions nocives propres sur les tissus environnants : elles n'interviennent que par la masse qu'elles représentent, et sont à l'origine de pneumoconioses dites "de surcharge". D'autres au contraire, comme les poussières de silice ou d'amiante, induisent le développement de désordres tissulaires complexes, progressifs, poursuivant leur évolution après la fin de l'exposition au risque : il s'agit alors de pneumoconioses fibrosantes dont les plus fréquentes sont la silicose, les pneumoconioses à poussières mixtes et l'asbestose.

Par leur fréquence, leur diversité et les problèmes de réparation qu'elles soulèvent, ces maladies représentent un chapitre important de la pneumologie [1-7]. La silicose et les pneumoconioses à poussières mixtes sont les maladies professionnelles les plus répandues dans le monde. La silicose est liée à l'inhalation de particules de silice (SiO_2), les pneumoconioses à poussières mixtes, à l'inhalation de particules minérales ou métalliques de natures diverses, mêlées à une quantité variable de silice libre. Dans l'un et l'autre cas, les caractéristiques cliniques et radiologiques générales des lésions pulmonaires sont proches, avec des différences dans les modalités évolutives.

En France, c'est l'industrie minière qui est responsable de la survenue du plus grand nombre de pneumoconioses à poussières mixtes. C'est dans le Nord-Pas-de-Calais que l'on dénombre le plus grand nombre de patients atteints de **Pneumoconiose du**

mineur de charbon comparativement aux autres bassins houillers considérés comme relativement moins silicogènes.

DÉFINITION

La pneumoconiose du mineur de charbon regroupe une multitude de tableaux cliniques conséquence de l'inhalation de poussière de charbon et de ces impuretés, la quantité de silice dans les poussières inhalées pouvant être très variable. Cette pneumoconiose est classiquement divisée en deux groupes sur des critères radiologiques : la **Pneumoconiose Simple** dans laquelle des opacités de moins de 1 centimètre sont observées, et la **Fibrose Massive Progressive** caractérisée par des opacités de plus de 1 centimètre et dont la confluence aboutit au tableau ultime de masses pseudo-tumorales [8-11]. Cette classification radiologique, définie par le bureau international du travail (1980, Tableau 1) qui apprécie la taille et l'étendue des opacités radiologiques, est justifiée en pratique pneumologique puisque les patients avec fibrose massive progressive possèdent un bilan fonctionnel respiratoire plus altéré [12-14], sont plus volontiers sujets aux complications de la pneumoconiose et par voie de conséquence ont une espérance de vie inférieure à celle des mineurs présentant une pneumoconiose simple. A un niveau macroscopique les lésions pulmonaires peuvent apparaître sous forme de nodule silicotique bien délimité ou sous forme plus diffuse on parle alors de fibrose réticulo-nodulaire ou de fibrose massive [15-17].

Tableau 1 : classification des anomalies parenchymateuses de nature pneumoconiotique (d'après la classification internationale du bureau international du travail 1980).

Petites opacités (d'un diamètre inférieur à 10 mm)		
Densité	catégorie 0	petites opacités absentes, ou moins nombreuses que la limite inférieure de la catégorie 1, définie par le cliché type.
Taille et forme	catégorie 1, 2,3	représentent une densité croissante de petites opacités, définie par le cliché type correspondant
	arrondies	p diamètre jusqu'à 1,5mm
		q diamètre compris entre 1,5 et 3mm
		r diamètre compris entre 3 et 10mm
	irrégulières	s largeur jusqu'à 1,5mm
		t largeur comprise entre 1,5 et 3mm
u largeur comprise entre 3 et 10 mm		
mixtes	la coexistence d'images arrondies et irrégulières s'exprime par l'association des deux sigles correspondant à la taille de ces images, le premier cité étant celui des anomalies dominantes.	
Opacités étendues		
Densité	catégorie A	opacités dont le diamètre est compris entre 10 et 50mm, ou plusieurs opacités d'un diamètre supérieur à 10mm, la somme des plus grand diamètre n'excède pas 50mm
	catégorie B	une ou plusieurs opacités dont la surface totale ne dépasse pas l'équivalent de la zone supérieure droite
	catégorie C	une ou plusieurs opacités dont la surface totale dépasse l'équivalent de la zone supérieure droite
	catégorie ax	coalescence de petites opacités

Un certain nombre de publications, pour la plupart relativement anciennes, ont montré sans ambiguïté que les fortes expositions aux poussières de charbon, pouvaient entraîner l'apparition d'une pneumoconiose différente de la silicose. Que la pneumoconiose du mineur puisse englober des effets dus au quartz et à divers silicates est certain, surtout pour les mineurs ayant travaillé au rocher, mais dans les bassins miniers à forte incidence il est non moins certain que la pathologie en cause est due pour l'essentiel aux poussières de charbon [18]. A ce titre, il serait plus judicieux de revenir à l'appellation d'antracose qui a l'avantage de distinguer sans ambiguïté cette pathologie de la silicose.

On peut insister sur les différences entre antracose simple et silicose :

- différences entre macules dues au charbon, avec une fibrose très limitée et irrégulière, et macules dues à la silice, avec une fibrose locale dense, d'où d'ailleurs les différences au plan radiologique entre les deux pathologies.

- différence dans l'association avec l'emphysème focal très fréquente dans l'antracose, inexistante dans la silicose. Même quand l'emphysème n'est pas visible dans l'antracose, on note la dégradation des fibres d'élastine dans le nodule. L'emphysème en combinaison avec les lésions locales dues à la poussière constitue le trait le plus marquant de la maladie [19]. Des études récentes confirment cette observation [20-22]. Une étude australienne (Leigh *et al*, présentation au colloque "NATO advanced research workshop" entitled : "Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres" 1993) portant sur une population de 202 mineurs démontre une relation significative entre les lésions emphysémateuses et la charge anthracosique du poumon ($p < 0,03$). Cette relation n'est toutefois pas significative en regards de la charge en silice ($p = 0,11$). L'emphysème est donc considéré comme un facteur important dans la production de la dyspnée qui caractérise la maladie au plan clinique et est probablement le principal facteur d'invalidité de la forme simple de cette maladie [14].

Au fur et à mesure du développement de la pneumoconiose du mineur de charbon, diverses lésions associées secondaires peuvent en aggraver le tableau clinique. Les structures pulmonaires sont lésées à des degrés divers. On distingue particulièrement [17] :

- alvéolite macrophagique à poussière caractérisée par la présence endoalvéolaire d'amas de macrophages au cytoplasme riche en poussières, et présence fréquente de pigments ferriques. Des pneumocytes de types II, des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes complètent la réaction alvéolaire, et l'on retrouve de nombreuses particules libres de pigments anthracosiques.

- l'atteinte bronchique [23, 24]. Elle n'est pas spécifique, et de type bronchite chronique. Au stade précoce de la maladie, l'origine de ces désordres est certainement complexe, impliquant ici encore, à des degrés divers et impossibles à préciser, la

responsabilité de l'empoussièrage, des gaz toxiques inhalés sur les lieux du travail et du tabagisme. Au stade avancé de la maladie, des distorsions, des dilatations bronchiques, et parfois des sténoses sont possibles au contact des masses pneumoconiotiques. Il a parfois été retrouvé des particules anthracosiques et des granulomes histiocytaires actifs dans le chorion de la muqueuses et la gaine pérbronchique. D'un point de vue clinique on passe d'une symptomatologie de bronchopathie chronique, à une insuffisance respiratoire chronique puis à une insuffisance respiratoire chronique grave avec possibilité de retentissement cardiaque [17].

- lésions emphysémateuses périfocales. Elles s'observent au voisinage des lésions silicotiques. Ces formations, d'abord de petite taille, peuvent se développer et former des bulles volumineuses, détruisant ou refoulant une partie importante du parenchyme pulmonaire. La disposition anatomique des lésions emphysémateuses est soit de type centrolobulaire développées au contact des formations fibroconiotiques débutantes, ou de type panlobulaire, réalisant parfois de volumineuses bulles au voisinage de lésions nodulaires ou pseudotumorales [20]. D'autres variétés d'emphysème à distribution diffuse sont parfois observées : leurs relations avec l'empoussièrage sont difficiles à établir, et on les rattache volontiers aux agressions associées, toxiques ou infectieuses. Après une revue de la littérature, Becklake arrive à la conclusion qu'il est raisonnable de considérer que l'association entre exposition aux poussières et l'emphysème est assez forte pour affirmer l'existence d'une relation de causes à effets [25]. Des tableaux cliniques de bronchopathie chronique obstructive, et d'emphysème sont fréquents chez le mineur de charbon même en absence de tabagisme [14]. Toutefois, d'autres auteurs arrivent à la conclusion que le développement d'un emphysème chez les mineurs est du à une potentialisation entre exposition coniotique et tabagisme [26].

- L'atteinte vasculaire est marquée par l'englobement des vaisseaux au sein des lésions silicotiques avec lumière réduite ou oblitérée par le développement de zones

fibroconiotiques périvasculaires. Ces lésions vasculaires jouent un rôle important dans le déterminisme des remaniements nécrotiques des lésions silicotiques.

En conclusion, la pneumoconiose du mineur de charbon implique trois pathologies : une fibrose, un emphysème, et une bronchite chronique : les événements biologiques en cause dans ces deux dernières pathologies étant plus mal connus que ceux intervenant dans la fibrose.

GENESE DE LA PNEUMOCONIOSE DU MINEUR DE CHARBON.

Les pneumoconioses sont des affections caractérisées par le dépôt de poussières inorganiques, minérales ou métalliques, au niveau du tissu pulmonaire.

L'appareil respiratoire dispose de moyens de protection et d'épuration visant à le protéger contre la pénétration des particules, et à éliminer celles qui s'y déposent. Les caractéristiques anatomiques des voies aériennes supérieures ont pour effet d'arrêter les polluants d'un diamètre supérieur à $10\mu\text{m}$. Les particules plus fines, d'un diamètre compris entre $0,5$ et $5\mu\text{m}$ se fixent par sédimentation sur les parois bronchiques et alvéolaires, et celles d'un diamètre inférieur à $0,5\mu\text{m}$ se déposent par diffusion dans les alvéoles.

Quel que soit le lieu de leur dépôt, les poussières inhalées sont immédiatement prises en charge par des mécanismes chargés d'en assurer l'élimination. L'efficacité et la cinétique de cette épuration peuvent être appréciées, chez l'animal ou chez l'homme, par l'étude du devenir de particules marquées : dans les heures qui suivent l'exposition aux poussières, la radioactivité globale de l'appareil respiratoire diminue rapidement, pour décroître ensuite plus lentement à partir du troisième jour, l'élimination se poursuivant pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois (Fig 1). Cette double pente traduit la mise en jeu de deux mécanismes complémentaires : l'épuration bronchique et l'épuration alvéolaire [7, 27] :

- L'épuration bronchique. Les voies aériennes supérieures sont bordées par un épithélium cilié et sécrétoire. Les cils battent au rythme de 1000 à 1500 mouvements par minute, de façon synchrone, entraînant les sécrétions bronchiques qui les recouvrent et les particules qui y sont fixées. Ainsi se trouve réalisé un véritable ascenseur "mucociliaire", qui progresse des voies aériennes profondes vers le rhinopharynx, à raison de 3 à 8 mm par minute. La vitesse de déplacement augmente régulièrement en raison d'une longueur croissante des cils et d'une efficacité plus

grande du flux expiratoire. La toux peut accélérer la progression des particules vers le rhino-pharynx, où elles seront dégluties ou expectorées.

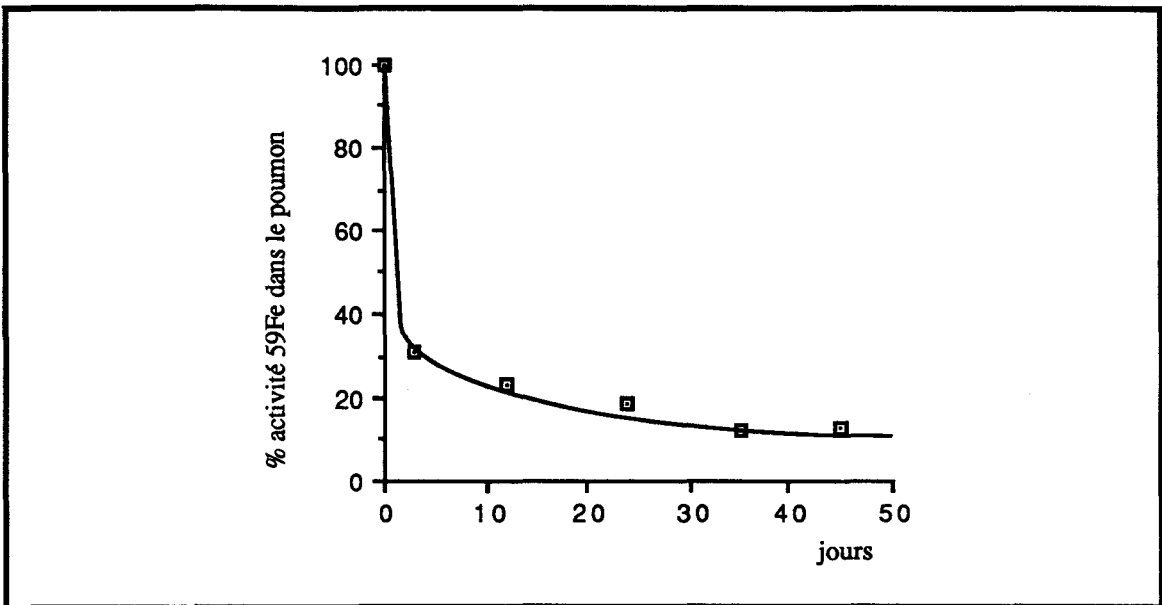


Figure 1 : Courbe d'épuration pulmonaire chez le rat, après inhalation de particules de fer radioactif (^{59}Fe). Évolution de la radioactivité : dans les deux premiers jours, la radioactivité baisse de façon rapide (épuration bronchique). Puis l'élimination se ralentit nettement, mais se poursuit pendant plusieurs semaines (épuration alvéolaire). [27].

- L'épuration alvéolaire. L'épuration des particules déposées dans les alvéoles pulmonaires est liée à l'intervention de cellules phagocytaires présentes sur la paroi des espaces aériens périphériques, les macrophages alvéolaires. L'arrivée de poussières dans les territoires alvéolaires déclenche un afflux de macrophages en provenance à la fois des capillaires où ils sont stockés et de l'interstitium pulmonaire. Cette mobilisation amène la phagocytose rapide de toutes les particules à ce niveau. La destinée des cellules macrophagiques est alors double :

- le contingent le plus important gagne les bronchioles, et est pris en charge par l'ascenseur mucociliaire, pour être éliminé par expectoration sous forme de cellules à poussières.

- un contingent plus faible regagne l'interstitium pulmonaire, selon des lois encore mal connues. On les retrouve, avec leur charge coniotique, au niveau des gaines péribronchiques et périvasculaires. De là, certaines cellules

sont éliminées par les voies lymphatiques, certaines s'accumulent au niveau du tissu pulmonaire, pour y former les premiers dépôts de poussières caractéristiques des pneumoconioses débutantes.

A l'état physiologique, les mécanismes d'épuration bronchopulmonaires sont d'une remarquable efficacité [28]. Chez l'homme, on estime qu'ils sont capables d'assurer l'élimination d'approximativement 100 grammes de poussières par an, chiffre dont on appréciera mieux la valeur en sachant qu'un poumon pneumoconiotique ne contient pas plus de 38 à 54 grammes de poussières. Mais, dans certaines circonstances, liées à l'individu ou à la nature du risque professionnel, ces capacités d'épuration sont débordées, permettant l'accumulation dans le tissu pulmonaire [7].

Les premiers dépôts de poussières se produisent au niveau péribronchique ou périvasculaire. S'il s'agit de particules minérales inertes, l'aspect réalisé est celui de nodules fibroconiotiques. S'il s'agit au contraire de particules plus ou moins riche en silice, comme la poussières de mine, l'on constate le développement de nodules silicotiques typiques, avec centre clair pauvre en particules.

Les lésions fibroconiotiques observées peuvent en rester à ce stade dit de **pneumoconiose simple**, se traduisant sur le plan radiologique par des opacités micronodulaires ou nodulaires. Sur le plan anatomopathologique, ces opacités correspondent à des nodules de fibrose limités associés à un dépôt coniotique.

Leur évolution vers le développement de formations pseudotumorales ou de **fibrose massive progressive**, suppose l'intervention d'un facteur surajouté, dont la nature n'a pu être jusqu'ici déterminée avec certitude.

LA FIBROSE MASSIVE PROGRESSIVE.

L'apparition d'une fibrose massive progressive se définit par le développement, sur un fond de pneumoconiose simple, d'opacités d'un diamètre supérieur à 1 centimètre. Le caractère progressif de la forme aggravée de la pneumoconiose simple s'explique par le fait qu'elle présente une aptitude naturelle à augmenter progressivement de volume même après cessation de l'exposition au risque, jusqu'à atteindre des dimensions de 10 à 15 centimètres de diamètre [8-11].

L'analyse des caractéristiques radiologiques de la fibrose massive progressive montre que ces lésions sont en générale bilatérales et grossièrement symétriques. Elles se développent de préférence dans les lobes supérieurs (75% des cas). Leur aspect est variable : il peut s'agir de masses homogènes par extension progressive d'une lésion nodulaire unique, ou de confluence de formations nodulaires multiples d'un diamètre de 1 à 3 centimètre.

Les modalités d'apparition de ces lésions ont d'abord été précisées par l'analyse de différentes populations de patients pneumoconiotiques. Les études publiées sont difficilement comparables, toutefois quelques caractéristiques s'en dégagent :

- le délai d'apparition de la fibrose massive progressive par rapport au début de l'empoussièrage ou à l'apparition des premières manifestations de pneumoconiose, varie considérablement d'un individu à l'autre.

- d'une manière générale, sa fréquence augmente avec l'âge et la durée de l'empoussièrage, mais il existe d'importantes variations individuelles : habituellement, la fibrose massive progressive n'apparaît qu'après 20 ans d'exposition au risque, mais il est des cas où elle se développe très rapidement, après quelques années d'empoussièrage. Elle peut aussi se manifester après la fin de l'exposition.

- la progression des lésions, appréciée par le temps de passage d'un stade à un autre est très variable. Les données épidémiologiques valables pour un bassin minier donné, ne peuvent être comparées à d'autres séries. De plus, dans un même bassin, elles n'ont d'intérêt que pour une période précise : les conditions d'exploitations se sont en effet considérablement modifiées au cours des années, entraînant des variations dans la quantités et la qualités des poussières inhalées. Dans le bassin minier du Nord-Pas-de-Calais, par exemple l'age moyen d'apparition des lésions pneumoconiotiques est passé de 46,5 ans en 1965 à 56,8 ans 1986 ce qui s'en retentira inévitablement sur les délais d'apparition de la fibrose massive progressive. Après ces observations nous pouvons déjà mettre en exergue deux points importants lorsqu'on s'intéresse à la physiopathologie de la fibrose massive progressive [11] :

Importance de la qualité

et de la composition de la poussière inhalée.

Existence d'un ou de plusieurs facteurs individuels.

Afin de préciser plus finement les caractéristiques biologiques de la pneumoconiose du mineur de charbon, différentes études anatomopathologiques ont aussi été menées. Ainsi Davis en 1983 [29] a détaillé l'existence de deux types anatomiques de fibrose massive progressive :

- des masses formées par la fusion de nodules de type silicotique, observées chez les mineurs exposés à un empoussièrage riche en particules non charbonneuses.

- des masses développées à partir d'une lésion unique, sur un fond de type fibroconiotique, observées chez les mineurs exposés à des poussières de haut rang, pauvres en particules non charbonneuses.

Entre ces deux types lésionnels, il existe des formes intermédiaires probablement liées au caractère mixte de l'empoussièrage subi et à sa richesse en silice.

Dans l'analyse des lésions pneumoconiotiques, on a pu mettre en évidence des masses riches en collagène et fibronectine. Ainsi différentes études ont montré une augmentation du collagène dans le poumon silicosé où le rapport collagène type I/typelll est augmenté. Par contre ce rapport est plus bas au niveau des formations fibroconiotique. Le collagène III est surtout présent à la périphérie des nodules coniotiques, ce qui est en relation avec la persistance d'une fibrose active [30, 31].

La fibrose massive progressive constitue la modalité évolutive la plus sévère de la pneumoconiose du mineur de charbon. Caractérisée par le développement de bloc fibreux volumineux au sein du tissu pulmonaire, elle tire sa gravité, et la diminution de l'espérance de vie qu'elle entraîne, de plusieurs facteurs : l'amputation du champ d'hémostase, et la survenue de complications susceptibles de marquer plus spécifiquement son évolution :

- Tuberculisation. L'expérimentation animale montre que l'exposition aux poussières de silice ou aux poussières mixtes diminue la résistance aux mycobactéries [32].

- Nécrose cavitaire aseptique. Décrite en France dès 1958 par Gernez-Rieux, la nécrose aseptique est liée à la fonte ischémique de masses pseudotumorales, suivie de leur évacuation par voie bronchiques [33].

- Greffe aspergillaire. Signalée par Heppleston en 1949, la greffe aspergillaire sur poumon pneumoconiotique est reconnue de plus en plus fréquemment. Il s'agit d'aspergillomes intracavitaires greffés sur cavités de nécrose aseptique [34].

- Hémoptysie grave. Elle peut être symptomatique d'une complication tuberculeuse, du développement d'un aspergillome intracavitaire, ou être contemporaine d'une nécrose aseptique. Elles sont parfois liées à l'existence d'une affection intercurrente indépendante de la pneumoconiose, notamment à un cancer du poumon [7].

- Cancer bronchopulmonaire. Chez les mineurs de charbon pneumoconiotiques, aucune statistique probante ne permet d'affirmer ou d'infirmer une éventuelle

influence de la maladie professionnelle sur le développement des tumeurs malignes bronchopulmonaires [7].

- En outre, la fibrose massive progressive s'accompagne fréquemment de lésions emphysémateuses étendues qui en aggravent le retentissement fonctionnel. L'importance de l'emphysème est en corrélation avec la durée de l'empoussièrage, indépendamment de l'âge et des habitudes tabagiques. Cette notion amène à penser que l'inhalation prolongée de poussières de mine peut engendrer des désordres physiopathologiques, susceptibles de mener soit au développement de fibrose, soit à la destruction emphysémateuse du tissu pulmonaire.

APPROCHE PHYSIOPATHOLOGIQUE

Nous avons déjà pu voir que le ou les mécanismes responsables du passage du stade de pneumoconiose simple du mineur de charbon à celui de fibrose massive progressive, ne sont apparemment pas unifactoriels.

Malgré l'apport non négligeable d'une multitude de travaux, aucun auteur n'a pu démontrer le rôle univoque de tels ou tels facteurs mis en jeu.

Nous pouvons toutefois regrouper ces travaux sous deux grandes rubriques [11] :

- la recherche de données anamnestiques particulières, professionnelles et/ou individuelles, capables de déclencher l'apparition des lésions massives. Leur identification est susceptible de déboucher sur des mesures de prévention et de traitements.

- l'analyse des désordres biologiques qui se déroulent au niveau du tissu pulmonaire, ainsi que l'étude des caractéristiques cellulaires et moléculaires du liquide de lavage bronchoalvéolaire.

DONNÉES ANAMNESTIQUES

Quatre séries de faits, en accord avec les deux points importants que nous avons cités plus haut (facteurs liés aux poussières inhalées et facteurs individuels), ont particulièrement retenu l'attention :

- la qualité et la quantité des poussières inhalées.
- l'intervention d'infections bronchopulmonaires.
- le développement de réactions de type auto-immunitaire.
- le rôle éventuel du terrain génétique.

Influence de l'empoussiérement.

De nombreux travaux ont établi que la fréquence et la rapidité d'apparition des lésions de fibrose massive progressive sont significativement liées à la durée et à l'intensité de l'empoussiérement subi [15, 28, 35-38].

Différents travaux ont pu montrer une relation entre le type et la profusion des lésions de pneumoconiose simple et le développement d'une fibrose massive progressive. La quantité cumulée de poussières inhalées constituerait le facteur principal de développement d'une fibrose massive progressive [36]. Cette notion est confortée par le fait que la quantité de poussières accumulées au niveau des poumons est plus élevée dans la fibrose massive progressive que dans la pneumoconiose simple. Toutefois, ce fait n'est pas obligatoirement lié à une exposition plus importante, mais peut être le reflet d'une clairance moins efficace du tissu pulmonaire [35].

La nature des particules retenues est également susceptible d'influencer la nature des lésions pneumoconiotiques. Une étude démontre que le pourcentage de silice est identique au niveau des lésions de fibrose massive progressive et dans les tissus avoisinants, les auteurs en tirent argument pour affirmer que le développement de la fibrose massive progressive n'est pas provoqué par la silice [39]. Ainsi certains auteurs décrivent des cas de patients présentant des lésions de fibrose massive progressive chez lesquels aucune trace de silice n'était détectée [40-42]. Par contre d'autres auteurs [43] affirment que c'est la quantité totale de poussières de silice retenue qui intervient, et non leur pourcentage par rapport aux autres particules minérales, la fibrose ne se développant qu'à partir d'une certaine accumulation.

L'analyse des particules isolées des lésions pneumoconiotiques révèle que chez les sujets ayant travaillé dans des mines de charbon de haut rang, pauvre en silice, la composition de la charge particulaire du tissu pulmonaire est identique à celle des poussières inhalées. Par contre chez ceux qui ont travaillé dans des mines de charbon de bas rang, plus riche en silice, on constate une augmentation de la quantité relative de silice dans les formations pneumoconiotiques [44].

Ces faits en faveur du rôle prépondérant de la silice dans le développement des formations massives n'expliquent toutefois pas le développement des lésions plus focales dans la pneumoconiose simple du mineur de charbon.

Théorie infectieuse.

Très tôt, différents travaux ont évoqué l'intervention de facteur de nature infectieuse le plus souvent tuberculeuse. Cette théorie a été largement reprise et étayée par plusieurs arguments :

- l'isolement fréquent du bacille tuberculeux à partir de la fibrose massive [45, 46].

- la fréquence des réactions tuberculiques positives au cours de la fibrose massive progressive.

Toutefois, ces données ont été recueillies à une époque où l'incidence de l'infection tuberculeuse était particulièrement élevée. D'autre part on a pu observer en clinique et par l'expérimentation animale que l'empoussiérage par la silice ou par les poussières de mines augmente considérablement la sensibilité du tissu pulmonaire aux infections mycobactériennes [32, 39].

La fréquence relativement importante des mycobactéries atypiques chez les pneumoconiotiques par rapport à la population non exposée à l'empoussiérage a également fait évoquer la responsabilité de ces agents infectieux à l'origine de la fibrose massive progressive. De nombreux travaux ont notamment été menés sur le thème des interactions empoussiérage-infection dans le développement de la fibrose massive progressive, à l'Institut Pasteur de Lille et à l'INERIS (ex CERCHAR) sous la direction de Gernez-rieux [32].

En fait, si la tuberculose apparaît jouer un rôle certain dans le déclenchement d'une fibrose massive progressive, un examen anatomique minutieux ne révèle que rarement des stigmates de tuberculose au niveau des lésions massives, même après nécrose aseptique. De plus, la mise en oeuvre de traitements antituberculeux ne modifie en rien le développement de la fibrose massive progressive.

Ces différentes observations indiquent que les processus infectieux tuberculeux ou non entraînent des perturbations durables des mécanismes d'épurations bronchiques, facilitant une rétention de particules coniotiques. Cette accumulation de poussières pourrait jouer un rôle à l'origine de la fibrose massive progressive, mais n'expliquent pas le caractère progressif du processus fibrosant.

Théorie immunologique.

En 1953, Caplan *et al* identifiaient dans un groupe de 14000 mineurs 51 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde dont 47 présentaient des lésions de type fibrose massive progressive [47]. Parmi 13 d'entre eux il était décelé des opacités radiologiques nodulaires multiples caractéristiques du syndrome de Caplan.

Dix ans plus tard la même équipe démontrait la présence de facteurs rhumatoïdes chez certains mineurs en dehors de toutes atteintes articulaires.

De nombreux travaux ont d'autre part démontré l'existence de désordres immunologiques chez les patients pneumoconiotiques avec le plus souvent une prépondérance chez les patients présentant une fibrose massive progressive :

- présence d'anticorps antinucléaires [48-53].
- détection d'anticorps anti-fibroblastes [54]
- présence de lymphocytes pulmonaires activés [55-59].
- etc.

Reprenant les observations de Burrell *et al*, nous avons recherché des stigmates de désordres immunologiques, chez les patients pneumoconiotiques [54]. Comme lui, nous avons recherché la présence d'anticorps anti-fibroblastes en essayant de mieux caractériser l'antigène cible. Bien que préliminaires et non publiés, les résultats auxquels nous sommes arrivés sont les suivants :

- individualisation d'une structure de 32 kD. 72% des sérums de patients présentant une fibrose massive progressive reconnaissent une structure de 32 kD sur une immunoempreinte d'une préparation antigénique de fibroblastes humains (lignée

MRC5) contre 40% des sérums de patients présentant une pneumoconiose simple et 7 % des sérums de sujets témoins.

- les sérums de patients présentant une pathologie autoimmune définie ne montrent pas de différence significative par rapport aux sujets témoins (Tableau 2).

Tableau 2 : Fréquence de détection des anticorps dirigés contre la structure de 32 kD.

groupes de patients	n	nombre de sérums positifs	pourcentage
Patients pneumoconiotiques	55	29	53
FMP	23	16	72
SP	32	13	40
Patients lupiques	15	2	13
Patients à polyarthrite rhumatoïde	38	5	13,1
Sujets sains	28	2	7,1

Détection d'une structure de 32kD par immunoempreinte (western-blotting) d'une préparation antigénique de fibroblastes pulmonaires humains (lignée MRC5).

- structure de nature protéique (structure non glycosylée) portée par les fibroblastes, les monocytes/macrophages, et les lymphocytes

- mise en évidence d'une réactivité lymphocytaire chez au moins 2 patients sur un total de 5 testés (indice de prolifération de 3,2 et 3 en présence d'une préparation antigénique correspondant à la bande de nitrocellulose portant la structure de 32kD *versus* une préparation antigénique d'une autre bande).

Ces réactions immunologiques seraient liées à la libérations d'antigènes par les cellules lésées par les poussières, et rendraient compte de l'existence de stigmates d'autoimmunité. Toutefois l'influence de ces désordres sur l'évolution de la pneumoconiose et son rôle éventuel dans le développement de la fibrose massive progressive reste controversé. Pour certains, la présence de stigmates d'autoimmunité s'accompagnerait d'un potentiel évolutif plus rapide, mais elle n'est pas partagée par tous [60]. Ainsi chez un individu donné, aucun élément ne peut permettre d'attribuer aux perturbations immunologiques, décelées dans la pneumoconiose du mineur de charbon, un rôle décisif à l'origine de la fibrose massive progressive.

Facteurs génétiques.

Plusieurs études ont été menées en vue d'établir une corrélation entre l'aptitude à développer une pneumoconiose et le groupe tissulaire de l'individu exposé au risque d'empoussiérage [61, 62]. Il a été constaté une fréquence moindre du groupe HLA-A1 dans la pneumoconiose des mineurs de charbon [63]. Wagner *et al* constate une fréquence plus élevée du groupe HLA-BW45 chez les patients avec syndrome de Caplan [64]. Des résultats concordant ont depuis été obtenu, Honda *et al* suggère l'implication d'un gène majeur situé près du locus HLA B et notamment dans leur étude : HLABw54 [65]. Par contre la prévalence du groupe HLA-B27 n'est pas modifiée contrairement à ce qui est observé dans l'asbestose [66].

Récemment Koskinen *et al* [67] ont rapporté une prévalence significativement plus élevée de HLA-Aw19 chez les silicotiques (29,6%) par rapport aux sujets exposés au même risque sans pneumoconiose (3,7%) (Fréquence dans la population générale : 19,6%).

En conclusion.

Chacune des hypothèses apporte une explication plausible au développement de la fibrose massive progressive, mais aucune ne couvre la totalité des faits observés compte tenu de la diversité des lésions. La fibrose massive progressive apparaît comme une modalité évolutive particulière relevant de facteurs étiologiques variés susceptibles de contribuer au développement d'une fibrose progressive. Il semble que ce soit un ensemble de ces phénomènes qui est mis en jeu. Ainsi chacune des hypothèses présentées fait appel à un ou plusieurs des autres facteurs impliqués dans un autre modèle.

C'est pour cette raison que de nombreuses équipes se sont attachées à la recherche de facteurs biologiques pouvant expliquer le développement de fibrose massive progressive. Cette approche devrait permettre de montrer l'existence d'un ou de plusieurs facteurs biologiques individuels permettant d'expliquer pourquoi à risque

égal un mineur va développer une pneumoconiose simple et pourquoi celle-ci va ou non évoluer vers une fibrose massive progressive.

BIOLOGIE DE LA PNEUMOCONIOSE DU MINEUR DE CHARBON

Les progrès réalisés dans la connaissance de la biologie de la pneumoconiose du mineur de charbon ont été permis par le développement de trois principales techniques d'investigation clinique et biologique :

- l'exposition *in vitro* aux particules minérales des cellules présentes au niveau pulmonaire potentiellement impliquées dans le développement des lésions pneumoconiotiques.

- les modèles animaux d'exposition aux particules minérales.

- l'étude du statut d'activation des macrophages alvéolaires recueillis chez les patients pneumoconiotiques.

La mise au point des deux premières techniques a particulièrement permis la récolte de données expérimentales sur les mécanismes de développement des lésions de fibrose chez les animaux exposés. D'autre part elles ont permis de mieux connaître les potentialités biologiques des différentes particules minérales rencontrées dans les pathologies pneumoconiotiques.

Le dernier point a été permis par le développement du lavage bronchoalvéolaire. Ceci a permis l'accès aux populations cellulaires du poumon profond, ce qui a bouleversé l'approche physiopathologique des maladies pulmonaires interstitielles [68-71]. L'application de cette technique dans la pneumoconiose du mineur de charbon est récente alors qu'il existe une multitude de travaux expérimentaux sur les effets des particules minérales sur le développement des lésions de l'appareil respiratoire et sur l'activation des populations alvéolaires et bronchiques *in vitro*.

Comme beaucoup de pathologies chroniques touchant l'interstitium pulmonaire, un grand nombre des altérations structurelles et fonctionnelles du poumon sont une conséquence de l'accumulation et de l'activation des cellules inflammatoires [72, 73]. Parmi celles-ci, le macrophage alvéolaire semble jouer un rôle clef du fait de sa situation et de ses capacités sécrétoires [73-77]. En effet le macrophage alvéolaire est le premier rempart face à l'agression coniotique et, bien qu'insuffisant, joue un rôle prépondérant dans l'épuration alvéolaire de la surcharge en poussière de mine. D'autre part il est capable de produire un grand nombre de médiateurs (métabolites de l'oxygène, eicosanoides, monokines, chémokines) potentiellement impliqués dans l'induction de l'alvéolite inflammatoire initiale et dans le développement de la fibrose [11, 78, 79].

Pour ces raisons, de nombreuses études se sont attachées à démontrer l'activation du macrophage *in vivo* chez les patients pneumoconiotiques ou dans les modèles animaux d'exposition aux poussières des mines. D'autres études se sont encore attachées à démontrer l'activation du macrophage alvéolaire consécutive à une exposition *in vitro* des poussières de mine.

Nous allons maintenant tenter de résumer les connaissances actuelles sur chacun de ces 3 points ainsi que les schémas pathogéniques principalement reconnus.

Modèles animaux de pneumoconiose expérimentale.

Les différents modèles animaux d'exposition à des particules minérales ont permis de développer différents axes de recherche :

- étude des potentialités biologiques des particules selon leur nature, leur taille, ...
- identification et analyse du rôle des cellules impliquées dans le développement des lésions pneumoconiotiques.

L'inhalation contrôlée ou l'instillation intratrachéale de particules de silice chez l'animal déclenche dans un premier temps un afflux de polynucléaires neutrophiles et une mobilisation de macrophages alvéolaires [72, 80, 81]. Elles entraînent également

une stimulation des pneumocytes II responsables d'une lipoprotéinose alvéolaire [82]. Dans un second temps, on observe le développement de lésions granulomateuses contenant de nombreuses particules minérales, mais différentes du nodule silicotique observé en pathologie humaine et d'une fibrose dont le mécanisme est encore mal connu [83, 84].

Différentes études ont permis d'analyser les potentialités fibrogéniques de différentes qualités de particules minérales telles que la silice (SiO_2), l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3), l'oxyde de titane (TiO_2) ou encore la poussière de mine. Ainsi Driscoll *et al* démontrent que l'inhalation de TiO_2 n'est pas associée à une réponse inflammatoire ou fibrosantes du poumon. Par contre l'inhalation de SiO_2 conduit au développement d'une réaction inflammatoire caractérisée par un afflux de macrophages, neutrophiles, et lymphocytes puis au développement d'une fibrose pulmonaire [72]. Il apparaît ainsi que les oxydes de titane et d'aluminium peuvent être considérés comme 2 types de particules biologiquement inertes [85-89].

D'autres études ont permis d'analyser l'influence de la forme des poussières inhalées [90, 91]. Ainsi l'inhalation de particules ultrafines (inférieures à 50 nm) peut conduire à une réponse inflammatoire du poumon plus importante en comparaison aux particules de taille supérieure. Cette plus grande réactivité semble être due à une augmentation de la surface accessible des particules pour une interaction avec le macrophage alvéolaire plutôt qu'une augmentation de l'interstitialisation directe des poussières qui conduit au développement des lésions pneumoconiotiques.

Ces conclusions semblent être confirmées par un travail de Adamson *et al* [92]. Ils démontrent que la diminution de la quantité de poussières dans l'interstitium conduit à une diminution de la réponse fibrotique. Par cette étude il démontre aussi le rôle primordiale du macrophage alvéolaire dans l'épuration tissulaire en poussière de mine.

Toutefois 2 faits importants sont observés de manière constante dans ces différentes études :

- l'instillation intratrachéale de particules minérales provoque un afflux cellulaire mixte dans les territoires alvéolaires, associant macrophages et neutrophiles [81, 93-95].

- l'inhalation de particules minérales (SiO₂ ou poussières de mine) conduit au développement d'une réaction inflammatoire et à une activation du macrophage alvéolaire préalable au développement de la réaction fibrosante (prolifération des fibroblastes, dépôt de collagène, ...).

Le premier point est à opposer aux observations faite chez l'homme où l'alvéolite est principalement de type macrophagique [1, 71, 73, 96-98]. L'analyse de l'infiltrat inflammatoire a aussi permis de démontrer une hétérogénéité de taille (qui rend compte du turn-over des macrophages et du recrutement des monocytes au niveau du tissu pulmonaire) ou de fonctionnalité des macrophages [99, 100]. Ainsi Sjöstrand et al démontrent que les macrophages tissulaires possèdent de plus grandes potentialités de sécrétion de médiateurs stimulant les fibroblastes par rapport aux macrophages alvéolaires [101].

Le rôle de cette alvéolite mixte dans la genèse des lésions pneumoconiotiques a été discuté par de nombreux auteurs [78, 93, 102, 103] qui insistent surtout sur les déviations fonctionnelles des macrophages alvéolaires. Cette activation du macrophage a été étudiée selon différents aspects :

- prolifération
- expression et modification des marqueurs de surface
- sécrétion de différents médiateurs d'origine macrophagique

En ce qui concerne le dernier point, différentes études ont apporté des éléments en faveur de l'implication des médiateurs macrophagiques dans le développement des lésions pneumoconiotiques.

L'implication du TNF dans le développement des lésions pneumoconiotiques a été largement rapportée dans différents modèles animaux [104, 105]. Toutefois, la démonstration du rôle central joué par le TNF a été rapportée par Piguet *et al* [106] dans le modèle murin de fibrose induite par l'exposition à la silice. Après instillation

de silice, une augmentation du taux de TNF pulmonaire est observée, celle-ci persistant au-delà de 70 jours. Par traitement par des anticorps anti-TNF, la production de collagène est inhibée. Cette observation est toutefois contestée par un travail récent de Ouellet *et al* qui décrivent une diminution de l'expression du TNF après exposition à la silice [107]. Toujours dans le modèle murin d'exposition à la silice, Piguet *et al* [108] démontrent qu'un traitement par de l'IL-1ra prévient le développement des lésions fibrotiques. L'IL-1RA, qui est produit spontanément par les macrophages alvéolaires [109-111], protégerait contre le développement de la fibrose. Enfin, différents auteurs démontrent dans des modèles animaux variés l'expression de TGF β , PDGF et de son récepteur, fibronectine [112-117]. Dans d'autres modèles, la production d'un large panel de médiateurs macrophagiques a été décrite. Dans un modèle de rat exposés à la poussière de mine, Kuhn *et al* [118] décrivent une production accrue de Leukotriène B4 et Thromboxane A2 par les macrophages alvéolaires mais, contrairement à d'autres études une diminution de la Prostaglandine E2. Dans un modèle de silicose chez le rat, il a été décrit une production de macrophage inflammatory protéine-1 et -2 (MIP-1, MIP-2, facteurs chimiotactiques pour les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes [119]) par les macrophages, les cellules épithéliales, et les fibroblastes [120].

En marge de ces modèles d'expositions à des poussières minérales, démontrant l'expression de différents médiateurs, certains auteurs analyse l'expression de ces mêmes facteurs dans un modèle murin de fibrose pulmonaire consécutive à l'administration de bléomycine. Une observation particulièrement intéressante a été rapportée récemment par Piguet *et al*. Ils démontrent que le GM-CSF peut avoir une influence inhibitrice sur la restructuration de l'alvéole et sur le dépôt de collagène associé au développement de la fibrose [121].

Toutes ces observations fournissent donc des précisions concernant les mécanismes qui aboutissent au développement de la réaction inflammatoire et fibrosante. Mais ces modèles animaux ne font qu'approcher la situation observée chez l'homme. Par exemple nous avons souligné le fait que l'alvéolite est principalement de type

macrophagique chez les mineurs pneumoconiotiques alors qu'il est observé un afflux de neutrophiles dans les modèles animaux. De plus ces modèles ne reproduisent pas les caractéristiques évolutives de la pneumoconiose du mineur de charbon (évolution d'une pneumoconiose simple vers la fibrose massive progressive). Cependant la mise en place de ces modèles animaux a permis d'identifier une liste des différents médiateurs potentiellement impliqués dans les mécanismes lésionnels consécutifs à l'inhalation de particules minérales.

Activation du macrophage alvéolaire après exposition *in vitro* aux particules minérales

Les modèles animaux présentés ci-dessus nous démontre le rôle clef du macrophage alvéolaire dans l'initiation et le développement des lésions pneumoconiotiques. Nous allons voir maintenant dans quelle mesure l'activation du macrophage est liée à l'exposition coniotique.

Les macrophages alvéolaires sont capables de produire un large panel de médiateurs tels que : métabolites de l'oxygène, protéases, cytokines, facteurs de croissance. Une grande partie des travaux publiés ont analysé la réponse du macrophage à une exposition à des particules de silice pure. Déjà la simple génération de radicaux libres par de la silice fraîchement fracturée semble jouer un rôle dans le développement des lésions induites *in vivo* par la silice [91].

Les cellules inflammatoires comme les phagocytes mononucléés exposés à des particules minérales sont capables de générer des dérivés oxydants et d'amplifier l'altération structurelle du poumon [122, 123].

D'autre part différentes études ont permis d'évaluer les propriétés biologiques de différentes qualités de particules minérales incluant la silice pure, l'amiante ou des mélanges complexes de particules minérales incluant des quantités variables de silice en comparaison à des particules inertes telle que l'oxyde de titane. Il a ainsi été montré que la silice est capable d'induire la sécrétion de TNF [124], IL-1 [125] ou IL-6 [110] par le macrophage alvéolaire dans des proportions dose-dépendantes et à des taux plus

élevés que ceux observés en présence de particule inerte (oxyde de titane) [88]. Dubois *et al* [126] démontrent que des macrophages incubés en présence de silice produisent du TNF mais aussi du LTB₄. Ils démontrent aussi que la production de TNF est augmentée par l'addition de LTB₄ exogène. De plus il a été suggéré que la sécrétion d'IL-1 et IL-6 par le macrophage peut être induite par le TNF endogène [127]. D'autres travaux décrivent une production de prostaglandine E₂, D₂ et de thromboxane B₂ par des macrophages alvéolaires exposés à de la silice [105]. Dans le cas de la PGE₂, ce prostanoïde est capable de moduler l'activation du macrophage induite par le TNF : le TNF stimule la production de PGE₂ qui en retour inhibe la production de TNF. Ces différents faits permettent donc de préciser la cascade d'activation qui conduit à la sécrétion de ces médiateurs. Ainsi la PGE₂ et le LTB₄ peuvent représenter 2 molécules régulatrices importantes dans la réponse du macrophage à une exposition à des particules minérales [105, 126].

A côté de la sécrétion de médiateurs proinflammatoires, de nombreux travaux décrivent la présence dans les surnageants de macrophages alvéolaires exposés aux particules minérales de facteurs susceptibles de modifier la prolifération fibroblastique et le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire [83, 115, 128-130]. Les particules fibreuses (amiante) comme les particules non fibreuses (SiO₂) sont capables d'induire la sécrétion de fibronectine [131]. Des macrophages exposés à des fibres d'amiante sécrètent des taux élevés de platelet-derived growth factor (PDGF) [128, 130]. De plus une sécrétion de TGFβ a aussi pu être mise en évidence suite à l'exposition de macrophages alvéolaires à des particules minérales *in vitro* [132, 133]. Bien que la nature non fibrogénique du TiO₂ *in vivo* ait été démontré, Kumar *et al* démontrent que *in vitro*, l'oxyde de titane comme la silice sont capables d'induire une activité profibrosante dans les surnageants de macrophages alvéolaires [134].

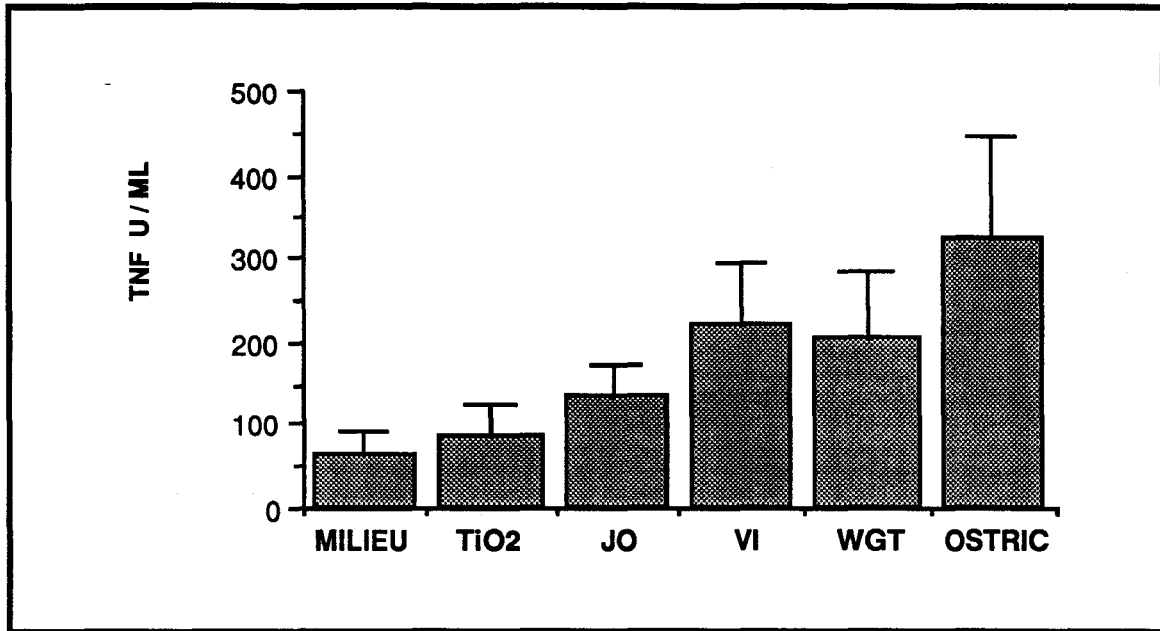


Figure 2 : Sécrétion de TNF par des macrophages de sujets témoins exposés à des poussières provenant de différentes mines du bassin houiller du Nord Pas-de-Calais.

D'autre part la réponse du macrophage alvéolaire à la poussière de mine, mélange complexe de particules minérales incluant des quantités variables de silice, a été analysée. De façon intéressante il apparaît que le macrophage alvéolaire répond à des niveaux différents selon l'origine des poussières de mine (Fig 2). Ainsi dans nos conditions expérimentales les poussières de la mine d'Ostricourt induisent une sécrétion importante de TNF.

Récemment dans le laboratoire Gosset *et al* [110] ont étudié l'effet d'une exposition *in vitro* à des poussières de mine (poussière de la mine d'Ostricourt) et de son contenu en silice sur la production de TNF, IL-1 et IL-6 par des macrophages alvéolaires de sujets témoins. Comme il est résumé dans le Tableau 3, les poussières de mines induisent une sécrétion de TNF et IL-6 significativement plus élevée en comparaison à l'oxyde de titane (TiO₂) utilisé comme particule biologiquement inerte. Par contre aucune modification de la concentration en IL-1 β n'a pu être mise en évidence bien qu'une augmentation de l'expression des ARN messagers spécifiques a été observée. La non concordance entre l'expression des ARN messagers et l'absence de sécrétion de la monokine avait déjà été précédemment observée dans le cas de macrophages alvéolaires de patients allergiques stimulés par un mécanisme IgE-dépendant [109]. Dans ces

conditions, les macrophages alvéolaires sécrètent un facteur inhibiteur de l'IL-1 potentiellement similaire à l'IL-1RA, qui est aussi détecté dans les surnageants de macrophages exposés aux poussières de mine [110]. De plus au regard des potentialités respectives de la silice (α -quartz, 30 μ g qui est la concentration de silice présente dans 1mg de poussière de mine) et de la poussière de mine de stimuler les macrophages, la comparaison des niveaux de sécrétion de TNF IL-6 démontre une réactivité biologique plus importante pour la poussière de mine. Il apparaît donc que la sécrétion de monokines n'est pas exclusivement reliée à la présence de silice mais est le résultat d'interactions complexes entre les différents constituants de la poussière de mine.

Tableau 3 : Secretion de cytokines par le macrophage alvéolaire exposé *in vitro* à des particules minérales pendant 24H.

Monokines	Milieu	conditions de culture			
		TiO ₂ (1 mg/ml)	TiO ₂ + Silica (1 + 0,03 mg/ml)	Silica (0,03 mg/ml)	Coal dust (1 mg/ml)
TNF (pg/ml)	284 ± 139	330 ± 138	423 ± 209	488 ± 395	3526 ± 3509 *
IL-1β (pg/ml)	149 ± 81	196 ± 80	195 ± 147	169 ± 95	274 ± 220 °
IL-6 (U/ml)	61 ± 35	72 ± 34	67 ± 39	60 ± 36	224 ± 74 *

les valeurs sont exprimées par : m ± SEM

° : P = NS

* : P<0,01 en comparaison aux macrophages alvéolaires exposés au TiO₂ (Test de Wilcoxon).

D'après [110].

Activation du macrophage alvéolaire chez les patients présentant une pneumoconiose du mineur de charbon.

A la vue des résultats recueillis *in vitro* ou par l'utilisation des modèles animaux, une liste de médiateurs, potentiellement impliqués dans les mécanismes lésionnels de pneumoconiose, a pu être défini. Afin de déterminer la pertinence de ces observations des études ont été menées chez l'homme afin de préciser l'implication réelle de ces médiateurs.

Dans ces études, les macrophages alvéolaires, recueillis par lavage bronchoalvéolaire réalisé chez des sujets exposés au risque coniotique ou chez des témoins non exposés, ont été testés pour leur capacité à produire spontanément les différents facteurs décrits précédemment [11, 97].

Par analogie avec les constatations faites chez l'animal empoussiéré, ou *in vitro*, une sécrétion de facteurs chimiotactiques pour le neutrophile a été observé [122]. Une sécrétion spontanée accrue de métabolites de l'oxygène par les macrophages de patients pneumoconiotiques peut être détectée avec une exagération du phénomène selon le degré de la sévérité de la maladie [98, 122, 123, 135].

Dans les 2 pathologies que sont la silicose et l'asbestose, il est observé une sécrétion accrue de TNF et d'IL-1 par les macrophages alvéolaires ou par les monocytes circulants [77, 124]. Chez les patients présentant une pneumoconiose du mineur de charbon une augmentation de la sécrétion de TNF mais non d'IL-1 est détectée [110]. De plus, lorsque ces patients sont classés selon le degré de sévérité de la maladie : pneumoconiose simple ou fibrose massive progressive, la sécrétion de TNF est augmentée chez les patients présentant une fibrose massive progressive par comparaison aux patients présentant une pneumoconiose simple [136, 137]. De même dans le modèle de l'exposition chronique au béryllium, Bost et al démontrent une expression des ARN messagers codant pour le TNF mais aussi pour l'IL-6 [138].

A coté de ces médiateurs proinflammatoires d'autres facteurs produits par le macrophage sont capables de moduler les fonctions fibroblastiques. Ainsi le PDGF,

l'IGF-1, le TGF β ou la fibronectine sont connus pour contrôler la prolifération fibroblastique [75, 122, 139-141].

Ces différents travaux aboutissent tous à la conclusion que le macrophage alvéolaire de part la sécrétion des différents médiateurs précités est à l'origine de la réaction inflammatoire rencontrée chez les patients pneumoconiotiques. Ces travaux insistent sur le rôle potentiel du TNF dans le développement de la fibrose pulmonaire du fait de ces capacités à induire la prolifération des fibroblastes et la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire [142, 143]. De plus d'autres médiateurs peuvent être plus directement impliqués dans les phénomènes de fibrose comme la fibronectine, le PDGF, l'IGF-1 ou le TGF β [142, 144, 145]. Toutefois ces différents travaux ne rendent pas compte de l'expression réelle de ces facteurs dans le poumon de patients pneumoconiotiques en tout cas pour les médiateurs proinflammatoires. En ce qui concerne les médiateurs profibrosants peu de travaux décrivant leur sécrétion sont rapportés dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon.

OBJECTIFS DU PRÉSENT TRAVAIL

Ayant pris connaissance des travaux décrivant le rôle du macrophage alvéolaire dans la pathogénie de la pneumoconiose du mineur de charbon, et dans la continuité du travail réalisé dans le laboratoire, notre travail s'est axé sur 3 grandes voies de recherche.

Faisant suite aux travaux de Lassalle *et al* décrivant la production de TNF par les macrophages alvéolaires provenant de patients pneumoconiotiques, ainsi que des travaux de Gosset *et al* décrivant la production de TNF et d'IL-6 par les macrophages exposés à la poussières de mines, il nous restait à vérifier la réalité d'une activation du macrophage dans le poumon de patients pneumoconiotiques ainsi qu'à déterminer une possible relation entre l'activation macrophagique et la présence de poussière de charbon. Ce travail a été mené par une étude *in situ* de l'expression des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 et la détection des mêmes molécules par immunohistochimie.

Après la démonstration d'une activation *in vivo* du macrophage alvéolaire, nous nous sommes intéressé aux conséquences de cette activation macrophagique sur les cellules de l'environnement alvéolaire et en particulier sur le comportement du fibroblaste et de la cellule endothéliale.

En ce qui concerne le fibroblaste, les interactions avec le macrophage alvéolaire ont été approchées par le biais de l'étude de la sécrétion par le macrophage de médiateurs capable de moduler la fonction fibroblastique. Nous avons étudié la production de trois facteurs : le PDGF, l'IGF-1 et le TGF β par les macrophages alvéolaires récoltés par lavage bronchoalvéolaire réalisé chez des patients pneumoconiotiques. De plus nous avons apporté un intérêt particulier à l'activité de prolifération du fibroblaste induite par les surnageants de macrophages alvéolaires.

Nous nous sommes intéressé en dernier lieu à la cellule endothéliale. En effet de nombreux travaux ont démontré l'implication de la cellule endothéliale dans de

développement de la réaction inflammatoire, notamment dans le contrôle de la migration des cellules vers le site inflammatoire. Dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon, nous avons étudié le comportement de la cellule endothéliale dans une situation d'inflammation chronique. Pour cela un modèle *in vitro* de réaction inflammatoire chronique a été mis en place permettant l'étude de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, E-Sélectine, VCAM-1) induite par le TNF qui est produit de façon chronique dans le poumon de patients pneumoconiotiques.

<p style="text-align: center;">SELECTION DES POPULATIONS</p> <p style="text-align: center;">TECHNIQUE DE RECUEIL DU MATERIEL CELLULAIRE</p>

Dans cette partie nous décrivons d'une part les différentes populations qui sont entrées dans cette étude ainsi que les techniques communes aux différents aspects abordés dans cette étude et notamment le recueil des cellules du lavage broncho-alvéolaire et leur mise en culture. Les techniques spécifiques ainsi que les caractéristiques des populations étudiées propres à chaque chapitre de ce travail seront décrites plus loin.

PATIENTS

Cette étude, prise dans son ensemble, a porté sur un total de 30 mineurs de charbon présentant une pneumoconiose et sur xx sujets témoins.

Groupes des mineurs de charbon

Un total de 30 mineurs travaillant dans l'industrie minière du "Bassin houllier du Nord et du Pas-De-Calais" ont été sélectionnés. Les mineurs présentant une pneumoconiose ont été classés suivant la sévérité de la maladie selon les critères radiologiques définis par le bureau international du travail (1980) qui apprécie la taille et l'étendue des opacités radiologiques. Les radiographies ont été interprétées en double aveugle par deux collègues de 3 médecins indépendants de l'étude. Les petites opacités de densités 1 à 3 sont rattachées à la Pneumoconiose Simple (PS; n=21) et les opacités étendues appartenant aux catégories A, B et C ainsi que ax (coalescence de petites opacités) à la Fibrose Massive Progressive (FMP; n=9).

Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont résumés dans le Tableau 4.

Groupes des sujets témoins

Ce groupe comporte 25 sujets qui n'ont jamais été exposés à la poussières de mines.

Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont résumés dans le Tableau 4.

Pour chacun des groupes entrant dans cette étude, le matériel biologique, à savoir les macrophages alvéolaires, est recueilli par lavage broncho-alvéolaire.

MÉTHODE D'ÉTUDE DU LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE

Technique du lavage broncho-alvéolaire (LBA) [71, 97, 98]

Le lavage broncho-alvéolaire est réalisé en cours d'hospitalisation (Département de Pneumologie, Hôpital Calmette, Lille) pour bilan de la maladie pneumoconiotique, selon les modalités habituelles. Après anesthésie locale (lignocaïne) le fibroscope est bloqué dans une bronche sous segmentaire (habituellement dans la bronche ventrale moyenne). 250 ml de sérum salé isotonique stérile sont injectés par l'intermédiaire du canal du fibroscope en 5 fractions de 50 ml immédiatement recueillis par aspiration douce. Le liquide de lavages est collecté dans des tubes siliconés, stériles, numérotés de 1 à 5. Le tube 1 représentatif de l'étage bronchiolaire n'est pas prise en compte dans ce travail. Le lavage broncho alvéolaire est réalisé en dehors de toute période de médication.

Méthode d'étude du lavage broncho-alvéolaire

Le LBA est transporté sur glace au laboratoire. Le liquide de lavage est filtré sur gaze stérile et centrifugé 10 min à 400 g à 4°C. Après 3 lavages les cellules sont mises en suspension à la concentration de $1,5 \cdot 10^6$ /ml en milieu RPMI 1640 complété par 5% de sérum de veau fœtal (SVF) et 2 mM de glutamine. Les cellules sont mises en adhérence en boîte de Pétri (2 ml par puits de 35 mm de diamètre) pour 2 H à 37°C.

Les cellules non adhérentes sont éliminées par lavage en milieu RPMI. Les cellules adhérentes contiennent plus de 95% de macrophages alvéolaires et moins de 1% de lymphocytes. La viabilité des macrophages alvéolaires est évaluée par le test d'exclusion du bleu Trypan et n'est jamais inférieur à 90%. Les surnageants de MA sont collectés après 3 H de culture et stockés à -20°C. Le choix d'une incubation de 3 H est communément reconnu comme étant le meilleur pour l'évaluation d'une activation du macrophage alvéolaire *ex vivo* [146].

D'autre part 10 ml de liquide de lavage après séparation des cellules sont lyophilisés, resuspendus dans un 1/10 du volume initial, aliquotés et stockés à -20°C en vue de dosage des différents médiateurs qui seront examinés dans ce travail.

En parallèle une numération cellulaire est établie ainsi que la formule de la population cellulaire. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules /ml de liquide recueilli avec pourcentage de macrophages alvéolaires, de lymphocytes et de neutrophiles.

Tableau 4 : Population totale entrant dans l'étude.

	Sujets témoins	Patients pneumoconiotiques présentant une	
		PS	FMP
n	25	21	9
Age (an)	49,0 ± 2,7	58,4 ± 1,4	62,4 ± 2,6
Durée d'exposition (an)	0	23,6 ± 1,9	26,3 ± 2,4
Tabagisme			
Fumeur	13	9	2
Non fumeur	11	12	7
Fonction respiratoire *			
VEMS	1,01 ± 0,02	0,84 ± 0,05	0,73 ± 0,05
CV	0,99 ± 0,01	0,87 ± 0,03	0,74 ± 0,03
Cellularité (10 ⁴ /ml)	30,2 ± 4,4	29,2 ± 7,5	41,0 ± 15,9
Comptage différentiel (%)			
Alveolar macrophages	87,8 ± 1,8	88,2 ± 1,4	89,2 ± 2,6
Lymphocytes	7,2 ± 1,1	8,2 ± 1,2	6,3 ± 1,2
Neutrophils	1,2 ± 0,9	2,7 ± 0,6	3,2 ± 1,3

Toutes les valeurs sont exprimées en M ± SEM.

* les valeurs de fonctions respiratoires sont exprimées en % de la valeur théorique

Cette étude confirme donc clairement l'existence d'une alvéolite macrophagique au cours de la pneumoconiose du mineur de charbon. L'analyse cytologique des 30 lavages bronchoalvéolaires retrouve une alvéolite macrophagique quelque soit le stade de sévérité de la maladie. L'hypercellularité est liée quasi exclusivement à un afflux macrophagique. Les lymphocytes et les neutrophiles sont en nombre augmenté mais secondaire en regard du nombre de macrophages alvéolaires. Les particules minérales sont constamment observées dans le cytoplasme des macrophages.

L'ensemble des travaux expérimentaux d'exposition de macrophages témoins à des particules minérales démontraient une toxicité cellulaire relative [147, 148]. Par contre pour les 30 mineurs étudiés, la présence de particules minérales intracellulaires n'affecte pas la vitalité des macrophages alvéolaires au moment de leur récolte, qui demeure non différente des sujets témoins.

L'alvéolite macrophagique témoigne donc d'un effort constant d'épuration des particules minérales.

DEUXIEME PARTIE

**SECRETION ET EXPRESSION DES ARN MESSAGERS CODANT POUR LE TNF
ET L'IL-6 PAR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES ET DANS LES POUMONS
DE PATIENTS PNEUMOCONIOTIQUES**

**ROLE DU TNF ET DE L'IL-6 DANS LE DEVELOPPEMENT
DES LESIONS PNEUMOCONIOTIQUES ET EN PARTICULIER DANS LE
DEVELOPPEMENT DE LA FIBROSE MASSIVE PROGRESSIVE**

INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu précédemment l'exposition aux poussières de mines conduit au développement de lésions granulomateuses limitées ou à une réaction fibrosante périfocale et progressive. Différents arguments suggèrent que le macrophage alvéolaire joue un rôle central de part ses capacités à produire des facteurs potentiellement impliqués dans l'initiation et la pérennisation de la réponse inflammatoire et dans le développement de la réaction fibrosante (Cf "Introduction"). D'autre part, Gosset *et al* ont démontré récemment que les poussières de mine sont capable d'induire une production de médiateurs proinflammatoires et en particulier une production de TNF et d'interleukine-6 mais pas d'interleukine-1 [110]. Ils démontraient aussi que la silice seule (à la concentration retrouvée dans la poussière de mine) n'a pas d'effet suggérant que la sécrétion par les macrophages soit due à une action combinée des différents constituants de la poussière de mine.

Bien que ce travail démontre un rôle des poussières de mine dans la production de médiateurs proinflammatoire par des macrophages alvéolaires de sujets témoins, la relation entre la présence de particules minérales et la synthèse de ces médiateurs chez le sujet pneumoconiotique n'est toujours pas clairement établie. Seuls quelques

travaux chez l'animal suggèrent l'implication directe de facteurs proinflammatoires et en particulier du TNF dans le développement de fibroses induite par la silice.

Le but de ce travail était donc de déterminer une possible relation entre la présence de particules minérales et la synthèse de monokines au niveau du tissu pulmonaire de patients pneumoconiotiques. Pour cela la production de TNF et d'IL-6 ainsi que l'expression de leur ARN messenger ont été évalués aussi bien au niveau cellulaire (macrophages alvéolaires récoltés par lavage bronchoalvéolaire) qu'au niveau tissulaire par une technique d'hybridation *in situ*. Les résultats ont de plus été mis en relation avec la présence de particules minérales.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Patients

Dix-huit mineurs présentant une pneumoconiose ont été sélectionnés et répartis, selon les critères définis précédemment, en 2 groupes : les patients présentant une pneumoconiose simple (PS; n=12) et les patients présentant une fibrose massive progressive (FMP; n=6). De plus 7 sujets témoins n'étant pas exposés à la poussière de mines ont été sélectionnés. Pour l'analyse histologique, des fragments de tissu pulmonaire ont été obtenus après lobectomie réalisée chez des sujets présentant un cancer pulmonaire sans atteintes pneumoconiotiques (n=2) ou chez des patients pneumoconiotiques opérés pour une tumeur pulmonaire (n=4; 1 pneumoconiose simple et 3 fibrose massive progressive). Les prélèvements de tissus ont été réalisés à distance des lésions néoplasiques. Les caractéristiques cliniques et biologiques concernant cette population sont résumés dans le Tableau 5.

Isolement et mise en culture des macrophages alvéolaires

Les lavages sont traités comme il a été décrit dans le chapitre précédant.

Tableau 5 : Population entrant dans l'étude.

	Sujets témoins	Patients pneumoconiotiques présentant une	
		PS	FMP
n	7	12	6
Age (an)	43,7 ± 4,9	58 ± 1,9	67 ± 2,5
Durée d'exposition (an)	0	24 ± 2	25,7 ± 2,4
Tabagisme			
Fumeur	6	5	2
Non fumeur	1	7	4
Fonction respiratoire *			
VEMS	1,01 ± 0,03	0,9 ± 0,05	0,76 ± 0,06
CV	0,98 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,76 ± 0,04
Cellules (10 ⁴ /ml)	37,5 ± 9,1	30,7 ± 7,5	57,2 ± 2
Comptage différentiel (%)			
Macrophages	89,9 ± 3	88,5 ± 1,4	92,6 ± 3
Lymphocytes	2,7 ± 0,8	6,6 ± 1,2	4,3 ± 1,2
Neutrophiles	2,9 ± 1,7	3,7 ± 0,9	2,7 ± 0,9

Toutes les valeurs sont exprimées en M ± SEM.

* les valeurs de fonctions respiratoires sont exprimées en % de la valeur théorique

Dosages des cytokines dans les surnageants de culture des macrophages alvéolaires

Les surnageants sont récoltés après 3 H de culture puis stockés à -20°C. Les concentrations en TNF et en IL-6 ont ensuite été déterminées.

Dosage du TNF

La concentration en TNF a été évaluée par dosage biologique et par dosage radioimmunologique.

L'activité biologique est déterminée par un test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules L929 (lignée de fibroblastes murins). L'activité TNF, estimée à partir d'une courbe standard, est égal à la quantité de TNF nécessaire à tuer 50 % d'une culture de 18 H de cellules L929 traitées à l'actinomycine D (1 mg/ml) en milieu RPMI 1640 avec glutamine contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté.

Après dilutions adéquates des surnageants de macrophages alvéolaires, les taux de TNF sont vérifiés par dosage radioimmunologique (IRE-Medgenix). Les taux sont estimés à partir d'une courbe standard défini par le fabriquant.

Les 2 méthodes ont donné des résultats comparables, avec un degré de corrélation fortement significatif ($r=0,9$; $P<0,001$). Les concentrations en TNF sont exprimées en pg/ml comme défini par le dosage radioimmunologique.

Dosage de l'IL-6

La concentration en Interleukine-6 a été déterminée selon la technique décrite par Van Snick *et al* [149]. Brièvement les cellules 7TD1 (hybridome 7TD1, don du Dr Van Snick, Institut Ludwig, Bruxelles) sont cultivées en milieu ISCOVE (Gibco) contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 2 mM de L-glutamine et $5 \cdot 10^{-5}$ M de b-mercapto-éthanol. Elles sont incubées en présence de dilutions croissantes (1/3 au 1/2187) de surnageants de macrophage. Après 4 jours d'incubation, la dilution correspondant à 50 % du maximum de prolifération est évaluée par dosage colorimétrique au MTT. Une solution de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium; 4 mg/ml en PBS) est ajoutée à la culture (10 % v:v). Après 4 H d'incubation, les surnageants sont éliminés. Les cristaux de MTT-Formazan sont dissouts dans 200 ml de tampon de lyse (HCl 0,04 N en isopropanol). La densité optique est mesurée à 570 nm avec une référence à 650 nm. Les concentrations sont définies à partir d'une courbe standard réalisé à partir d'IL-6 recombinante humaine (Boehringer). Les résultats sont exprimés en U/ml. La spécificité du test a été vérifiée par l'inhibition de la prolifération des cellules 7TD1 induite après addition d'un anticorps polyclonal de lapin anti-IL-6 (Genzyme). L'inhibition induite est supérieure à 90 %.

Préparation des cytocentrifugations de macrophages alvéolaires et des coupes de tissu pulmonaire.

En vue de la réalisation des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, des lames portant les cellules de lavage bronchoalvéolaire ou des coupes de tissu pulmonaire ont été préparées.

Les lames portant les cellules de lavage bronchoalvéolaire sont préparées par cyto centrifugation. La population cellulaire totale provenant d'un lavage bronchoalvéolaire sont lavées. Les cellules (10^5) sont cyto centrifugées sur des lames traitées au TESPA (3-aminopropyl-triethoxysilane; Aldrich). Elles sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (4% en PBS), déshydratées et stockées à -20°C .

Les fragments de tissu pulmonaire lors de leur prélèvement sont immédiatement congelés en azote liquide. Des coupes congelées de 6 mm sont ensuite étalées sur lames traitées au TESPA et traitées comme les cyto centrifugations.

Sondes nucléiques

Un fragment d'ADN complémentaire codant pour le TNF (fragment de 0,3 kb) est inséré dans le vecteur pBluescript [110]. Le plasmide est linéarisé par Pst I ou Eco RI afin de produire après transcription les sondes sens et anti-sens respectivement. La sonde spécifique de l'IL-6 (don du Dr Emilie, INSERM U131), correspondant à un fragment Xba I-Eco RI inséré dans le vecteur pBluescript [150], est linéarisée afin de produire après transcription les sondes sens et anti-sens respectivement.

La transcription est réalisée en présence de CTP- ^{35}S et de T3 ou T7 RNA-polymérase pour la synthèse des sondes sens et anti-sens.

Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* a été réalisée selon la méthode décrite par Quéva *et al* [151, 152]. Brièvement, les préparations sont perméabilisées par de la protéinase K (1 mg/ml), et la fixation non spécifique du ^{35}S est inhibée par traitement à la triéthanolamine (0,1 M) puis à l'anhydride acétique (0,25 %). Les sondes sens et anti-sens (10^6 cpm/lame) dans un tampon d'hybridation contenant du dithiothreitol (0,1 M) et de la formamide (50 %) sont chauffées à 80°C pendant 2 min avant la mise

en hybridation (18 H à 55 °C). Durant les différents lavages (2-0,1 X SSC à 60°C) les sondes non hybridées sont éliminées par traitement à la RNase A.

Une émulsion photographique (NTB2 nuclear track emulsion) est déposée sur les lames. Les autoradiographies (après 10 jours d'exposition) sont colorées au HOESCHT (Sigma) qui colore les noyaux en bleu sous UV. Les observations microscopiques sont réalisées en fond noir : les grains d'argent ainsi que les particules minérales apparaissent donc réfringentes. Dans ces conditions, les poussières sont détectées dans le cytoplasme des macrophages, et les grains d'argent dans la couche d'émulsion recouvrant la préparation. Les variations de mise au point permettent de distinguer les 2 observations (poussières ou grains d'argent). Le signal correspondant au bruit de fond est déterminé par le nombre de grains d'argent détectés dans l'émulsion en absence de cellules, les signaux d'hybridation non spécifiques sont définis par le nombre de grains d'argent détectés sur une préparation qui a été incubée en présence de la sonde sens. Ces observations conduisent à la définition d'un seuil de positivité pour les signaux d'hybridation de la sonde anti-sens.

En tant que témoins positifs pour le TNF et l'IL-6, des préparations de macrophages alvéolaires traités au LPS ont été utilisées. Comme témoins négatifs, des préparations ont été traitées à la RNase A avant hybridation.

La spécificité des signaux d'hybridation a été confirmée par la présence d'un marquage dense sur les macrophages-LPS, et par l'absence de cellules positives sur les préparations hybridées avec la sonde sens ou sur les préparations traitées à la RNase A.

Immunohistochimie.

Les molécules de TNF et d'IL-6 sont identifiées sur les coupes de tissu pulmonaire par des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les cytokines recombinantes. Le sérum anti-TNF (Genzyme), et le sérum anti-IL-6 (don du Dr Wietzerbin, INSERM U196) sont utilisés au 1/60.

Ces anticorps sont révélés par un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la biotine (Institut Pasteur Production) qui est utilisé au 1/20. Après lavage, les préparations sont incubées en présence d'Extravidine conjuguée à la peroxydase (Sigma) dont la présence est révélée par un substrat chromogène (3-amino-9-éthyl carbazole/H₂O₂). Les lames sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline. La spécificité des anticorps anti-TNF et anti-IL-6 est démontrée par la complète inhibition du signal après addition de molécules recombinantes exogènes.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en $M \pm SEM$. La significativité des différences entre moyennes observées est déterminée par : 1) une analyse des variances selon le test de Fischer, et : 2) par le test de Mann-Whitney pour des valeurs non appariées ou par le test de Wilcoxon. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

RESULTATS

Expression des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 par les cellules isolées du lavage bronchoalvéolaire

La technique d'hybridation *in situ* a permis de déterminer le pourcentage de cellules exprimant les ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 sur des préparations de population cellulaires totales provenant de lavage bronchoalvéolaire. Le pourcentage de cellules positives est significativement plus élevé chez les patients pneumoconiotiques (TNF : 42,2 % \pm 3,2; IL-6 : 33,8 % \pm 3,5) comparativement sujets témoins (TNF : 15 % \pm 2,1; IL-6 : 13,3 % \pm 2,2)(Fig 3a). De plus, la distinction entre pneumoconiose simple et fibrose massive progressive montre une augmentation du pourcentage de cellules positives chez les patients présentant une fibrose massive progressive (TNF : 55 % \pm 2,4; IL-6 : 46 % \pm 5,2) comparativement aux

pneumoconiose simple (TNF : 34 % \pm 3,3; IL-6 : 26 % \pm 2,9). Les pourcentages de cellules positives entre pneumoconiose simple et sujets témoins ne sont pas significativement différents (Fig 3b). En outre les pourcentages de cellules positives pour le TNF et l'IL-6 sont significativement corrélés ($r=0,88$; $P<10^{-4}$).

Corrélation entre la présence de poussières de mines et l'expression de l'ARN messenger codant pour le TNF

Par l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* il a été possible de d'évaluer la possible relation entre l'expression de l'ARN messenger et la présence de particules minérales intracellulaires. Le pourcentage de cellules exprimant le messenger codant pour le TNF a été déterminé en parallèle de la détection des poussières dans le cytoplasme des macrophages (Fig 3). Le comptage a été réalisé pour 3 sujets dans chacun des groupes (2 lames par sujet, 200 cellules par lame).

Un signal positif d'hybridation est toujours associé à la présence de particules. Le pourcentage de cellules positives est en relation avec le nombre de particules par cellules (Tableau 6). De façon intéressante, pour les 2 groupes de patients pneumoconiotiques, environ 20 % des cellules apparaissent positives malgré l'absence de particules intracellulaires.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'expression des messagers pour l'IL-6.

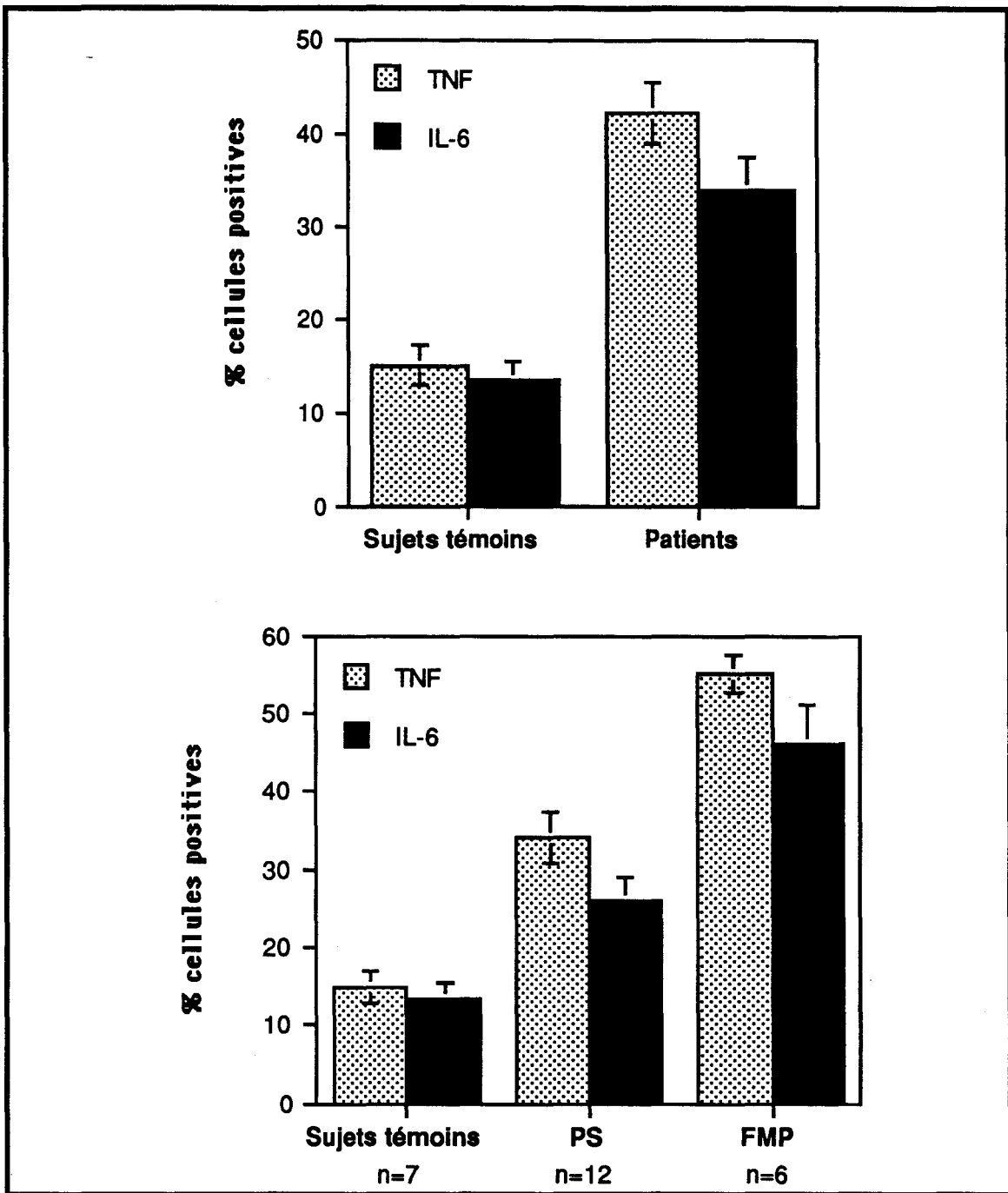


Figure 3 : Expression spontanée des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 par les cellules récoltées après lavage bronchoalvéolaire chez les patients pneumoconiotiques et les sujets témoins. (a) patients *versus* sujets témoins. (b) après distinction PS-FMP. Toutes les préparations ont été évaluées en parallèle. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la population cellulaire totale récoltée dans le lavage bronchoalvéolaire.

Tableau 6: Corrélation entre la présence de poussières de mines et l'expression l'ARN messager codant pour le TNF.

Nombre de particules/cellules	0	1 - 5	6 - 20	>20
Patient présentant une PS				
Nombre total de cellules	62	48	52	38
Nombre de cellules positives	8	8	12	13
% de cellules positives	13	17	23	34
Patient présentant une FMP				
Nombre total de cellules	25	48	83	43
Nombre de cellules positives	6	12	40	35
% de cellules positives	25	25	49	82

Le comptage a été réalisé pour 3 sujets (2 lames par sujets, 200 cellules/lame) dans chacun des groupes (PS et FMP). Les résultats représentent une série de valeurs représentatives dans chacun des groupes.

Corrélation entre l'expression des ARN messagers et la sécrétion des monokines

Afin d'élucider si l'expression des messagers codant pour le TNF et l'IL-6 est associée à une augmentation de la sécrétion des cytokines correspondantes, les concentrations en TNF et IL-6 ont été déterminées dans les surnageants de culture des macrophages alvéolaires (Fig 5). Les macrophages alvéolaires des patients pneumoconiotiques présentant une fibrose massive progressive sécrètent des taux significativement plus élevés des 2 cytokines (dont l'activité biologique a été vérifiée par la méthode de dosage utilisé) par comparaison aux macrophages de sujets témoins ou de patients présentant une pneumoconiose simple. D'autre part les macrophages de patients présentant une pneumoconiose simple produisent des taux plus élevés d'IL-6 par comparaison aux sujets témoins, sans qu'il n'y ait de différences significatives pour le TNF.

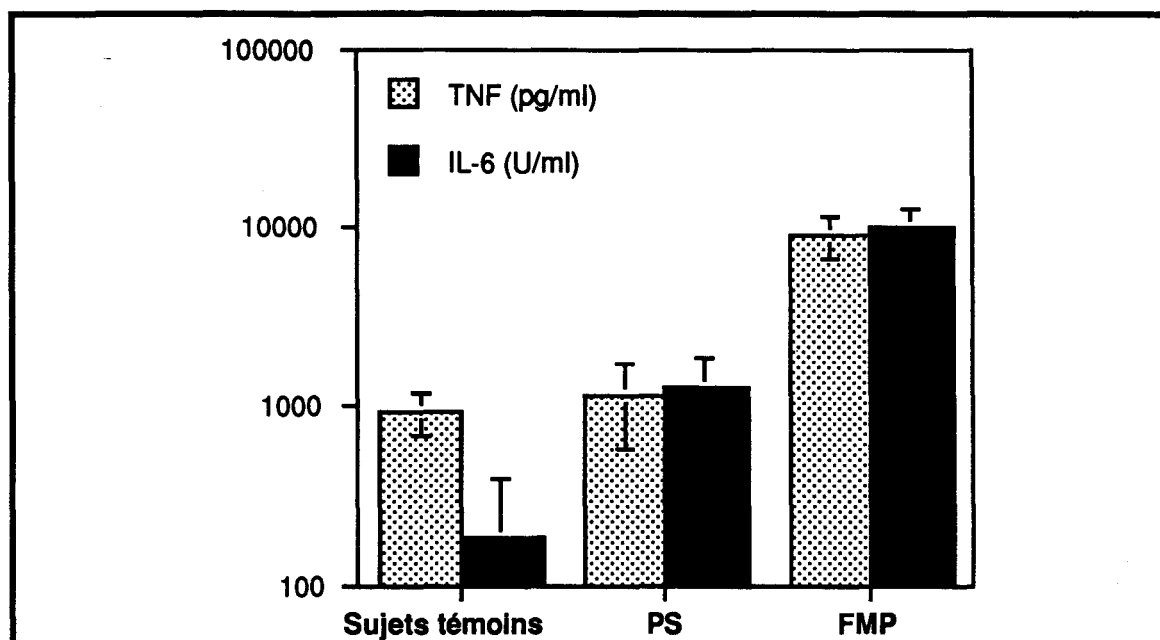


Figure 4 : Sécrétion spontanée de TNF et d'IL-6 par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques et de sujets témoins. Les surnageants sont récoltés après 3 H de culture. * $P < 0,01$ par comparaison au groupes témoins et pneumoconiose simple. Les résultats des pneumoconiose simple ne sont statistiquement différents des résultats du groupe témoin.

De plus, les niveaux de TNF et d'IL-6 dans les surnageants sont corrélés de façon significative avec le nombre de cellules exprimant les messagers pour le TNF et l'IL-6 ($r=0,71$; $P < 0,05$ pour le TNF; $r=0,62$; $P < 0,018$ pour l'IL-6).

Détection des ARN messagers pour le TNF et l'IL-6 dans le poumon normal et le poumon pneumoconiotique

Les fragments de tissu pulmonaire ont été obtenus après exérèse chirurgicale de tumeur pulmonaire chez des patients exposés ou non au risque coniotique. Les hybridations des sondes de type ARN spécifiques du TNF et de l'IL-6 ont été réalisées sur des tissus provenant de patients pneumoconiotiques ($n=4$) ou de sujets atteints d'un cancer ($n=2$). Les coupes de tissu provenant de sujets témoins ou de patients pneumoconiotiques avec une pneumoconiose simple, hybridées avec les sondes anti-sens ne montrent aucun signal d'hybridation. Pour les coupes provenant de patients avec une fibrose massive progressive, les ARN messagers codant pour le TNF sont toujours détectés en relation avec la détection de particules minérales intracellulaires.

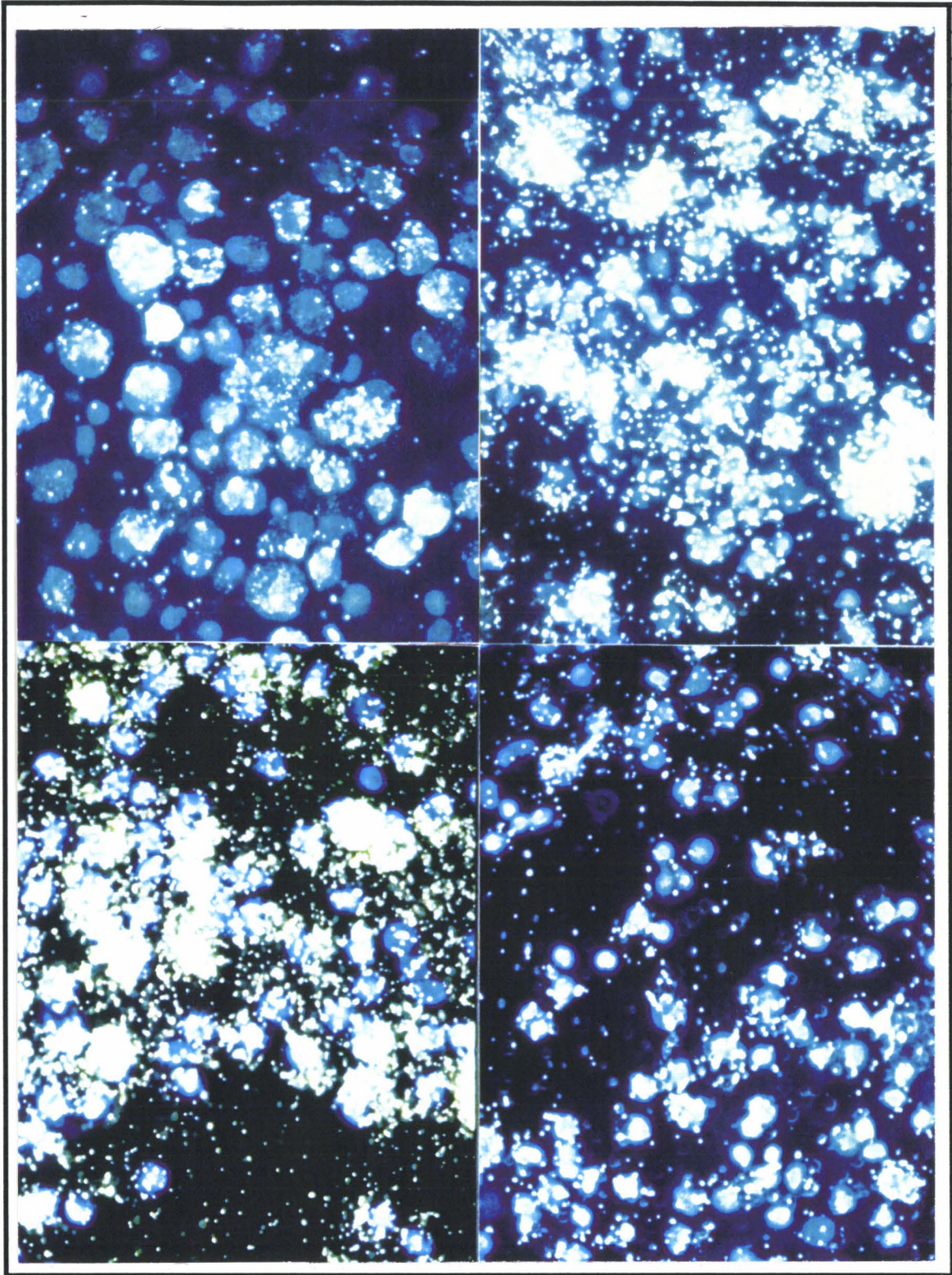


Figure 5 : Hybridation des sondes TNF et IL-6 sur une population cellulaire totale obtenue après lavage bronchoalvéolaire chez un patient pneumoconiotique. (a) aspect de la préparation après coloration au HOECHST, les noyaux apparaissent bleus, les particules minérales dans le cytoplasme des macrophages peuvent être distinguées par leur réfringence (x 400). (b, c) aspect de la préparation après hybridation avec les sondes TNF et IL-6 antisens respectivement (x 200). Aucun signal n'est détecté sur la préparation hybridée avec la sonde IL-6 sens (d), seul le bruit de fond est visible.

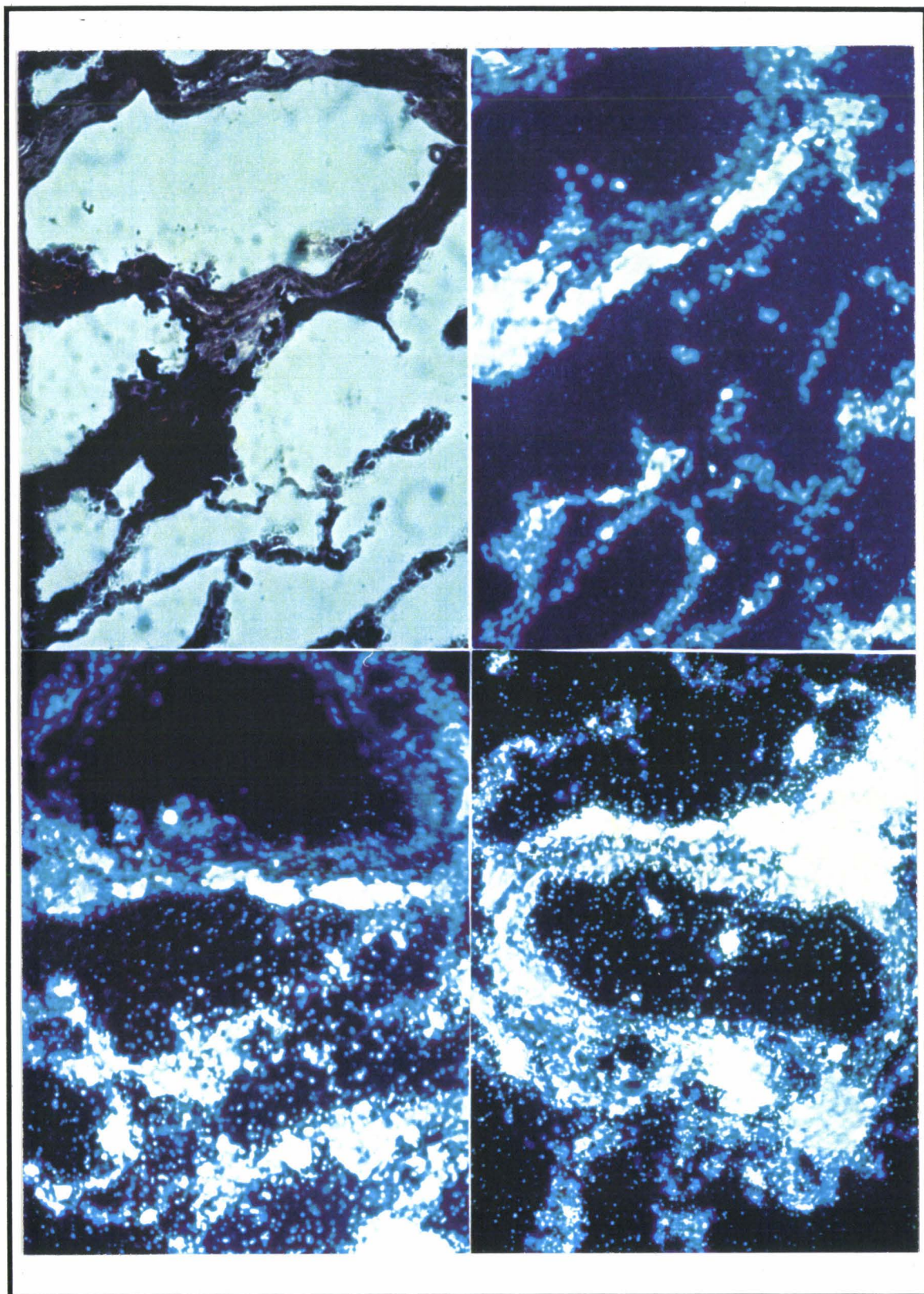


Figure 6 : Hybridation des sondes TNF et IL-6 sur des coupes de tissu pulmonaire provenant d'un patient présentant une FMP. Observation au niveau d'une zone de dépôt périvasculaire (x 200). (a) coloration à l'hématoxyline/éosine. (b) hybridation avec la sonde IL-6 sens, seuls les dépôts coniotiques apparaissent réfringents. (c, d) hybridation avec les sondes TNF et IL-6 antisens respectivement.

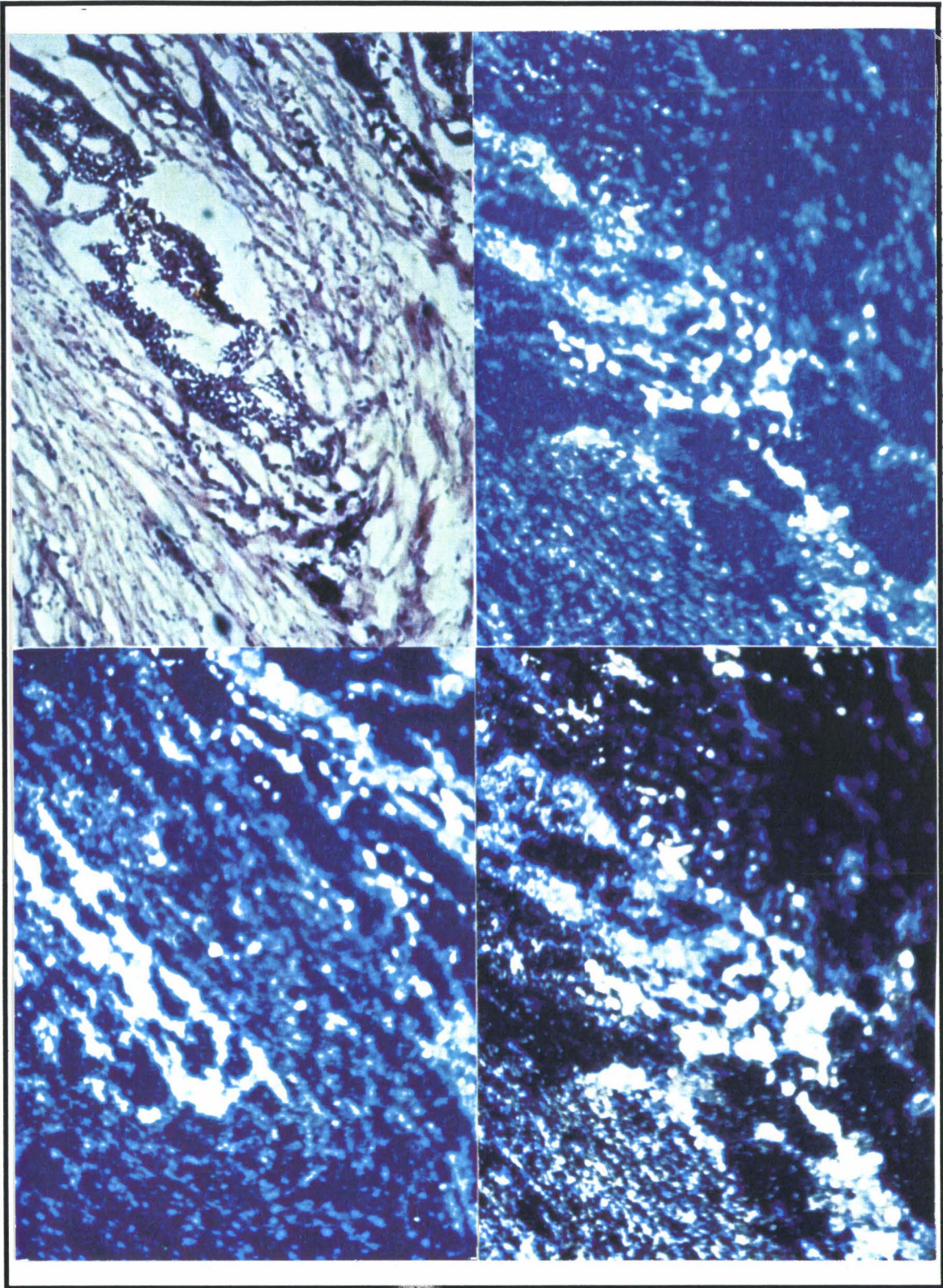


Figure 7 : Hybridation des sondes TNF et IL-6 sur des coupes de tissu pulmonaire provenant d'un patient présentant une FMP. Observation au niveau d'une zone fibroconiotique (x 100). (a) coloration à l'hématoxyline/éosine. (b) hybridation avec la sonde TNF sens. (c, d) hybridation avec les sondes TNF et IL-6 antisens respectivement. Une hybridation positive pour l'IL-6 est observée en bordure de la zone de prolifération fibroblastique. Aucun transcrit TNF n'est détecté.

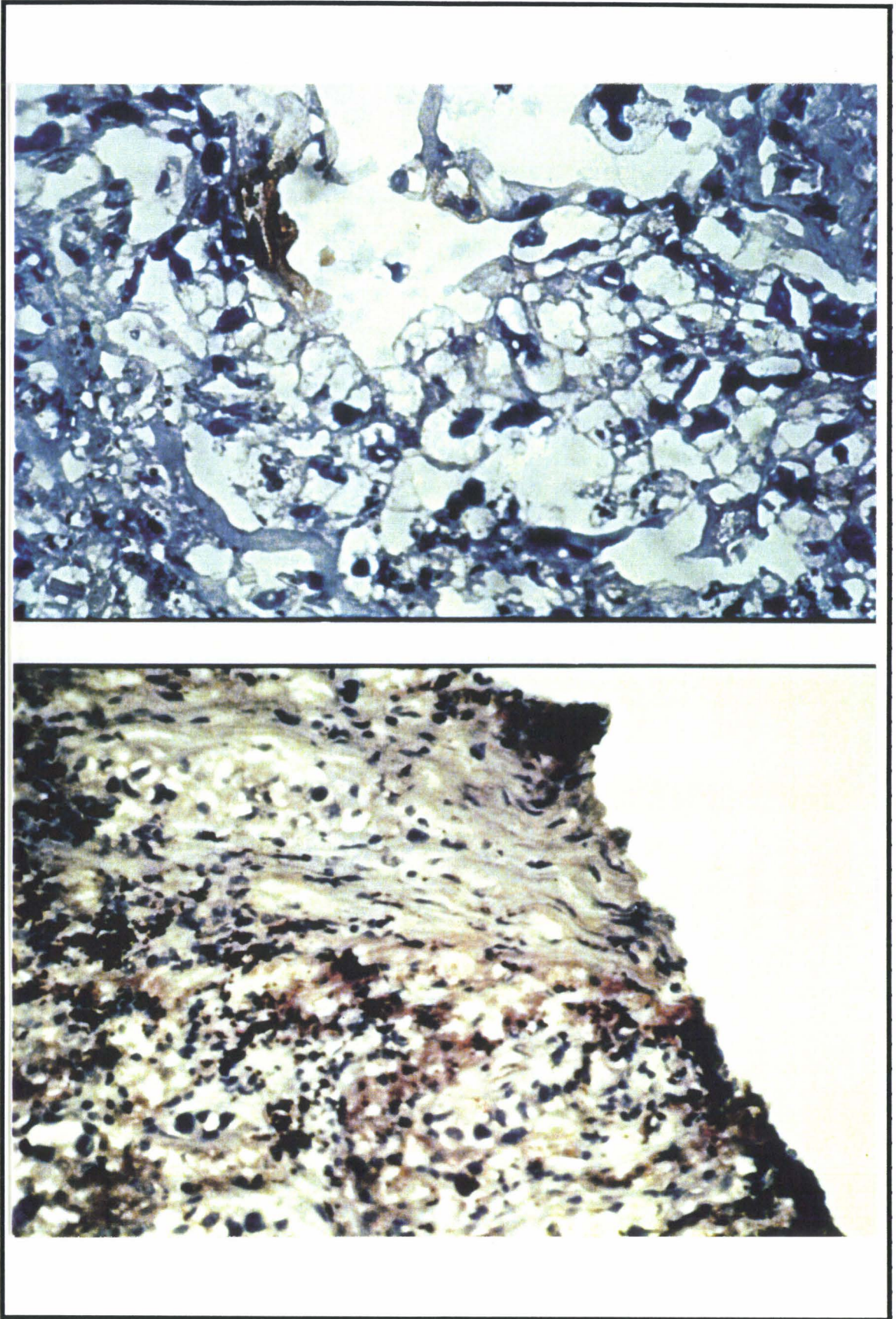


Figure 8 : localisation du TNF et de l'IL-6 par immunohistochimie. (a) Anticorps anti-TNF. (b) Anticorps anti-IL-6.

Les cellules positives pour le TNF sont localisées au niveau de la lumière alvéolaire, au niveau de l'interstitium, et surtout au niveau des zones périvasculaires où le dépôt coniotique est particulièrement important (Fig 6).

En ce qui concerne l'expression des ARN messagers codant pour l'IL-6, les signaux d'hybridation sont observés aux mêmes sites que pour le TNF. Toutefois, ils peuvent être observés aussi au niveau des parois vasculaires et particulièrement au niveau des cellules endothéliales (dont la nature est confirmée par la lecture histologique de la coupe). Au niveau des zones fibroconiotiques, des signaux positifs pour l'IL-6 sont observés uniquement en bordure de la zone de fibrose en relation avec un dépôt de particules minérales. Aucun transcrite pour le TNF n'est observé au niveau de ces mêmes zones. Dans les zones de prolifération des fibroblastes aucun signal d'hybridation n'est observé (Fig 7).

Afin de déterminer si l'expression des ARN messagers était suivie d'une synthèse des molécules, une analyse immunohistochimique a été réalisée afin de localiser les molécules de TNF et d'IL-6 (Fig 8). Au niveau tissulaire, le TNF et l'IL-6 sont détectés de façon prédominante dans les macrophages. La synthèse d'IL-6 est d'autre part confirmée au niveau des cellules endothéliales et des fibroblastes en bordure des zones de prolifération fibroblastique.

DISCUSSION

Dans cette étude, la réalité d'une production *in vivo* de TNF et d'IL-6 a été évaluée par une technique d'hybridation *in situ* et une technique immunohistochimique. Les ARN messagers sont les produits intermédiaires entre le gène et la protéine. Leur détection dans les cellules issues de lavages bronchoalvéolaires ainsi que dans les tissus pulmonaires suggère mais ne prouve pas une synthèse effective de la molécule. Des preuves d'une production *in situ* de TNF et d'IL-6 ont été amenées par les techniques

immunohistochimiques et indirectement par la démonstration d'une production spontanée de ces cytokines par les macrophages alvéolaires en culture.

Différents travaux ont démontré le rôle des poussières minérales dans le développement de la fibrose et dans l'activation du macrophage alvéolaire. En particulier, le travail de Piguet *et al* qui démontrent, dans le modèle murin de fibrose induite par une exposition à la silice, le rôle central du TNF [106]. En effet une seule instillation de silice est capable d'induire une production de TNF et le développement consécutif d'une fibrose. De plus le traitement par un anticorps anti-TNF est capable de prévenir le développement de cette fibrose. D'autre part, Gosset *et al* avaient récemment démontré le rôle direct des poussières de mines dans l'activation du macrophage alvéolaire de sujets témoins [110].

Dans des travaux antérieurs, nous avons démontré que les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques étaient capables de produire différents médiateurs tels que : des anions supéroxydes, de la fibronectine, une activité chimiotactique pour les neutrophiles [122, 123, 135-137]. Par ce travail nous confirmons une précédente étude qui montrait que les macrophages de mineurs comme ceux de patients pneumoconiotiques présentent une sécrétion spontanée de TNF accrue par comparaison à des macrophages de sujets non exposés.

Le présent travail montre que les macrophages alvéolaires de sujets témoins ainsi que de patients pneumoconiotiques expriment spontanément les ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6. D'autre part le pourcentage de macrophages exprimant ces ARN est significativement plus élevé dans les lavages bronchoalvéolaires de patients pneumoconiotiques par comparaison aux sujets témoins. Après distinction pneumoconiose simple versus fibrose massive progressive, l'expression des ARN messagers est plus élevée chez les patients présentant une fibrose massive progressive par comparaison aux patients présentant une pneumoconiose simple. Cette expression accrue est associée à une augmentation de la sécrétion des produits finaux : les molécules de TNF et d'IL-6 biologiquement actives. Toutefois, pour les patients présentant une pneumoconiose simple, une différence entre l'expression des ARN

messagers et la sécrétion des monokines est observée. Le nombre de cellules positives est multiplié par deux entre patients présentant une pneumoconiose simple ou une fibrose massive progressive, alors que les niveaux de sécrétion de TNF et d'IL-6 sont multipliés par dix. Cela suggère une possible différence dans le catabolisme des ARN messagers entre les 2 groupes de patients.

Finalement, il n'y a pas de différence en terme de sécrétion de monokines entre les sujets fumeurs ou non-fumeurs (résultats non présentés).

La corrélation observée entre le contenu en poussières de mines et le pourcentage de cellules exprimant les ARN messagers sont à rapprocher des observations de Gosset *et al* concernant l'activation du macrophage alvéolaire après exposition *in vitro* à des particules minérales [110]. Toutefois, à charge égale, le pourcentage de cellules exprimant les messagers est plus élevé chez les patients présentant une fibrose massive progressive. Cette dernière observation souligne donc une différence dans les mécanismes de régulation des gènes codant pour les deux monokines. De plus, toutes les cellules exprimant les ARN messagers ne contenaient pas de particules minérales, suggérant une stimulation de type paracrine par le TNF produit par les macrophages alvéolaires voisins.

La production des monokines : TNF et IL-6 a de plus été étudiée au niveau du tissu pulmonaire. Bien que la population étudiée était restreinte (SP n=1; FMP n=3), il est possibles de tirer quelques conclusions. Les signaux d'hybridation positifs sont seulement détectés dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive. L'expression des ARN messagers codant pour les monokines est étroitement associée à la présence de particules minérales intracellulaires. Cette association est plus marquée dans le tissu pulmonaire que pour les macrophages alvéolaires isolés.

La nature des cellules exprimant les ARN messagers spécifique du TNF a été déterminée morphologiquement comme étant des cellules de type macrophage. Ce type de cellule est en effet reconnu comme étant la source majeur de TNF dans le poumon. Une technique de double marquage immunohistochimique aurait permis d'identifier de façon certaine

les cellules impliquées, mais nous ne disposons pas d'un matériel biologique suffisant pour permettre toutes les contrôles nécessaires.

Toutes les cellules exprimant les ARN messagers codant pour le TNF sont aussi positives pour l'IL-6. D'autres cellules apparaissent toutefois positives pour l'IL-6 comme les cellules endothéliales ou les fibroblastes. L'expression des messagers pour l'IL-6 ainsi que la détection d'IL-6 antigénique au niveau de l'endothélium suggèrent une activation de la cellule endothéliale. Cette activation peut résulter d'une sécrétion de TNF par les macrophages environnants [153].

Les résultats présentés ici, confirment une augmentation de l'expression des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 ainsi que la synthèse des molécules correspondantes dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive. Toutefois, les processus qui conduisent à cette production augmentée et persistante de TNF et d'IL-6 restent encore incomplètement élucidés. A côté d'une sécrétion accrue de monokines, le développement d'une fibrose massive progressive peut aussi être relié à une production accrue de médiateurs dérivés d'autres populations cellulaires et notamment les lymphocytes qui sont détectés en nombres supérieures dans les lavages bronchoalvéolaires de patients présentant une fibrose massive progressive par comparaison aux patients présentant une pneumoconiose simple.

L'implication du TNF dans les processus inflammatoires et fibrosants a été suggérée par différents travaux. Le TNF induit le recrutement de différentes populations de cellules inflammatoires : lymphocytes, éosinophiles ou neutrophiles qui peuvent être impliqués dans les pathologies touchant l'interstitium pulmonaire [154, 155]. Les mécanismes conduisant à l'infiltration des cellules peuvent être induits par le TNF qui est capable de stimuler la production de facteur chimiotactique [119, 120, 156-159]. Il est aussi capable d'induire l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire [160-162].

Le rôle du TNF dans le développement de réactions fibrotiques consécutives à l'exposition à des particules minérales a été clairement démontré dans un modèle

animal [106]. Ainsi le TNF est capable d'activer ou de stimuler la croissance des fibroblastes *in vitro*. Son action peut être directe ou passer par l'induction de la sécrétion de facteurs de croissance capables de stimuler la prolifération fibroblastique. En effet le TNF est capable d'induire la production de PDGF (Platelet Derived Growth Factor), d'IGF-1 (Insulin like Growth Factor type 1) ou de TGF β (Transforming Growth Factor beta type) [142-145]. D'autre part le TNF peut agir sur la production ou la composition de la matrice extracellulaire [143, 163]. Ainsi il peut inhiber la production de collagène [163, 164] et dans le même temps augmentée l'expression de la collagénase [165-167]. Toutefois, l'activation du macrophage alvéolaire peut conduire directement à la production d'un des composants de cette matrice : chez les patients pneumoconiotiques, Wallaert *et al* démontrent une sécrétion accrue de fibronectine [122]. Le rôle du PDGF a de plus été récemment suggéré par Vignaud *et al* qui démontrent son implication dans la pathogénie de la fibrose idiopathique diffuse [168, 169].

La pneumoconiose du mineur de charbon peut aussi se compliquer par le développement de lésions emphysémateuses. Dans la pathogénie de l'emphysème, le rôle du neutrophile et des métabolites de l'oxygène a été clairement établi [170-172]. Récemment Wallaert *et al* montraient une augmentation de la génération d'anions supéroxydes par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques [122, 123]. Nous n'avons à l'heure actuelle aucune données directes permettant de conclure sur le rôle du TNF dans cette production de radicaux libres par le macrophage. Cependant, il a été montré une activation du neutrophile dépendante du TNF conduisant à un burst oxydatif [173-175]. D'autre part, le TNF est capable d'amplifier la génération de O $_2^-$ par le macrophage préalablement stimulé par des complexes immuns [176]. Toutefois, il ne semble pas que ces hypothèses permettent d'expliquer complètement la survenue des lésions emphysémateuses comme nous le verrons en discussion générales.

L'implication de l'IL-6 dans la pathogénie de la pneumoconiose a été suspectée après la démonstration de sa sécrétion par des macrophages alvéolaires exposés à des

poussières minérales [110]. L'IL-6 peut aussi être impliqué dans les processus inflammatoires et en particulier dans le recrutement de certaines populations cellulaires : l'IL-6 peut induire l'expression de molécules d'adhésion cellulaire à la surface du monocyte [177]. D'autre part l'IL-6 semble être impliqué dans certains processus profibrotique, de par sa capacité à induire *in vivo* une synthèse de collagène [178]. *In vivo*, l'IL-6 semblent être impliquée dans les processus autoimmuns en association avec l'interleukine-1 et le TNF [179]. La démonstration d'une sécrétion d'IL-6 dans le poumon pneumoconiotique pourrait expliquer la fréquente association avec des pathologies de type autoimmunes ainsi que l'hypergammaglobulinémie observée chez les patients pneumoconiotiques [51, 52, 59]. Toutefois, l'IL-6 est aussi décrit comme un facteur capable d'exprimer des propriétés antiinflammatoires. L'IL-6 a un rôle protecteur dans différents modèles d'hypersensibilité chez la souris [180, 181]. Il supprime aussi l'extravasation des neutrophiles causée par l'instillation intratrachéale d'endotoxine chez le rat [182]. Des études plus récentes ont montré aussi que l'IL-6 est capable d'inhiber la production de TNF et d'IL-1 par des monocytes (U937) ou *in vivo* chez la souris [183, 184]. D'autre part, l'IL-6 peut induire chez l'homme la production de récepteur soluble pour le TNF et d'IL-1ra [185], deux molécules reconnues pour leur potentialités anti inflammatoires. Cette dernière est d'autre part capable de prévenir le développement de la fibrose pulmonaire consécutive à l'instillation de silice chez la souris [108].

En conclusion, ces résultats confirment l'implication des ces deux monokines : le TNF et l'IL-6 dans la pathogénie de la pneumoconiose du mineur de charbon. Mais les mécanismes exacts qui conduisent à cette sécrétion accrue de médiateurs macrophagiques chez les patients présentant une fibrose massive progressive en comparaison aux patients présentant une pneumoconiose simple, malgré une exposition similaire au risque coniotique, restent discutables.

**SECRETION DE MEDiateurs PROFIBROSANTS PAR
LES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES DE PATIENTS PNEUMOCONIOTIQUES**

**MODULATION DE LA PROLIFÉRATION FIBROBLASTIQUE
PAR LE PDGF, L'IGF-1 ET LE TGF β**

INTRODUCTION

Comme nous venons de le voir, les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques sécrètent des taux élevés de médiateurs proinflammatoires comme le TNF et l'IL-6. Cette observation ayant été étendue au niveau tissulaire, confirment une expression accrue des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6, ainsi que leur synthèse dans le poumon pneumoconiotique.

En la discussion du chapitre précédent, nous avons développé la possible implication du TNF dans les réactions inflammatoires et fibrosantes. Ainsi le TNF, à lui seul, est capable de promouvoir le recrutement des fibroblastes, leurs réplifications, ou la production de protéines de la matrice extracellulaire [143]. D'autres médiateurs macrophagiques ont toutefois été impliqués dans les processus fibrosants caractérisant la pneumoconiose du mineur de charbon [142-145, 163].

La prolifération des fibroblastes nécessite l'effet additif de deux signaux : un signal de "compétence" et un signal de "progression" [143, 186]. Le macrophage alvéolaire est capable d'exprimer les deux types d'activité par sa capacité à produire du PDGF, Platelet Derived Growth Factor [169], et de l'IGF-1, Insulin-like Growth Factor de type 1 [141]. Le PDGF est un facteur de compétence qui va permettre à la cellule d'entrer dans le cycle cellulaire (passage du stade G0 au stade G1 du cycle

cellulaire)[187]. L'IGF-1 est un facteur de progression qui permet la progression dans le cycle cellulaire (passage du stade G1 au stade G2-S du cycle cellulaire)[141].

Une autre cytokine produite par le macrophage alvéolaire a été impliquée dans le développement de fibrose pulmonaire : le TGF β , Transforming Growth Factor de type beta [188]. Bien que le rôle de cette cytokine ne soit pas définitivement établi, le TGF β pourrait agir comme facteur régulant le recrutement et la prolifération des fibroblastes. D'autre part le TGF β a aussi été impliqué dans les mécanismes de régulation des processus inflammatoires [143, 188, 189].

Afin de déterminer l'implication d'autres médiateurs profibrosants, en plus du TNF, dans le développement de la fibrose pulmonaire chez les patients pneumoconiotiques, la production de facteurs modulant les fonctions du fibroblaste a été évaluée (PDGF, IGF-1 et TGF β). Nous avons donc évalué la production de PDGF, d'IGF-1 et de TGF β par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques après distinction pneumoconiose simple et fibrose massive progressive et de sujets témoins. Nous avons aussi mesuré l'effets de particules minérales sur la production de ces trois facteurs par des macrophages de sujets témoins.

A coté de la mesure des capacités sécrétrices des macrophages alvéolaires, la capacité des surnageants de macrophages à promouvoir ou à inhiber la croissance d'une lignée de fibroblastes pulmonaires humains a été testée.

MATERIELS ET METHODES

Patients

Vingt-cinq mineurs présentant une pneumoconiose ont été sélectionnés et répartis, selon les critères définis précédemment, en 2 groupes : patients présentant une pneumoconiose simple (PS; n=16), patients présentant une fibrose massive progressive (FMP; n=9). De plus 14 sujets témoins n'étant pas exposés à la poussière

de mines ont été sélectionnés ainsi que 6 patients présentant une fibrose idiopathique diffuse (FID). Le diagnostic de fibrose idiopathique diffuse s'est basé sur les caractéristiques pathologiques des biopsies bronchiques. Deux des patients présentant une fibrose idiopathique diffuse étaient traités par corticostéroïdes, un patients par corticostéroïdes plus cyclophosphamide, les trois autres patients ne recevaient aucun traitement. Aucun des patients pneumoconiotiques ou des sujets témoins ne recevaient de traitement au moment du lavage bronchoalvéolaire. Les caractéristiques cliniques et biologiques concernant cette population sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Population entrant dans l'étude.

	Sujets témoins	Patients présentant une		
		PS	FMP	FID
n	14	18	9	6
Age (an)	49 ± 3,1	61 ± 1,5	69 ± 2	42 ± 2,5
Durée d'exposition	0	24,1 ± 2,8	25,7 ± 2	0
Tabagisme				
Fumeur	9	7	1	2
Non fumeur	5	11	8	4
Cellules (10 ⁴ /ml)	32,3 ± 3,9	28,6 ± 7,6	35,9 ± 6,3	25,0 ± 10,2
Comptage différentiel (%)				
Macrophages	88,8 ± 1,8	88,2 ± 1,4	89,2 ± 2,6	76 ± 8,4
Lymphocytes	7,2 ± 1,1	8,2 ± 1,3	6,3 ± 1,2	15,4 ± 8,1
Neutrophiles	1,2 ± 0,9	2,7 ± 0,6	3,2 ± 1,3	5,2 ± 3,6

Toutes les valeurs sont exprimées en M ± SEM.

* les valeurs de fonctions respiratoires sont exprimées en % de la valeur théorique

Isolement et mise en culture des macrophages alvéolaires

Les lavages sont traités comme il a été décrit dans le chapitre précédent.

De plus les liquides de lavage après séparation des cellules ont été concentrés dix fois puis stockés à -20°C en vue du dosage des différentes cytokines.

Méthode d'exposition des macrophages alvéolaires aux particules minérales

L'exposition des macrophages alvéolaires a été réalisée selon la méthode décrite par Gosset *et al* [110]. Brièvement les échantillons de poussière de mines ont été obtenus par filtration d'air dans les mines du bassin houiller du Nord de la France. Elles contiennent 55,4 % de matières minérales, dont 3,2 % de silice sous forme de quartz a. L'oxyde de titane (TiO₂ Kronos) a été utilisé comme poussière inerte. Toutes les particules ont un diamètre inférieur à 5 µm. Les particules sont autoclavées 90 min à 180°C et sont ensuite traitées durant 3 H dans du E-Toxa clean (1% dans du PBS, Sigma). Elles sont considérées comme exemptes d'endotoxines après plusieurs lavages supplémentaire en RPMI 1640.

Les macrophages alvéolaires sont exposés aux poussières minérales à la concentration finale de 0,1 et 1 mg/ml durant 24 H (soit 0,2 et 2 mg pour 3 10⁶ cellules). Ces conditions ont été déterminées comme étant optimales pour l'observation d'une activation significative du macrophage. Les surnageants sont recueillis, filtrés sur filtre 0,45 µm puis stockés à -20°C.

Mesure de l'activité Lactate déshydrogénase

La mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) a été réalisée afin de déterminer si l'exposition des macrophages alvéolaires aux poussières minérales n'était pas associée à une perte de ce marqueur d'intégrité cellulaire. L'activité LDH a été mesurée par analyse spectrophométrique de l'oxydation du NADH [190]. Les résultats sont exprimés en UI/ml.

Dosages des cytokines.

Dosage du PDGF. Les concentrations en PDGF ont été évaluées par dosage radioimmunologique (Amersham). Le dosage est basé sur la compétition, entre le PDGF froid contenu dans les échantillons et une quantité connue de PDGF marqué à l'iode 125 (¹²⁵I)(BB homodimère, humain recombinant), pour un nombre limité de sites d'un sérum de chèvre anti-PDGF humain. Les anticorps qui ont fixé le PDGF sont incubés en présence d'un anticorps d'âne anti-mouton. La séparation des immun-complexes est

effectuée par centrifugation. Les concentrations de PDGF dans les échantillons sont déterminées à partir d'une courbe standard. Les standards PDGF sont fournis par Amersham. Ce protocole défini par Amersham donne un seuil de sensibilité de 0,8 fmol. Les valeurs inférieures à 15 fmol/ml sont considérées comme nulles.

Dosage de l'IGF-1. Les concentrations en IGF-1 ont été évaluées par dosage radioimmunologique (Amersham). Le dosage est basé sur la compétition, entre l'IGF-1 froid contenu dans les échantillons et une quantité connue d'IGF-1 marqué au ^{125}I (IGF-1, humain recombinant), pour un nombre limité de sites d'un sérum de lapin anti-IGF-1 humain. L'IGF-1 marqué et le sérum anti-IGF-1 sont fournis par Amersham. Une courbe standard est établie par addition de quantité connue d'IGF-1 humain recombinant (Boehringer). Les immun-complexes sont précipités par addition d'un anticorps d'âne anti-lapin fixé à des billes magnétiques, la séparation étant effectuée par centrifugation. Les concentrations d'IGF-1 dans les échantillons sont déterminées à partir d'une courbe standard. Ce protocole défini par Amersham donne un seuil de sensibilité de 1 ng. Les valeurs inférieures à 10 ng/ml sont considérées comme nulles.

Les dosages radioimmunologiques pour le PDGF et l'IGF-1 incluaient une étape afin de tester les interactions possibles entre le dosage et les facteurs de type "PDGF- ou IGF-1-binding protein". Pour ce la les dosages ont été réalisés avant et après traitement acide des échantillons. Brièvement, de l'acide acétique glacial est ajouté aux échantillons à la concentration finale de 1 M. Après une heure, les échantillons sont neutralisés par du NaOH. Ils sont alors lyophilisés et reconstitués par de l'eau distillée au volume initial. L'acidification des échantillons n'a entraîné aucune modification par rapport aux données obtenues sans acidification. De plus, dans le cas du PDGF, l'addition d'a2-macroglobuline n'a pas interféré avec le dosage, les courbes de reconnaissance du PDGF en présence de 0,2 ou 2 mg/ml d'a2-macroglobuline n'ont pas été affectées (Tableau 8).

Les différences observées par rapport aux données recueillies selon la méthode de dosage du PDGF de rat développée par Kumar *et al* [191, 192] peuvent résulter de

différences dans les caractéristiques des anticorps anti-PDGF utilisés, les épitopes reconnus par les anticorps spécifiques du PDGF humain peuvent être différents. D'autre part le milieu réactionnel du présent dosage peut induire une plus grande affinité de l'immusérum spécifique comparée à l' α 2-macroglobuline.

Tableau 8 : Detection du PDGF Humain lorsque de l' α 2-macroglobuline est présente dans les dilutions des standards de dosage. Les résultats sont exprimés en % (B/B₀)

PDGF (fmol/ml)	Control	0,2 mg/ml α 2M	2 mg/ml α 2M
100	5,2	1,8	5,2
50	9,5	8,1	7,3
25	25,4	24,7	22,1
12,5	47,8	40,9	43,7
6,25	49,4	52,1	51,1

Dosage du TGFb. Le TGFb est normalement présent dans les liquides biologiques sous la forme de TGFb latent qui n'est pas détecté par cet ELISA. Afin de détecter le TGFb total quelle que soit sa forme, les surnageants de macrophages alvéolaires et les liquides de lavages sont traités par acidification ce qui libère la forme active du TGFb [188]. Les concentrations en TGFb sont évaluées par un ELISA spécifique du TGFb2 sous forme active (R&D system). La détection du TGFb2 a été considérée comme un bon marqueur de l'activité TGFb totale. En effet dans de nombreux systèmes, la sécrétion et l'activité des différents TGFb sont équivalents [193]. Le protocole défini par R&D system donne un seuil de sensibilité de 0,4 pg. Les valeurs inférieures à 10 pg/ml sont considérées comme nulles.

Mesure de la prolifération des fibroblastes

Des fibroblastes pulmonaires foetaux humains (lignée MRC5, passage 27) sont cultivés en DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF). Ils sont mis en culture à raison de 5000 cellules par puits d'une plaque 96 trous. Après 24 H, la culture est lavée et remise en incubation pour 24 H en milieu 1 % de SVF afin de rendre les cellules quiescentes. Du milieu frais est ajouté en présence de TGFb (concentration finale : 10^{-6} à 1 ng/ml), de surnageant de macrophages (dilution finale : 1/2) avec ou sans addition d'anticorps anti-TGFb à la concentration finale de

10 mg/ml (anticorps de souris anti-TGFb1, 2, 3; Genzyme). La culture est poursuivie durant 48 H. Durant les 24 dernières heures, une mesure de l'incorporation de thymidine tritiée est réalisée (addition de 0,5 mCi de ^3H -thymidine (CEA)).

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en $M \pm \text{SEM}$. La significativité des différences entre les moyennes observées est déterminée par : 1) une analyse des variances selon le test de Fischer, et : 2) par le test de Mann-Whitney pour des valeurs non appariées ou par le test de Wilcoxon. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

RESULTATS

Effets des particules minérales sur la production de PDGF, IGF-1 et TGFb par les macrophages alvéolaires

L'effet des poussières minérales (0,2 ou 2 mg pour 3×10^6 macrophages alvéolaires) est évalué sur une culture de macrophages alvéolaires obtenus chez 5 sujets témoins. L'exposition aux poussières de mine de charbon induit une augmentation significative de la production de PDGF, IGF-1 et de TGFb ($P < 0,05$) quelles que soient les concentrations en particules minérales. L'absence de détection de TGFb avant acidification des surnageants (résultats non présentés) permet de supposer que les macrophages produisent la forme latente du TGFb. L'oxyde de titane n'a aucun effet sur la production de PDGF ou d'IGF-1, mais induit une augmentation significative de la sécrétion d'IGF-1. Les valeurs des concentrations sont résumées dans le Tableau 9. L'observation microscopique des cultures après 24 H d'exposition montre que les cellules ont phagocyté la majeure partie des particules minérales.

De plus les différences de niveau d'activité LDH dans les surnageants entre les cellules exposées et non exposées ne sont pas significatives (Milieu : $0,043 \text{ UI/ml} \pm 0,005$; TiO_2 : $0,049 \text{ UI/ml} \pm 0,012$; Poussières de mine : $0,067 \text{ UI/ml} \pm 0,014$). Ceci suggère que l'exposition aux particules minérales, dans nos conditions expérimentales, n'altère pas de façon significative la viabilité des macrophages alvéolaires.

Tableau 9 : Production de PDGF, IGF-1, TGFb par les macrophages alvéolaires de sujets témoins exposés à différents types de particules minérales

Monokines	TiO_2			Coal mine dust	
	Medium	0.1 mg/ml	1 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml
PDGF (fmol/ml)	21.00 ± 2.05	25.30 ± 1.48	26.08 ± 1.33	35.60 ± 2.45°	35.70 ± 4.04°
IGF-1 (ng/ml)	17.13 ± 2.47	26.34 ± 2.36°	29.58 ± 2.13°	35.21 ± 7.88°	48.37 ± 7.79°
TGFb # (pg/ml)	39.32 ± 6.38	31.64 ± 11.81	43.48 ± 6.86	75.15 ± 5.09°	84.61 ± 8.03°

TiO_2 = oxyde de titane

Concentration en TGFb après traitement acide. Avant traitement les valeurs sont inférieures aux limites de détection du Kit.

° $P < 0.05$ par comparaison aux valeurs obtenues pour les macrophages non exposés.

Détection du PDGF, IGF-1 et TGFb dans les liquides de lavages

Les concentrations en PDGF, IGF-1 et TGFb dans les liquides de lavages ont été mesurées pour les 4 groupes de patients : les sujets témoins ($n=14$), les patients pneumoconiotiques (PS $n=13$; FMP $n=8$), et les patients présentant une fibrose idiopathique diffuse (FID $n=6$). La mesure des taux de TGFb a été réalisée avant et après traitement acide des liquides de lavages. Les valeurs présentées reflètent les concentrations en cytokines avant concentration, elles sont résumées dans le Tableau 10.

Pour les patients pneumoconiotiques, une augmentation significative des concentrations en PDGF et IGF-1 est détectée dans les liquides de lavages des patients présentant une fibrose massive progressive par comparaison aux patients présentant

une pneumoconiose simple et aux sujets témoins. De façon intéressante, les concentrations en TGFb suivent un profil inverse. Ainsi les concentrations en TGFb sont augmentées dans les lavages de patients présentant une pneumoconiose simple par comparaison aux patients présentant une fibrose massive progressive et aux sujets témoins. De plus aucune différence dans la détection du TGFb n'a été observée avant et après traitement acide.

Tableau 10 : Concentrations en PDGF, IGF-1 et TGFb dans les liquides de lavage.

	Traitement acide	Sujets témoins	Patients présentant une		
			SP	PMF	FID
PDGF fmol/ml	non	32,34 ± 6,27 n=14	29,55 ± 8,65 n=13	73,89 ± 32,34° n=8	40,10 ± 12,4 n=6
IGF-1 ng/ml	non	6,34 ± 0,52 n=14	6,46 ± 0,57 n=13	8,74 ± 0,87° n=8	10,32 ± 0,84° n=6
TGFb pg/ml	non	1,45 ± 0,96 n=9	6,20 ± 1,48° n=8	1,37 ± 0,88 n=6	2,85 ± 0,58 n=6
	oui	2,93 ± 2,5 n=9	6,78 ± 1,39° n=8	1,69 ± 0,79 n=6	2,67 ± 0,34 n=6

Les valeurs présentées reflètent les concentrations en cytokines avant concentration.

° P < 0,05 par comparaison aux valeurs obtenues pour les sujets témoins.

Pour les patients présentant une FID, les concentrations en TGFb ne diffèrent pas entre patients et sujets témoins que ce soit avant ou après traitement acide. Le PDGF et l'IGF-1 sont détectés à de fortes concentrations. La concentration en IGF-1 est significativement augmentée par comparaison aux sujets témoins, par contre la différence n'est pas significative en ce qui concerne le PDGF.

Sécrétion de cytokines par les macrophages alvéolaires après 3 H de culture.

Les concentrations en PDGF, IGF-1 et TGFb ont été mesurées dans les surnageants de 3 H de culture de macrophages alvéolaires pour chacun des groupes étudiés : les sujets témoins (n=10), les patients pneumoconiotiques (PS n=16; FMP n=9), et les patients présentant une FID (n=6). La mesure des taux de TGFb a été réalisée avant et après traitement acide des surnageants.

Les concentrations en PDGF et IGF-1 sont significativement augmentées dans les surnageants de macrophages de patients présentant une fibrose massive progressive (PDGF : $52.42 \text{ fmol/ml} \pm 25.77$; IGF-1 : $44.49 \text{ ng/ml} \pm 8.17$) comparativement aux patients présentant une pneumoconiose simple (PDGF : $34.03 \text{ fmol/ml} \pm 17.08$; IGF-1 : $23.16 \text{ ng/ml} \pm 2.84$) et aux sujets témoins (PDGF : $16.38 \text{ fmol/ml} \pm 5.75$; IGF-1 : $23.86 \text{ ng/ml} \pm 5.19$)(Fig 9). Bien que des niveaux détectable de TGFb soient observés dans les surnageants avant traitement acide, les différences entre les différents groupes ne sont observées qu'après acidification des surnageants (Fig 9). Contrairement au PDGF et IGF-1, la mesure du taux de TGFb montre un profil inverse de sécrétion par les macrophages de patients pneumoconiotiques. Les taux de TGFb sont significativement augmentés dans les surnageants de macrophages de patients présentant une pneumoconiose simple ($168,20 \text{ pg/ml} \pm 17.54$) comparativement aux patients présentant une fibrose massive progressive ($72.93 \text{ pg/ml} \pm 7.10$) et aux sujets témoins ($48.88 \text{ pg/ml} \pm 10.51$)(Fig 9).

Pour les patients présentant une FID, leurs macrophages sécrètent des taux significatifs de PDGF et IGF-1. Par contre ils produisent significativement moins de TGFb ($12.67 \text{ pg/ml} \pm 4.03$; $P < 0,05$) que les sujets témoins au moins pour les valeurs obtenues avant traitement acide. Après acidification des surnageants les différences ne sont plus significatives ($25.50 \text{ pg/ml} \pm 8.86$; $P = 0.07$)(Fig 9).

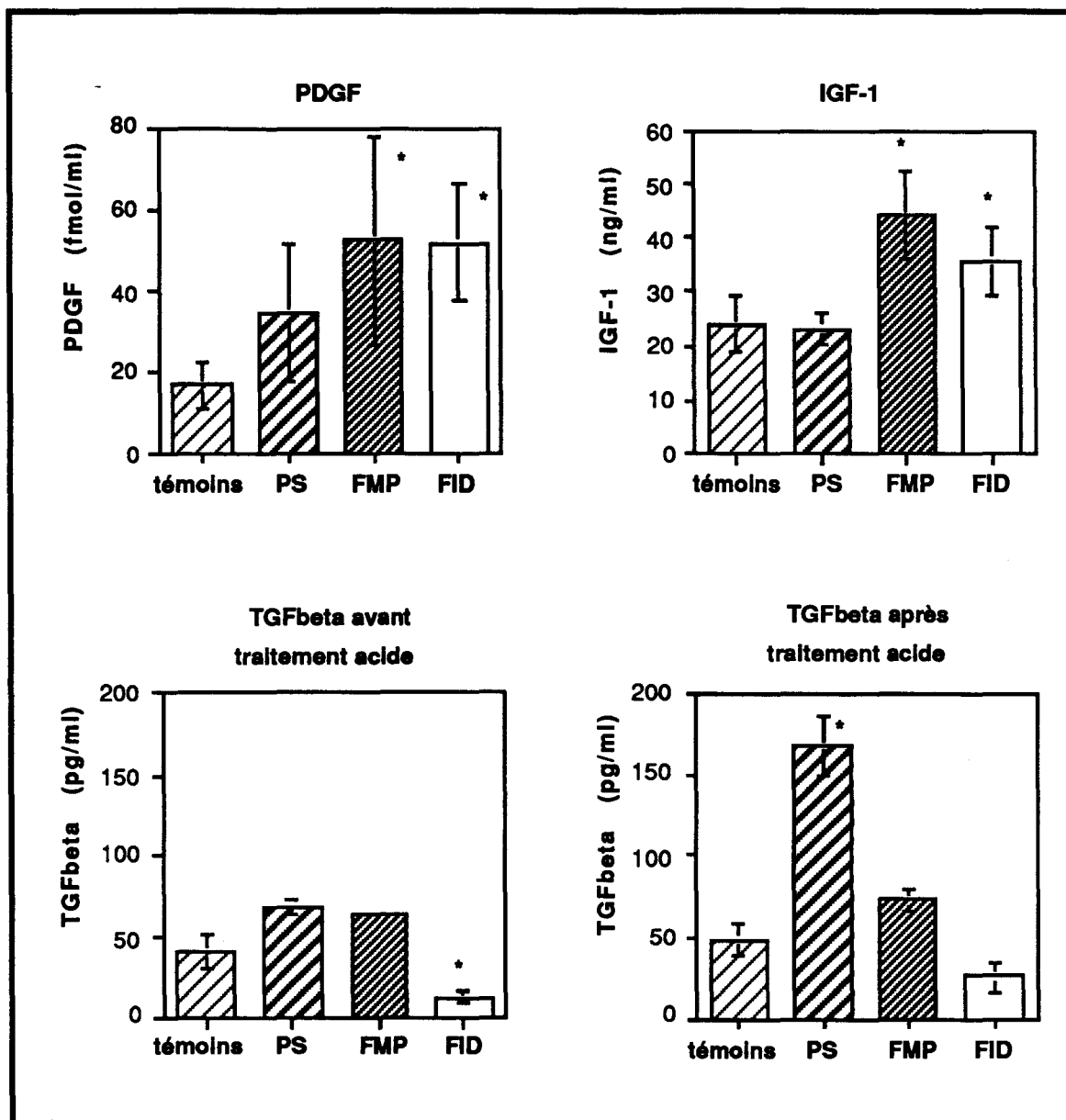


Figure 9 : Concentrations en PDGF, IGF-1 et TGFb dans les surnageants de culture de macrophages alvéolaires pour chacun des groupes : sujets témoins (n=10), patients pneumoconiotiques (PS n=16; FMP n=9), et patients présentant une FID (n=6). Les surnageants ont été récoltés à 3 H de culture. La détection du TGFb a été réalisée avant et après traitement acide des surnageants. * $P < 0,05$ par comparaison au groupe de sujets témoins. Les valeurs obtenues pour les patients présentant une pneumoconiose simple ne sont pas significativement différentes des valeurs du groupe témoins sauf pour le TGFb après traitement acide.

Prolifération de fibroblastes pulmonaires en réponse à un surnageant de macrophage alvéolaire ou au TGFb purifié

Les surnageants de 3 H de culture de macrophages alvéolaires ont été testés pour leurs capacités à moduler la croissance de fibroblastes pulmonaires humains (lignée MRC5, passage 27) dans des conditions de faible concentration en sérum de veau foetal (SVF). Après traitement acide, les surnageants de macrophages alvéolaires de patients présentant une fibrose massive progressive mais aussi de patients présentant une FID, sont capables d'induire la prolifération d'une culture de fibroblastes évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée (respectivement : $85 \% \pm 29$ et $74 \% \pm 20$ exprimé en % variation d'incorporation de thymidine tritiée). Par contre les surnageants de macrophages alvéolaires de patient présentant une pneumoconiose simple induisent une inhibition significative de l'incorporation de ^3H -thymidine ($-28 \% \pm 8$)(Fig 10).

Avant traitement acide, les surnageants de patients présentant une fibrose massive progressive ou une FID donnent les mêmes résultats. Par contre les patients présentant une pneumoconiose simple n'induisent pas l'inhibition de croissance observée (résultats non présentés).

Ces résultats suggèrent donc l'implication d'un facteur activable par traitement acide. Le rôle du TGFb dans notre modèle a donc été évalué par l'addition d'anticorps neutralisants anti-TGFb (Fig 10).

La neutralisation des surnageants de macrophages alvéolaires de patients présentant une fibrose massive progressive comme une FID, est sans effets significatifs. Par contre la croissance des fibroblastes est restaurée après neutralisation du TGFb contenu dans les surnageants de macrophages de patients présentant une pneumoconiose simple ($45 \% \pm 27$; $P < 0,05$ comparée à l'absence d'anti-TGFb).

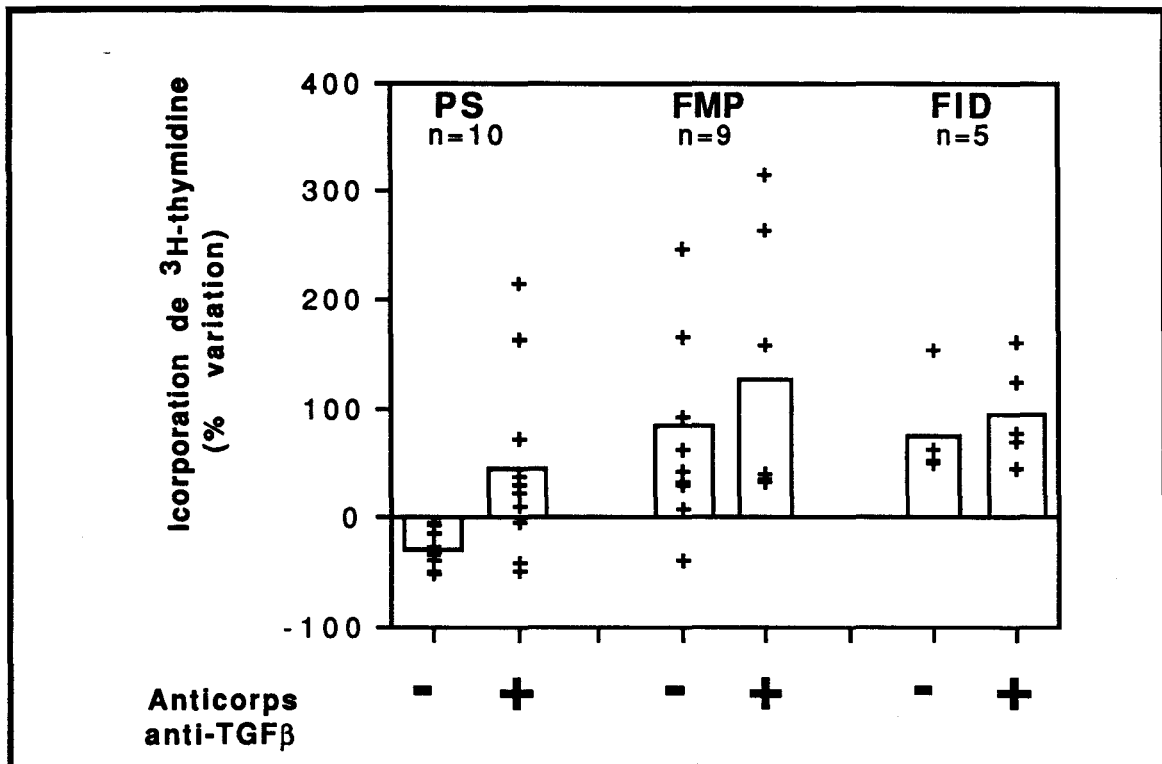


Figure 10 : Effets des surnageants de macrophages alvéolaires sur l'incorporation de ^3H -thymidine par des fibroblastes pulmonaires humains (lignée MRC5, passage 27). Les macrophages proviennent de patients pneumoconiotiques (PS $n=10$; FMP $n=9$), de patients présentant une FID ($n=5$) ou de sujets témoins ($n=10$). Les surnageants sont récoltés après 3 H de culture et sont "activés" par traitement acide. Les résultats sont exprimés en % variation entre chaque patients et une valeur d'incorporation moyenne obtenue pour les sujets témoins ($1253 \text{ cpm} \pm 115$). Le rôle du TGFb a été apprécié par l'addition d'un anticorps neutralisant anti-TGFb (concentration finale 10 mg/ml).

Dans un second temps, le rôle du TGFb purifié sur la prolifération des fibroblastes a été testé (Fig 11). Une inhibition de l'incorporation de ^3H -thymidine est observée. Cette inhibition apparaît être dépendante de la concentration en TGFb. L'inhibition maximale est obtenue pour une concentration de 10 pg/ml . Le 50 % d'inhibition est obtenue pour une concentration de $0,5 \text{ pg/ml}$.

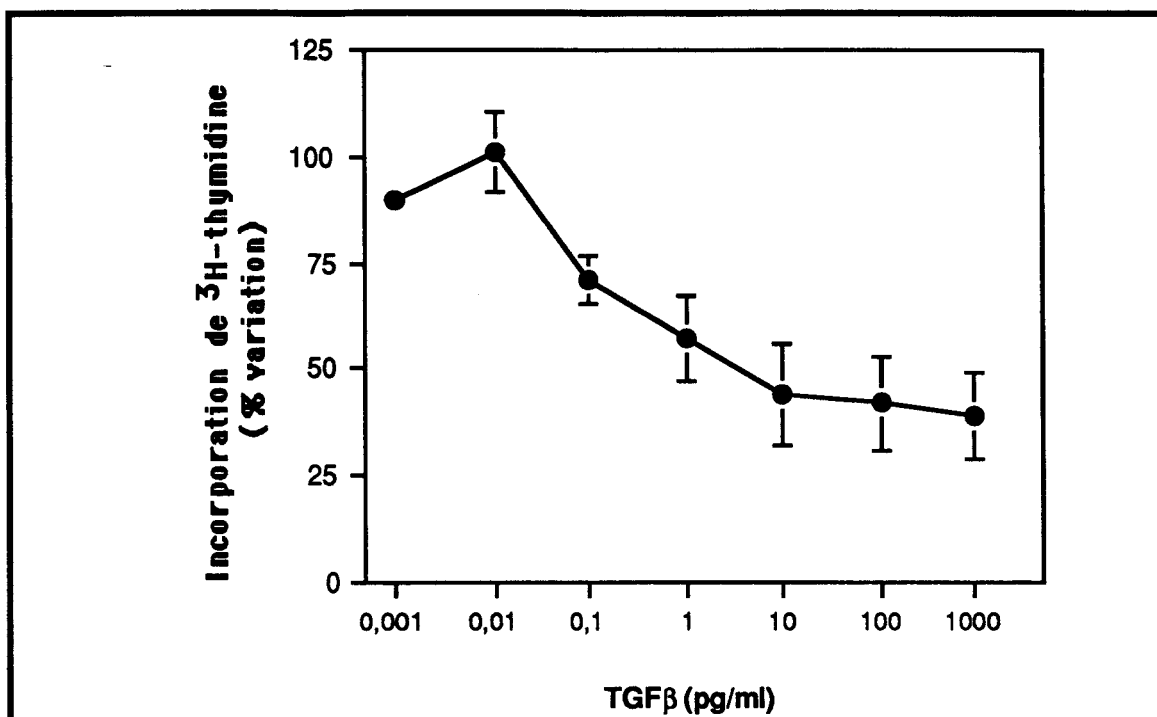


Figure 11 : Inhibition de l'incorporation de ³H-thymidine par une culture de fibroblaste par des concentrations croissantes de TGFβ. Les résultats sont exprimés en % variation par rapport au témoin sans TGFβ dont le niveau d'incorporation est considéré comme équivalent à 100 % (1864 cpm ± 224). La figure représente la moyenne de 3 expériences séparées.

DISCUSSION

Le but de ce travail était de vérifier la pertinence clinique des différentes cytokines sécrétées par le macrophage alvéolaire et leurs rôles respectifs dans le développement de la fibrose pulmonaire chez les patients souffrant d'une pneumoconiose du mineur de charbon. Pour cela, la sécrétion par les macrophages alvéolaires de 3 médiateurs profibrosants : PDGF, IGF-1 et TGFβ, et leur présence au niveau des liquides de lavage bronchoalvéolaire ont été recherchées. De plus un intérêt particulier a été porté aux différences entre pneumoconiose simple et fibrose massive progressive.

Nos résultats indiquent que les poussières de mine sont capables d'induire la sécrétion des 3 facteurs profibrosants par des macrophages alvéolaires de sujets témoins exposés *in vitro* à différents types de poussières minérales. Le PDGF, l'IGF-1 et le

TGFb sont détectés à des taux plus élevés dans les liquides de lavage de patients pneumoconiotiques avec une réponse distincte en fonction du degré de sévérité de la maladie. Les concentrations en PDGF et IGF-1 sont augmentées dans les liquides de lavage de patients présentant une fibrose massive progressive, alors que le TGFb est détecté préférentiellement dans les liquides de lavage de patients présentant une pneumoconiose simple.

L'origine cellulaire de ces 3 facteurs profibrosants a été largement discutée [143]. Toutefois, la capacité de sécrétion de PDGF, IGF-1 et TGFb par des macrophages alvéolaires en 3 H de culture suggèrent que cette cellule représente une des sources importantes de ces médiateurs notamment dans la pneumoconiose du mineur de charbon. En effet, le profil de détection du PDGF, IGF-1 et TGFb dans les liquides de lavage est parallèle à celui observé pour la sécrétion de ces mêmes facteurs par les macrophages alvéolaires.

La présence de TGFb dans les liquides de lavage et dans les surnageants de macrophages de patients pneumoconiotiques a été détectée par une technique ELISA spécifique de la forme active de ce facteur. Celle-ci a pu être libérée par traitement acide des différents échantillons [188]. La comparaison des valeurs obtenues avant et après traitement acide dans les surnageants de macrophages indique que le macrophage alvéolaire est incapable "d'activer" *in vitro* le TGFb. Le TGFb présent dans les liquides de lavage est presque entièrement représenté par sa forme active, suggérant un possible clivage *in vivo* par des enzymes protéolytiques du type plasmin, subtilysin ou cathepsin D selon le schéma présenté Figure 12 [194]. Il semble que la sécrétion du TGFb est sous le contrôle d'un système autorégulé, le TGFb étant capable, selon la concentration, d'augmenter ou de diminuer sinon sa sécrétion, tout au moins son activation [195].

Dans second temps, l'effet des surnageants de macrophages alvéolaires a été testé pour leur capacité à moduler la croissance d'une lignée fibroblastique pulmonaire humaine. Au regard des concentrations en PDGF et IGF-1, il n'est pas surprenant d'observer une prolifération cellulaire en présence des surnageants de patients présentant une fibrose

massive progressive, tout comme les patients présentant une FID. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mêmes surnageants après traitement acide. Par contre les surnageants de macrophages alvéolaires de patients présentant une pneumoconiose simple n'ont pas induit de prolifération des fibroblastes mais au contraire une inhibition de l'incorporation de ^3H -thymidine. Dans les mêmes conditions de culture, le TGFb purifié est capable d'inhiber la croissance de fibroblastes de façon dose-dépendante. Cette inhibition de croissance, induite par le TGFb ou par les surnageants de macrophages, est d'autre part abolie par addition d'un anticorps anti-TGFb.

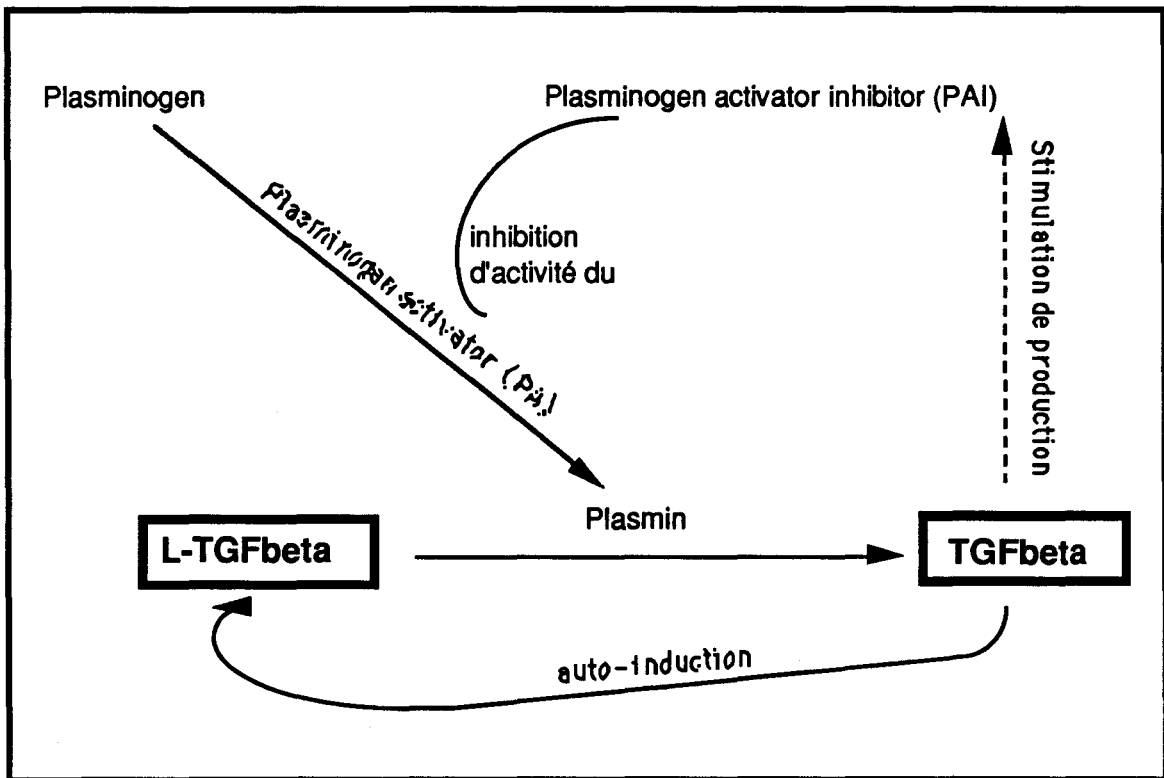


Figure 12 : Schéma possible de régulation de l'activation du TGFb latent *in vivo* : un système auto-régulé. Le TGFb est capable de stimuler sa propre synthèse. D'autre part il est capable de stimuler la production de plasminogen activator inhibitor ce qui induit une diminution du passage L-TGFb vers le TGFb actif.

Nos résultats semblent donc indiquer que le TGFb est capable d'inhiber la prolifération de fibroblastes. Ce phénomène a été décrit par d'autres équipes [132, 196-199]. Il semble que cet effet inhibiteur de la croissance fibroblastique est dû à une modulation

de l'expression du récepteur pour le PDGF [196, 197]. Une faible concentration en TGFb, situation observée chez les patients présentant une fibrose massive progressive, induirait la synthèse de PDGF conduisant à une prolifération fibroblastique. A concentration plus élevée, situation observée chez les patients présentant une pneumoconiose simple, le TGFb induirait une diminution de l'expression du récepteur pour le PDGF, bloquant la boucle autocrine du PDGF. D'autre part certains auteurs sont en faveur d'une activité inhibitrice directe du TGFb sur la prolifération du fibroblaste [197].

Une autre fonction portée par le TGFb, est sa capacité à induire la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire. Le TGFb, quelle que soit la concentration stimule la synthèse de collagène ou de fibronectine [163, 189]. Le TGFb induit la production de collagène de type I et III à des niveaux comparables [163]. Il semble donc qu'il ne soit pas impliqué dans l'augmentation du rapport collagène Type I/Type III qui est observé au niveau des lésions pneumoconiotiques dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive [31]. Dans cette optique l'effet des différents constituants des surnageants de macrophages alvéolaires sur la production de collagène est en cours d'analyse.

A coté de ces éléments en faveur d'une action antifibrosante du TGFb, différents travaux apportent des résultats plus en faveur d'une activité profibrosante du TGFb [143, 189]. Ainsi Denholm *et al* montrent une augmentation du TGFb dans le poumon d'animaux traité à la bléomycine [200]. Chez l'animal [117] comme chez l'homme [201, 202], d'autres auteurs ont pu démontrer une expression du TGFb dans le poumon de patients présentant une fibrose idiopathique diffuse sans, toutefois, avoir mené de recherche quantitative. Enfin, de nombreux travaux ont pu démontré l'implication d'autres facteurs plus spécifiquement profibrosants tels le PDGF ou l'IGF-1 dans le développement de fibrose que ce soit dans des modèles animaux ou chez l'homme [168, 169, 203, 204].

Ces différents éléments, concernant le rôle du TGFb sur la prolifération fibroblastique dans le modèle de la pneumoconiose du mineur de charbon, apparaissent contradictoire

et demandent le développement d'approches nouvelles et notamment au niveau tissulaire à différents stades d'évolution du nodule silicotique.

A coté de ces activités pro ou anti-fibrosantes, le TGF β a aussi été décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires. En effet, le TGF β est capable d'agir à différents niveaux dans le développement d'une réaction inflammatoire. Gamble *et al* ont montré que le TGF β était capable de moduler l'infiltrat inflammatoire par inhibition de l'adhérence des leukocytes à la cellule endothéliale via une inhibition de l'expression de la E-Sélectine [168, 205-207]. D'autre part l'importance du TGF β a été soulignée par les résultats récents obtenus dans le modèle de souris déficiente en TGF β [208, 209]. Ces souris ont en effet développé spontanément une réaction inflammatoire multifocale avec de multiples infiltrations cellulaires. De plus en faveur de cette hypothèse, Dubois *et al* montrent que le TGF β est potentiellement inhibiteur de l'expression du récepteur pour l'interleukine-1 dont l'activité pro-inflammatoire a été clairement démontré [210]. Le TGF β est aussi capable d'induire la production par le monocyte de l'IL-1 receptor antagonist (IL-1RA)[211, 212], une molécule qui est capable de prévenir le développement de la fibrose induite par la silice chez la souris [108]. Ces différents éléments soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle le TGF β serait responsable du relatif faible développement des processus inflammatoire observés dans le poumon de patients présentant une pneumoconiose simple par comparaison aux patients présentant une fibrose massive progressive.

En conclusion ce travail confirme l'implication du PDGF et de l'IGF-1 dans le développement de la fibrose pulmonaire chez les patients présentant une fibrose massive progressive. Toutefois, si le rôle exact du TGF β n'est pas clairement défini, les résultats, observés après exposition *in vitro* ou *in vivo* aux poussières de mines, apportent des éléments en faveur d'un effet préventif du TGF β pour les 2 aspects caractérisants la pneumoconiose du mineur de charbon : le processus de fibrose pulmonaire et la réaction inflammatoire.

**REPONSE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE DANS UNE SITUATION
DE STIMULATION INFLAMMATOIRE CHRONIQUE**

**ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MOLECULES D'ADHESION
ET DES MECANISMES D'ADHERENCE DES MONOCYTES
A LA CELLULE ENDOTHELIALE**

**APPLICATION AU MODELE DE
LA PNEUMOCONIOSE DU MINEUR DE CHARBON**

INTRODUCTION

De nombreux désordres affectant l'appareil respiratoire, sont caractérisés par le développement d'une réaction inflammatoire chronique. Ainsi différents travaux décrivent l'accumulation de cellules immunitaires ou inflammatoires dans les tissus pulmonaires que ce soit au niveau bronchique, au niveau de l'interstitium pulmonaire ou au niveau de l'espace alvéolaire. Cet infiltrat peut être caractérisé par un afflux de lymphocytes, d'éosinophiles, de neutrophiles, de macrophages ou de mastocytes, le pourcentage et le nombre de chacun des types cellulaires variant d'une pathologie à une autre. Dans l'asthme chronique sévère, un infiltrat inflammatoire est couramment détecté par lavage bronchoalvéolaire [213, 214] ou au niveau de biopsies bronchiques [215-217]. En ce qui concerne les pathologies affectant plus particulièrement l'interstitium pulmonaire, comme la fibrose idiopathique diffuse ou les pneumoconioses, des variations sensibles dans la composition de l'infiltrat alvéolaire (tant en nombre qu'en terme de pourcentage de chacune des populations) ont pu être démontrés [73, 123, 136, 137, 218]. Ainsi pour la Pneumoconiose du mineur de

charbon, la réaction inflammatoire se caractérise, au moins initialement, par le développement d'une alvéolite macrophagique, c'est à dire par un afflux massif et une augmentation sensible du pourcentage de macrophages au niveau alvéolaire.

Les mécanismes par lesquels apparaissent les lésions pulmonaires restent imparfaitement comprises. Le macrophage alvéolaire [79, 219], mais aussi d'autres types cellulaires comme le mastocytes [220, 221] semblent jouer un rôle clef dans la pathogénie de la réaction inflammatoire pulmonaire. Ainsi de nombreuses cytokines sécrétées par ces cellules sont capables d'initier ou de réguler une réaction inflammatoire, notamment le TNF. Plusieurs études ont rapporté une production locale de TNF, dérivé du macrophage dans différentes situations pathologiques [137, 222-225]. De façon identique, la production de TNF par le mastocyte a été démontré dans des modèles de réaction inflammatoire [220]. Comme nous l'avons développé dans un chapitre précédent le macrophage alvéolaire et le TNF jouent un rôle majeur dans le développement de la réaction inflammatoire qui caractérisent la pneumoconiose du mineur de charbon.

L'initiation et la propagation d'une réaction inflammatoire sont dépendant de la capacités des cellules inflammatoires d'accéder aux tissus péri-vasculaires [160-162, 226-228]. L'interaction entre l'endothélium vasculaire et les cellules de l'infiltrat est un des préalables à la migration des cellules du sang circulant vers le tissu inflammatoire [229, 230]. Différentes molécules, mises en évidence à la surface de la cellule endothéliale, jouent un rôle prépondérant dans cette interaction cellulaire (Tableau 11). Ces molécules d'adhésion cellulaire participent à l'adhérence mais aussi dans certain cas à la migration des cellules inflammatoires à travers l'endothélium vasculaire. Il a ainsi été démontré que l'adhésion des cellules inflammatoires à la cellule endothéliale implique l'expression de trois types principales molécules d'adhésion : la E-Sélectine (ELAM-1 : endothelial-leukocyte adhesion molecule-1)[231], l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)[232] et le VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)[233].

L'analyse de l'expression de ces molécules d'adhésion à la surface de la cellule endothéliale a démontré que cette expression est inductible par différentes cytokines proinflammatoires parmi lesquelles le TNF semble joué un rôle majeur. Toutefois l'analyse de l'expression de ces molécules d'adhésion n'a été réalisée qu'après une stimulation à court terme [234, 235]. Ce type de stimulation donne donc des informations sur le comportement de la cellule endothéliale dans une situation de réaction inflammatoire aiguë et ne reflète pas l'état d'activation de la cellule endothéliale dans une situation de réaction inflammatoire chronique.

L'activation des cellules de l'infiltrat au cours d'une réaction inflammatoire chronique est susceptible d'influencer la réponse de l'environnement tissulaire, et dans le cas qui nous intéresse sur la réponse de la cellule endothéliale, tout au long du développement de cette réponse chronique.

Dans les chapitres précédents nous avons pu démontré l'activation des macrophages alvéolaires des patients pneumoconiotiques. Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro* les effets de cette activité inflammatoire chronique au niveau de la cellule endothéliale. Toujours dans le même chapitre, nous avons montré l'activation de la cellule endothéliale (expression des messagers codant pour l'IL-6) dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive. Pour cette raison nous avons développé *in vitro* un modèle permettant de mimer une réaction inflammatoire chronique en nous intéressant au comportement de la cellule endothéliale face à une stimulation chronique inflammatoire, mimer par addition répétée de TNF. Le critère de mesure de la réponse de la cellule endothéliale étant l'expression des molécules d'adhésion, ICAM-1, E-Sélectine, VCAM-1 à sa surface.

Taleau 11 : Tableau récapitulatif des principales molécules d'adhésion exprimées par la cellule endothéliale (38, 220).

Molécules d'adhésion	Classification CD	Molécules exprimées par	Famille	Cinétique (maximum d'expression)	Expression modulée par	Ligands	Cellules exprimant le ligand
E-sélectine (ELAM-1)		cellule endothéliale	sélectine	4 H	IL-1, TNF	sialyl-Lewis ^x	neutrophile, monocyte
ICAM-1	CD 54	cellule endothéliale, lymphocyte, cellule épithéliale, monocyte, mastocyte, fibroblaste	immunoglobuline	24 H	IL-1, TNF, IFN, PAF	integrine β 2 : - LFA-1 : CD11a/CD18; - Mac-1 : CD11b/CD18 - p150/95 : CD11c/CD18	- leukocytes - cellules de la lignée myéloïde - cellules de la lignée myéloïde
ICAM-2		cellule endothéliale, monocyte, lymphocyte	immunoglobuline	constitutif ?	-	intégrine β 2 : - LFA-1	- leukocytes
VCAM-1		cellule endothéliale	immunoglobuline	6 H (TNF) 24 H (IL-4)	IL-1, IL-4, TNF	intégrine β 1 : - VLA-4 (CD49d-CD29)	Lymphocyte, monocyte
P-sélectine (GMP-140)	CD 62	cellule endothéliale, plaquette, fibroblaste	sélectine	quelques minutes	Histamine, SP, PAF, Thrombine	sialyl-Lewis ^x	plaquette, neutrophile, monocyte
PECAM-1	CD 31	cellule endothéliale, plaquette, monocyte, granulocyte	immunoglobuline	constitutif	-	PECAM ?	plaquette

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Réactifs

Le TNF- α humain recombinant est fourni par Genzyme. Les anticorps monoclonaux anti-ICAM-1 sont fournis par Immunotech, anti-E-Sélectine et anti-VCAM-1 par British Biotechnology. Ces trois anticorps sont de type IgG1. Pour l'ELISA sur cellules endothéliales, les anticorps de lapin anti-IgG de souris sont fournis par Institut Pasteur Production.

Culture des cellules endothéliales humaines.

Les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) sont isolées et maintenues en culture selon la technique décrites par Jaffe *et al* [236]. Les cellules endothéliales sont recueillies après digestion par la collagénase (Type II, Sigma, 2mg/ml). Les cellules issues de cordons différents sont cultivées séparément à 37°C sous 5% de CO₂ dans un milieu pour cellules endothéliales : RPMI 1640 avec glutamine (Gibco) complété par 20% de sérum de veau foetal décomplémenté (Gibco), 10 mg/ml de héparinate de sodium (Roche), et 25 mg/ml de ECGS (endothelial cell growth supplement, Sigma). Au second passage, les cellules sont trypsinisées et réparties en plaques de culture 96 puits (fonds plats, préalablement coatées à la gélatine) en vue de leur stimulation. Pour les expériences d'adhérence cellulaire, les HUVEC sont réparties en plaques de culture 24 puits, puis cultivées jusqu'à confluence.

Conditions de stimulation des cellules endothéliales par le TNF.

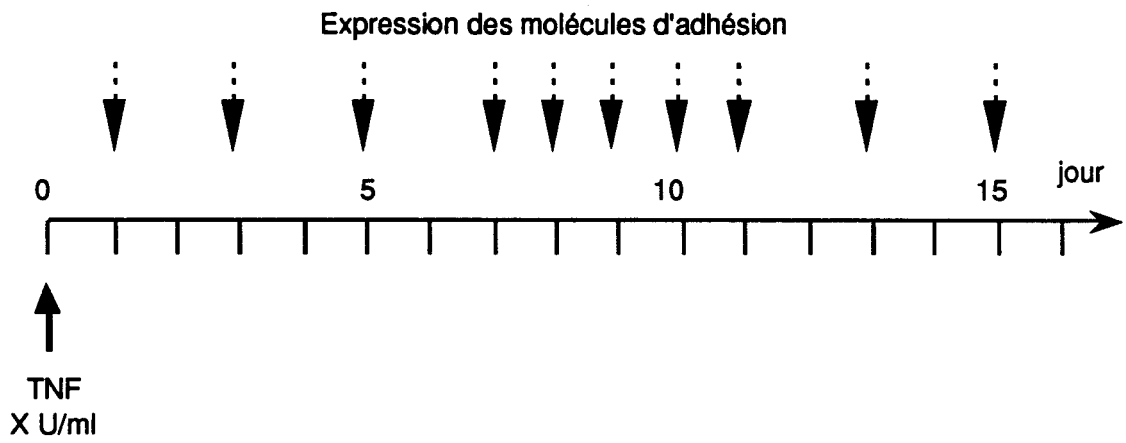
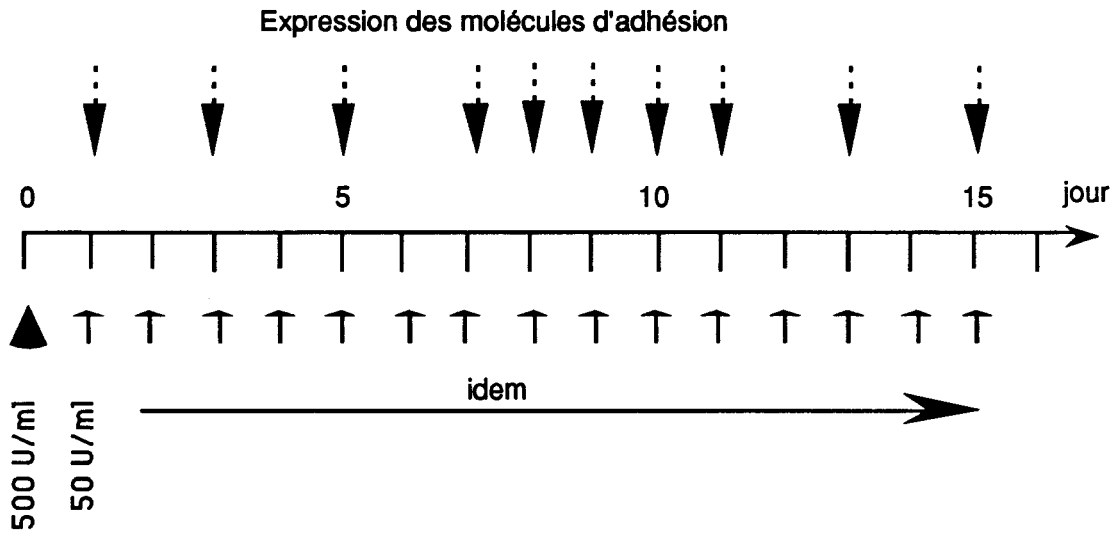
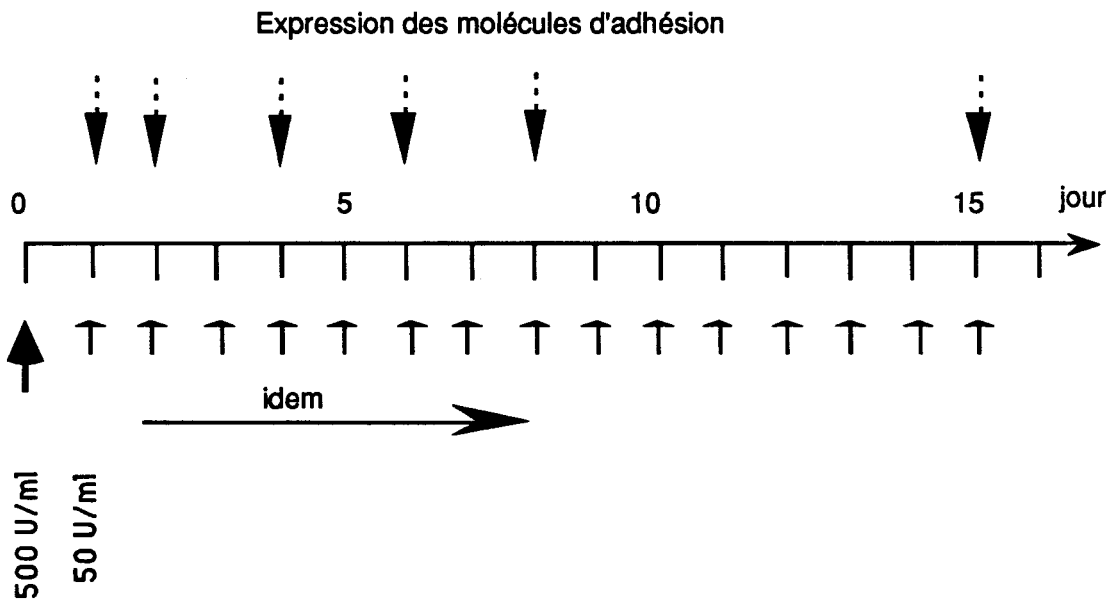
Pour analyser la réponse de la cellule endothéliale à un stimulus inflammatoire aiguë (1 dose unique de TNF), il était nécessaire d'évaluer le comportement de la cellule endothéliale en prenant en compte le même délai de culture que dans une situation de réaction inflammatoire chronique (RIC). Pour cette raison les délais de culture ont été

définis pour permettre l'évaluation de la réponse endothéliale selon chacun des modes de stimulation, dans des conditions de culture et de viabilité cellulaire équivalentes.

Dans le modèle de réactions inflammatoires aiguës (RIA), après une stimulation par une dose élevée et unique de TNF (concentration finale de 1000 U/ml), l'expression des molécules d'adhésion est suivie jusqu'au 15^{ème} jour de culture par une technique de type ELISA sur cellules endothéliales (Fig 13a). Pour le modèle de réaction inflammatoire chronique (RIC), après une première addition de TNF (concentration finale : 500 U/ml), la chronicité de la stimulation est mimée par une addition répétée de TNF (50 U/ml par jour) (Fig 13).

Un troisième modèle de stimulation a été défini (Fig. 13b), le modèle de la réaction inflammatoire chronique discontinu (RIC discontinu). Ce modèle consiste en une première période de stimulation chronique de durée variable (1, 2, 4, 6, 8 jours) suivie d'une seconde période d'absence de stimulation par le TNF. L'expression des molécules d'adhésion est évaluée à la fin de la seconde période, donc au jour 15 de culture (Fig. 13c).

Figure 13 : Protocoles expérimentaux utilisés afin de mimer : (a) une réaction inflammatoire aiguë (RIA); stimulation par une dose unique de TNF. (b) une réaction inflammatoire chronique (RIC); stimulations répétées par de faibles doses de TNF. (c) une réaction inflammatoire chronique interrompue (RIC discontinu); une première période de stimulation par le TNF suivie d'une seconde sans addition du stimulus. La cinétique de réponse de la cellule endothéliale est suivie par l'évaluation de l'expression des molécules d'adhésion.

A: Modèle de réaction inflammatoire aigue**B: Modèle de réaction inflammatoire chronique, stimulation continue****C: Modèle de réaction inflammatoire chronique, stimulation discontinue**

ELISA sur cellule endothéliale

L'ELISA est réalisé sur cellules endothéliales fixées à la glutaraldehyde (0,05%, 10 min) selon la technique décrite par Pober *et al* [232]. Brièvement, les cellules fixées sont incubées durant 60 min dans 100 ml d'une solution d'anticorps anti-ICAM-1, anti-E-Sélectine (concentration finale de 0,4 mg/ml) ou anti-VCAM-1 (1 mg/ml). Les cellules sont lavées 4 fois en tampon PBE (PBS, BSA 1%, EDTA 5mM, pH 7,4) puis incubées pour une heure en présence d'anticorps de lapin anti-IgG de souris marqués à la peroxydase (concentration finale : 1/5000 v:v). La peroxydase est révélée par l'addition de 100 ml de tampon substrat (tampon citrate 0,1M, pH 5,5) contenant H₂O₂ et o-phénylène diamine (Sigma), la réaction est arrêtée par l'addition de 100 ml de H₂SO₄ 2N. La densité optique (DO) est mesurée à 492 nm. Toutes les conditions sont réalisées en triplicata. Les résultats sont dans certains cas exprimés en pourcentage d'augmentation de DO selon l'équation : $(A-B/B) \times 100$; A représente la DO en présence de TNF, B la DO en absence de stimulation.

A cause d'une certaine variation dans le niveau d'expression de base des molécules d'adhésion en fonction des lots de cellules endothéliales (par exemple : pour 9 lots de cellules endothéliales, l'expression de base moyenne était de $0,151 \pm 0,022$), nous présentons ici les résultats d'une expérience représentative prise parmi trois expériences successives. Toutefois l'amplitude de réponse reste comparable pour un même mode de stimulation (par exemple : pour 9 lots de cellules endothéliales, une stimulation par le TNF à la concentration de 200 U/ml induit une expression moyenne de l'ICAM-1 de 216 ± 32 %).

Adhérence de cellules U937 aux cellules endothéliales.

Le test d'adhérence est réalisé selon la technique décrite par Wallis *et al* [237]. Les cellules U937 sont marquées par du Chrome 51 (⁵¹Cr). Brièvement, les cellules sont incubées en présence de ⁵¹Cr (chromate de sodium, CEA)(1 mCi/10⁶ cellules) 1H à 37°C. Le marqueur, non incorporé par les cellules, est éliminé par 5 lavages en RPMI

1640. Les cellules marquées sont alors resuspendues en RPMI 1640, contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, à la concentration de 10^6 cellules/ml.

Le test d'adhérence est réalisé comme suit. Après activation, la culture de cellules endothéliales est lavée. $2,5 \times 10^6$ cellules U937 marquées sont mises en présence des cellules endothéliales à 37°C pendant 30 min. Les cellules U937 non adhérentes sont éliminées par lavage doux en RPMI. Les cellules sont alors lysées en Triton X100 (0,5 %) et un aliquote est prélevé pour comptage de la radioactivité (compteur gamma, LKB-Wallac). Le niveau d'adhérence des cellules U937 est exprimé par le taux de radioactivité resté attachée aux cellules endothéliales après lavages. Pour les tests d'inhibition, les cellules U937 et les cellules endothéliales sont préincubées en présence d'anticorps anti-molécules d'adhésion (anti-ICAM-1, anti-E-Sélectine, anti-CD18 : 1mg/ml; anti-VCAM-1 : 2 mg/ml) pendant 30 min. à 37°C.

Dosage du TNF

La concentration de TNF est évaluée par le test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules L929 (lignée de fibroblastes murins). L'activité biologique, estimée à partir d'une courbe standard, est égale à la quantité de TNF nécessaire à tuer 50 % d'une culture de 18 H de cellules L929 traitées à l'actinomycine D (1 mg/ml) en milieu RPMI 1640 avec glutamine contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté.

Détermination de la viabilité cellulaire.

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test colorimétrique au MTT selon la technique décrite par Mosmann *et al* [238]. Brièvement, 25 ml/puits d'une solution de MTT sont ajoutés à la fin de la culture puis les plaques sont incubées 4 H à 37°C. Les surnageants sont éliminés et les cristaux de MTT-Formazan sont dissout dans 200 ml de tampon de lyse (HCl 0,04 N en isopropanol). LA DO est mesurée à 570 nm avec une référence à 650 nm.

RESULTATS

Cinétique d'expression des molécules d'adhésion après une stimulation unique par le TNF : le modèle de la réaction inflammatoire aiguë (RIA).

Après addition d'une forte et unique dose de TNF (100 U/puits au jour 1; concentration finale : 1000 U/ml) l'expression de l'ICAM-1, de la E-Sélectine et du VCAM-1 a été explorée. Seule l'expression de l'ICAM-1 est largement augmentée (+443 %, Fig 14a), à 24 H, le niveau d'expression de la E-Sélectine est faible et équivalent au niveau de base (DO : $0,015 \pm 0,004$ avec le TNF comparé à $0,005 \pm 0,008$; Fig 14a). L'expression du VCAM-1, bien que significative, reste à un niveau faible (+143 %)(Fig 14a). Dans ces conditions de stimulation, la E-Sélectine et le VCAM-1 montrent leur maximum d'expression à respectivement 4 et 6 H d'incubation en présence de TNF. L'intensité d'expression de l'ICAM-1 est étroitement dépendant de la quantité de TNF ajouté (Fig 14b). L'analyse de la cinétique d'expression de l'ICAM-1 sur une période de 15 jours montre que celle-ci persiste à un niveau élevé durant 3 jours, puis retourne progressivement au niveau de base après 4 à 8 jours selon la quantité de TNF ajouté à la culture (Fig 14b). D'autre part la viabilité de la culture est maintenue tout au long des 15 jours et ne semble pas affectée par l'addition de TNF. La concentration résiduelle en TNF a de plus été évaluée dans les surnageants de culture des cellules endothéliales au moment de la mesure de l'expression des molécules d'adhésion et ce dans le cas d'une stimulation utilisant la plus forte concentration de TNF (concentration finale : 1000 U/ml). Ainsi une activité TNF est détectée à un niveau élevé (921 U/ml au jour 2) puis décroît progressivement jusqu'au jour 7. De plus il apparaît que l'expression de l'ICAM-1 est dépendant de la présence de TNF. En effet, la diminution de l'expression de l'ICAM-1 est précédée d'environ 24 H de la réduction parallèle de l'activité TNF résiduelle dans les surnageants de cellules endothéliales.

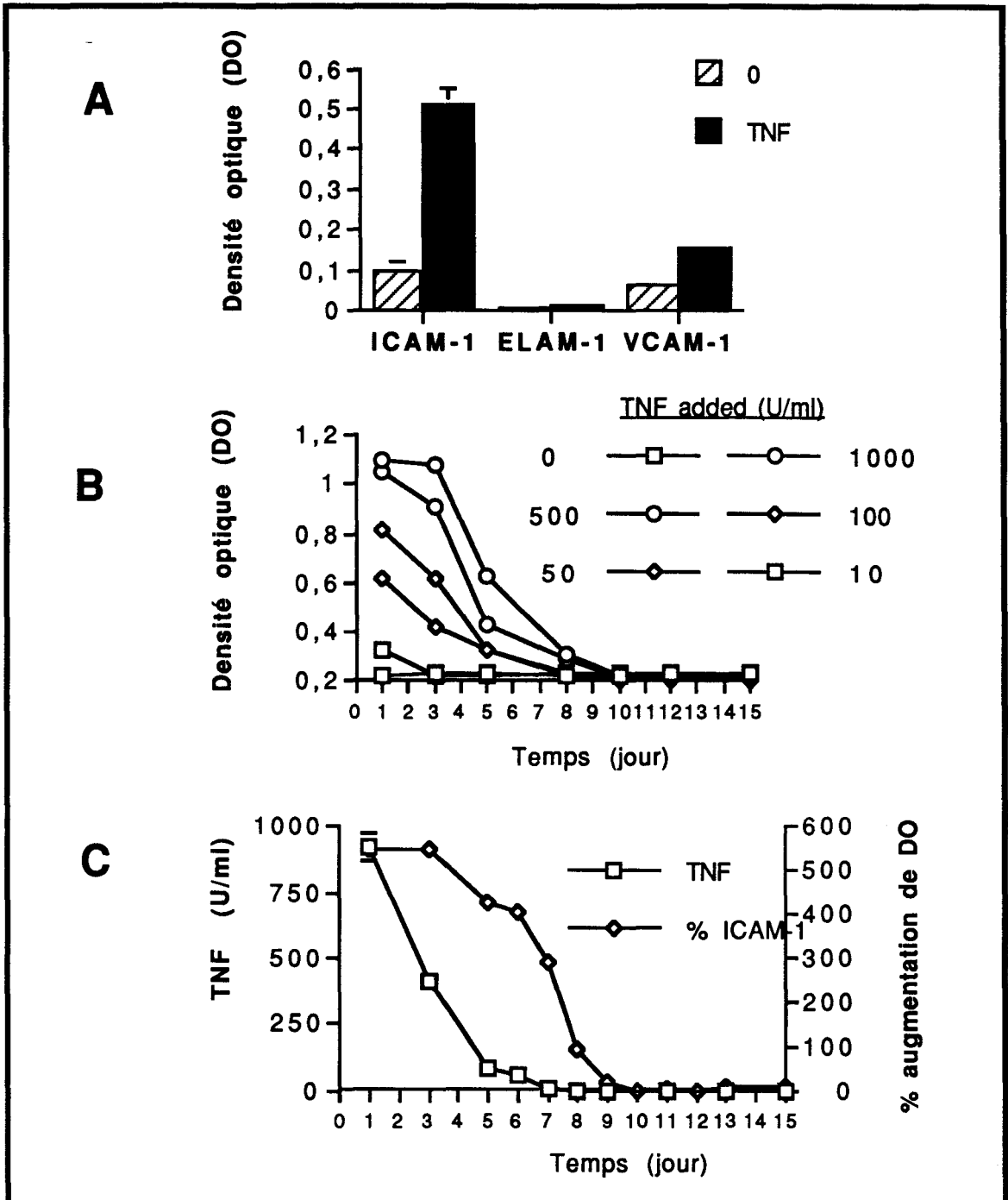


Figure 14 : Modulation de l'expression de l'ICAM-1, de la E-Sélectin (ELAM-1) et du VCAM-1 par la cellule endothéliale dans le modèle de réaction inflammatoire aiguë. (a) Expression des molécules d'adhésion 24 H après l'addition de TNF (1000 U/ml). (b) cinétique d'expression des molécules d'adhésion après stimulation par des quantités variables de TNF (0 à 1000 U/ml). (c) Evaluation de l'activité TNF résiduelle dans les surnageants en parallèle avec l'expression de l'ICAM-1 exprimée en pourcentage d'augmentation de DO par rapport au control non stimulé.

Cinétique d'expression des molécules d'adhésion après une stimulation répétée par le TNF : le modèle de la réaction inflammatoire chronique (RIC).

Par comparaison au modèle de RIA, et connaissant la cinétique d'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, il est possible d'apprécier la réponse de la cellule endothéliale dans une situation de réaction inflammatoire chronique. Une stimulation quotidienne de la culture par des doses faibles mais répétées de TNF (50 U/ml/jour) maintient l'expression de l'ICAM-1 à un niveau élevé (Fig 15a). Au contraire, l'expression de la E-Sélectine et du VCAM-1 n'est plus détectée après 3 jours (Fig 15a). Au jour 1, l'expression de l'ICAM-1 est similaire à celle observée après une stimulation unique par la même concentration de TNF (500 U/ml)(modèle de RIC jour 1 : +243 % (Fig 15a); modèle de RIA jour 1 : 262 % (Fig 15b)). Après stimulations répétées par le TNF, l'expression de l'ICAM-1 augmente pour atteindre un plateau qui est maintenu jusqu'au jour 15 (+515 % au jour 15). L'activité TNF résiduelle diminue dans les surnageants de culture jusqu'au jour 8 (depuis 304 ± 33 U/ml à la limite de sensibilité de la technique). Aucune activité TNF n'est détectée après le huitième jour malgré l'addition quotidienne de TNF (addition chaque jour de 50 U/ml). De façon intéressante dans la même période d'absence d'activité TNF résiduelle, il y a persistance de l'expression de l'ICAM-1 (Fig 15b). Le test colorimétrique au MTT confirme que la durée de la culture ainsi que l'addition de TNF n'affectent pas la viabilité des cellules endothéliales.

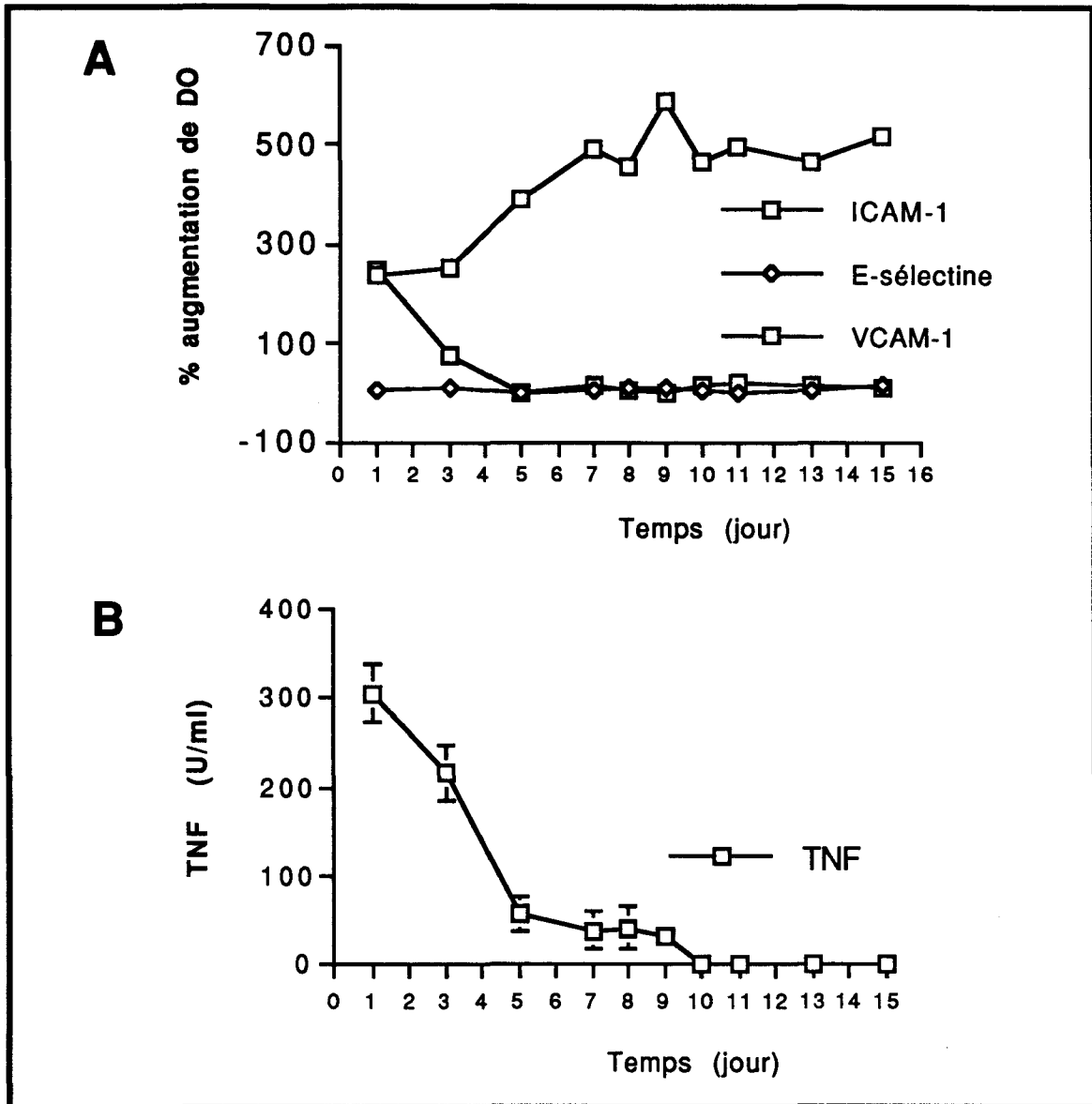


Figure 15 : Modulation de l'expression de l'ICAM-1, de la E-Sélectin (ELAM-1) et du VCAM-1 par la cellule endothéliale dans le modèle de réaction inflammatoire chronique. (a) expression des molécules d'adhésion après addition répétée de quantités faibles de TNF (50 U/ml). (b) Evaluation de l'activité TNF résiduelle dans les surnageants de culture.

Cinétique d'expression des molécules d'adhésion dans le cadre d'une réaction inflammatoire chronique interrompue.

En parallèle du modèle de RIC, une troisième cinétique de stimulation a été définie : le modèle de la réaction inflammatoire discontinue (Fig 13c). Par ce modèle, nous évaluons le rôle de l'addition répétée de TNF dans la persistance de l'expression de l'ICAM-1 tout au long de la culture malgré l'absence d'activité TNF résiduelle détectable après le huitième jour. Dans ces conditions, une expression de l'ICAM-1

persiste 8 jours après l'arrêt de stimulation chronique. Cette expression est similaire à celle observée dans des conditions de stimulation continue (RIC discontinue jour 15 : +142 %; RIC continue jour 15 : +145 %)(Tableau 12). De plus il apparaît que cette expression est maintenu à condition que la cellule ait été stimulé au moins durant 6 jours (durée de la première période du modèle de RIC discontinue).

Tableau 12 : Evaluation parallèle de l'expression de l'ICAM-1 dans les 2 modèles de stimulation chronique : RIC et RIC discontinue.

Modèle de stimulation	Durée de la première période du modèle RIC discontinue	% augmentation de DO °
RIC		145
RIC discontinue *	1	47
	2	36
	4	95
	6	127
	8	142

* : Ce modèle consiste en une première période variable de stimulation chronique, suivie d'une période de 8 jours de non stimulation.

° : Dans les 2 modèle, l'expression de l'ICAM-1 est évaluée au jour 15.

L'expression de l'ICAM-1 est en relation avec une augmentation de l'adhérence des cellules U937 à la cellule endothéliale.

Afin de tester la fonctionnalité des molécules d'adhésion détectées à la surface de la cellule endothéliale, l'adhérence des cellules U937 (une lignée de cellule de type monocyte) a été évaluée. Pour les deux modèles de stimulation, une relation directe est observée entre l'adhérence des U937 à la cellule endothéliale et l'expression des molécules d'adhésion (Fig 16a). Après examen microscopique, les cellules U937 apparaissent toujours liées aux cellules endothéliales, et il n'est observé aucune fixation non spécifique sur le plastique. La préincubation des cellules endothéliales avec un anticorps monoclonal anti-ICAM-1 tout comme avec un anti-CD18, annule la capacité des U937 d'adhérer au tapis endothélial. De plus l'incubation avec un anti-E-Sélectine comme avec un anti-VCAM-1 ne conduit pas à de variation significative de l'adhérence des U937 à la cellule endothéliale (Fig 16b).

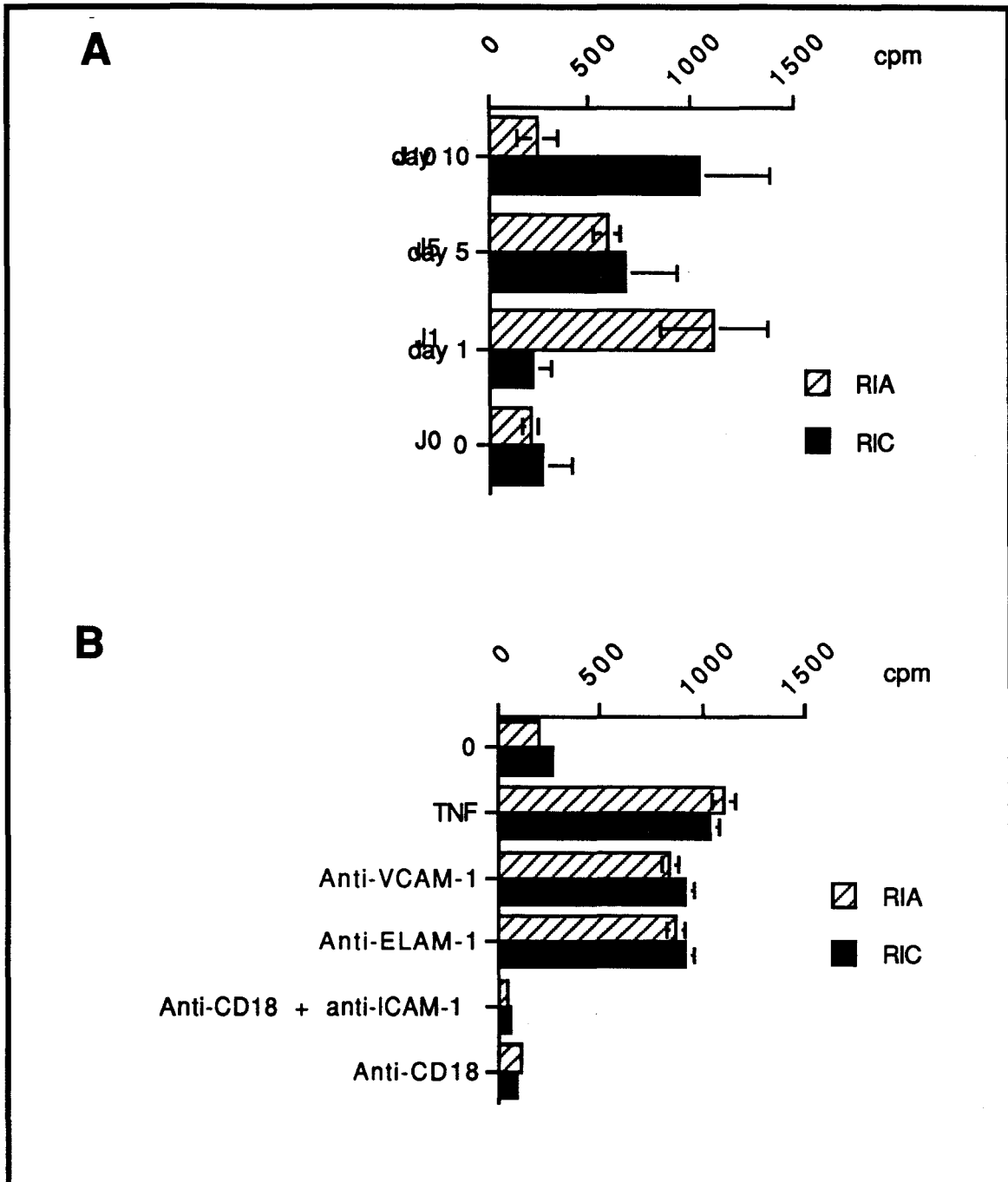


Figure 16 : Analyse de l'adhérence des cellules U937 aux cellules endothéliales. (a) Adhérence des U937 après stimulation des cellules endothéliales suivant les 2 modèles de réaction inflammatoire (RIA ou RIC). Les résultats sont exprimés en fonction du taux de radioactivité restant après lavages. (b) inhibition de l'adhérence par les anticorps monoclonaux anti-molécules d'adhésion. Les tests d'inhibition sont réalisés pour les temps pour lesquelles l'adhérence est la plus forte (jour 15 dans le modèle de RIC, jour 1 dans le modèle de RIA).

DISCUSSION

La stimulation de la cellule endothéliale par des médiateurs immunologiques ou inflammatoires tels que le TNF, l'interféron γ ou l'interleukine-4 conduit à une augmentation de l'adhérence des leucocytes. Cette adhérence est médiée par l'expression de trois principales molécules d'adhésion à la surface de la cellule endothéliale : la E-Sélectine (ou ELAM-1), l'ICAM-1 ou le VCAM-1 (Tableau 11). Les principales informations concernant l'expression des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire ont été obtenues dans des conditions expérimentales mimant *in vitro* une réaction inflammatoire aiguë.

Dans les modèles expérimentaux proposés dans ce travail, nous avons comparé 2 modes de stimulation. Le modèle de réaction inflammatoire aiguë (RIA) consiste en une stimulation unique par une dose élevée de TNF. Le modèle de réaction inflammatoire chronique (RIC) consiste en une stimulation répétée par de faible dose de TNF. Ce modèle nous a permis de reproduire *in vitro* les conditions de chronicité d'une réaction inflammatoire. Il nous a ainsi permis de tester le comportement de la cellule endothéliale face à une stimulation répétée par le TNF. Les paramètres d'évaluation de la réponse de la cellule endothéliale ont été l'expression des molécules d'adhésion : la E-Sélectine, l'ICAM-1 et le VCAM-1.

Les résultats montrent que l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion suite à une stimulation chronique est limitée à l'ICAM-1. Le niveau d'expression de l'ICAM-1 apparaît plus élevé que celui observé après une stimulation aiguë. De plus cette expression persiste tout au long de la culture pour atteindre un niveau stable. Cette expression persistante est obtenue après l'addition quotidienne de quantité faible de TNF. Si cette stimulation est stoppée, un niveau élevé d'expression de l'ICAM-1 peut être observé jusque l'arrêt de la culture (15 jours dans notre modèle de RIC) à condition que les cellules endothéliales aient été stimulées de façon chronique durant un délai d'au moins 6 jours.

D'autre part, il faut noter l'absence d'expression de la E-Sélectine et du VCAM-1 durant cette stimulation chronique.

Afin d'expliquer ce phénomène différentes hypothèses peuvent être retenues. Ainsi Voraberger *et al* démontrent que l'augmentation d'expression de l'ICAM-1 induite par le TNF est contrôlée au niveau transcriptionnel [239]. Ainsi des motifs de séquence spécifique pour différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gène de l'ICAM-1 ont été décrits (Fig 17), une d'entre-elles fonctionnant en tant que "silencer element" : le site AP-3.

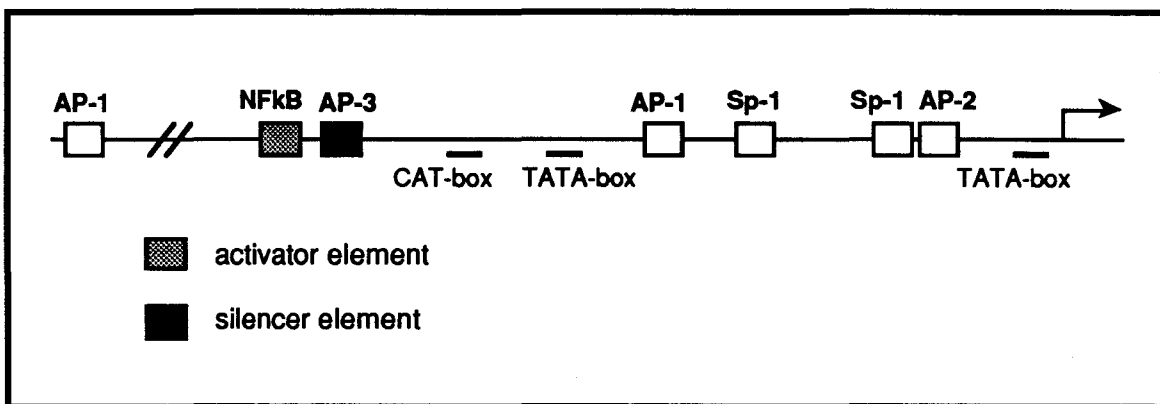


Figure 17 : Schéma de la région 5' du gène de l'ICAM-1 montrant la position des motifs de séquence spécifique de différents facteurs de transcription. Le site NFkB fonctionnerait comme "activator element", le site AP-3 comme "silencer element".

La persistance de l'expression de l'ICAM-1 pourrait s'expliquer par une inhibition de l'interaction entre ce "silencer element" et son facteur spécifique. Une autre explication pourrait être due à la stabilisation de l'interaction NFkB et sa séquence spécifique située juste en amont de AP3; créant ainsi un encombrement stérique pour l'activité "silencer".

Une autre hypothèse concernant l'expression de l'ICAM-1 induite par le TNF mais aussi l'absence de la E-Sélectine et du VCAM-1 implique une régulation dépendante du taux intracellulaire en AMP cyclique (AMPc). En effet Pober *et al* ont récemment rapporté que des taux élevés d'AMPc intracellulaire étaient capables d'inhiber la synthèse et l'expression induites par le TNF de la E-Sélectine et du VCAM-1 mais non celle de l'ICAM-1 [240]. De plus leurs observations démontrent que l'inhibition est

d'autant plus forte que les doses de TNF sont faibles. Cela cadre parfaitement avec notre observation dans le modèle de RIC montrant une forte expression de l'ICAM-1, en présence de quantité faible voir nulle de TNF, et une absence d'expression des 2 autres molécules d'adhésion : la E-Sélectine et le VCAM-1.

Dans un second temps, la capacité d'adhérence de la cellule endothéliale pour une population de monocyte a été analysée afin de vérifier la fonctionnalité des molécules d'adhésion dans un contexte de stimulation chronique. L'adhérence de cellules U937 (lignée de cellules de type monocyte) est directement reliée à l'expression de l'ICAM-1. D'autre part, les cellules U937 adhèrent par un mécanisme impliquant une interaction LFA-1/ICAM-1. En effet, l'adhérence est inhibée de façon similaire par des anticorps anti-ICAM-1 ou anti-CD18. L'adhérence des U937 par un mécanisme autre peut être écarté, en tout cas dans notre modèle, l'inhibition de l'adhérence par des anticorps anti-E-Sélectine ou anti-VCAM-1 restant non significative.

De notre modèle de réaction inflammatoire chronique, il apparaît donc qu'une sécrétion faible mais durable de cytokines, et notamment de TNF, est capable d'activer de façon chronique l'endothélium vasculaire, et en conséquence de faciliter l'adhésion cellulaire par un mécanisme ICAM-1/LFA-1 dépendant et la migration dans les tissus correspondants.

L'interaction VCAM-1/VLA-4 est impliquée dans l'adhérence et la migration des lymphocytes T et des éosinophiles [233, 241, 242]. L'interaction E-Sélectine/sialyl Lewis "x" est impliquée dans l'adhérence et la migration des neutrophiles [243, 244]. Ces interactions apparaissent donc plus particulièrement impliquées dans la sélection cellulaire conduisant à l'accumulation de certaines populations cellulaires dans les tissus impliqués. Par contre l'ICAM-1, par son interaction avec le LFA-1 qui est présent à la surface de tous les leukocytes, est impliqué dans l'adhérence et la migration transvasculaire de tous les leukocytes [241, 243, 245] et notamment des monocytes/macrophages [237, 246].

Dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon, une expression persistante de l'ICAM-1 à la surface de la cellule endothéliale, même en présence de quantité faible

voir nulle de TNF, permettrait d'expliquer cette afflux massif de macrophage au niveau alvéolaire caractéristique de l'alvéolite macrophagique rencontré dans le poumon pneumoconiotique.

Cette hypothèse est supportée par une étude récente de Piguet *et al* [247]. Il démontre que le traitement de souris exposé à la silice par un anticorps anti-CD11 prévient le développement de la fibrose induite par la silice. Ce travail confirme ainsi l'importance des molécules d'adhésion, en particulier la voie d'adhésion ICAM-1/LFA-1, dans le développement de la réaction inflammatoire et fibrosante initialisé par le TNF dans ce modèle murin d'exposition à la silice [106].

Toutefois, le TNF n'est qu'une des nombreuses cytokines participant à un réseau complexe responsable de l'inflammation pulmonaire. Au niveau de la cellule endothéliale, d'autres cytokines comme l'IL-1, l'IL-4 ou l'IFN γ sont capable d'induire l'expression des molécules d'adhésion, chacune d'elles étant responsable d'un profil spécifique d'expression des molécules d'adhésion [160, 228, 230]. De plus d'autres mécanismes tels que l'expression de facteurs chimioattractants, sont susceptible de moduler le recrutement des cellules inflammatoires (Tableau 13)[119, 120, 156-159, 248], la combinaison de ces différents mécanismes pouvant influencer le type d'infiltrat inflammatoire observé dans les différentes pathologies inflammatoires chroniques. De plus une étude a récemment démontré le rôle d'un facteur chimiotactique sur l'activation des monocytes (expression de molécules d'adhésion et sécrétion de cytokines) [248].

En conclusion, ce modèle de réaction inflammatoire chronique *in vitro*, que nous décrivons ici, peut amener de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes régulant l'activité endothéliale et les mécanismes de recrutement des populations cellulaires infiltrantes dans une situations de réaction inflammatoire chronique telle qu'elle peut être observée dans la pneumoconiose du mineur de charbon.

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des différents facteurs chimioattractants susceptible d'influencer le type d'infiltrat inflammatoire.

Famille	Facteurs chemoattractants	Cellules recrutées
Chémokines	Interleukine-8	neutrophile lymphocyte
	PF4	neutrophile monocyte
	RANTES	monocyte lymphocyte T
	MIP-1a	lymphocyte T CD8+ lymphocyte B
	MIP-1b	lymphocyte T monocyte ?
	MCP-1	monocyte
Lipides	PAF	neutrophile
	LTB4	neutrophile monocyte
Autres	proteines du complément	neutrophile
	Formyl peptide	neutrophile monocyte

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION GENERALE

Dans de nombreuses pathologies inflammatoires et/ou fibrosantes affectant le tissu pulmonaire, des régulations aberrantes de l'expression des cytokines et/ou de leurs récepteurs ont pu être démontrées. Certaines de ces cytokines ont ainsi la capacité de stimuler *in vitro* les phénomènes observés au cours des réactions inflammatoires et fibrosantes au niveau pulmonaire :

- attraction et activation fonctionnelle des cellules de l'alvéolite
- attraction et activation fonctionnelle des fibroblastes
- prolifération des fibroblastes.

Dans les précédents chapitres de ce travail nous avons décrit l'implication d'un certain nombre de ces facteurs dans le développement des lésions pulmonaires rencontrées chez les patients présentant une pneumoconiose du mineur de charbon. Cette étude nous a permis d'identifier 5 cytokines ayant un rôle potentiel : TNF, IL-6, PDGF, IGF-1 et TGFb. L'étude des activités sécrétoires des macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques pour ces 5 cytokines montre :

- une production accrue de TNF et IL-6 par les macrophages alvéolaires de patients présentant une fibrose massive progressive par comparaison aux patients présentant une pneumoconiose simple ou aux sujets témoins.

- une sécrétion et une expression des ARN messagers codant pour le TNF et l'IL-6 dans le poumon pneumoconiotique.

- une relation directe entre activation macrophagique et présence de particules de poussière de mine intracellulaire, conduisant à une sécrétion possible des 5 cytokines étudiées (démontré *in vivo* pour TNF et IL-6; *in vitro* pour le PDGF, IGF-1, TGFb).

- une activation des cellules endothéliales dans le poumon pneumoconiotique mise en évidence par l'expression des messagers codant pour l'IL-6.

- une production accrue de PDGF et IGF-1 par les macrophages alvéolaires de patients présentant une fibrose massive progressive par comparaison aux patients présentant une pneumoconiose simple ou aux sujets témoins.

- un profil inverse de sécrétion du TGF β qui voit sa production augmentée par les macrophages de patients présentant une pneumoconiose simple.

- une production de ces trois facteurs dans le poumon pneumoconiotique qui est suggérée par leur détection dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire.

Une autre partie de notre travail nous a permis d'évaluer *in vitro* le rôle de 2 de ces médiateurs macrophagiques sur le comportement de deux populations cellulaires présentes dans l'environnement alvéolaire. Ainsi nous avons étudié l'action du TNF et du TGF β sur la cellule endothéliale et le fibroblaste respectivement. Nous avons pu démontrer que :

- le TGF β peut avoir une activité de régulation des fonctions fibroblastiques. En effet nous démontrons que, selon la concentration, le TGF β est capable de stimuler ou d'inhiber la prolifération fibroblastique.

- le TNF est capable d'induire une phase de conditionnement de la cellule endothéliale qui conduit à une expression persistante d'une molécule d'adhésion (l'ICAM-1) en absence de stimulation inflammatoire.

Les dysfonctions macrophagiques observées, ainsi que les observations faites sur le comportement des deux populations cellulaires présentes dans l'environnement alvéolaire (la cellule endothéliale et le fibroblaste), permettent de mieux comprendre les mécanismes préjudiciables au développement des lésions pulmonaires observées chez les patients pneumoconiotiques. Ces différents éléments conduisent à l'établissement de nouvelles hypothèses pathogéniques, mais aussi aboutissent à différentes perspectives de recherche.

HYPOTHESES PATHOGENIQUES

Les données exposées dans les chapitres précédents, celles acquises précédemment dans le laboratoire (production de facteur chimiotactique du neutrophile NCF, de fibronectine et génération d'anions superoxydes), ainsi que les données rapportées dans la littérature, permettent de dresser une liste, bien que non exhaustive, des médiateurs potentiellement impliqués dans le développement des lésions pneumoconiotiques (Tableau 14).

A partir de ces données il devient possible de proposer un schéma physiopathologique de la pneumoconiose du mineur de charbon mais un schéma pathogénique des différents mécanismes lésionnels associés : lésions emphysémateuses, désordres immunologiques (Fig 18).

Dans ce schéma, le macrophage alvéolaire joue un rôle central. Après exposition aux poussières de mines, le macrophage alvéolaire empoussiéré va suivre 3 voies principales :

- la mort cellulaire due à la toxicité cellulaire des poussières de charbon
- la voie de l'épuration alvéolaire
- l'activation cellulaire conduisant à la sécrétion d'un large panel de médiateurs inflammatoires et fibrosants dont les activités vont conduire au développement des lésions pneumoconiotiques mais aussi au développement des lésions associées (lésions emphysémateuses, désordres immunologiques).

Par analogie avec les 3 grands mécanismes lésionnels caractérisants la pneumoconiose du mineur de charbon qui sont :

- une réaction inflammatoires caractérisée par une alvéolite macrophagique,
- le développement d'une fibrose pulmonaire,
- une bronchopathie chronique souvent associée à un emphysème,

nous allons maintenant développé les différentes hypothèses pathogéniques permettant d'expliquer le développement de ces processus inflammatoires et fibrosants.

Tableau 14 : Caractéristiques générales des médiateurs macrophagiques intervenant dans les mécanismes physiopathologiques de la pneumoconiose du mineur de charbon

Famille	Médiateurs	Principales fonctions
Interleukines	TNF	- initiation et régulation de la réaction inflammatoire - régulation de la réaction fibrosante (expression des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire)
	IL-6	- chimiotactisme et activation des lymphocytes
Facteurs de croissance	PDGF	- chimiotactisme et prolifération des fibroblastes
	IGF-1	- prolifération des fibroblastes
	TGF β	- régulation de la réaction inflammatoire - régulation de la réaction fibrosante (contrôle de la prolifération des fibroblastes, expression des protéines de la matrice extracellulaire)
	Fibronectine	- adhérence et prolifération des fibroblastes
Chémokines	IL-8	- chimiotactisme et activation des neutrophiles
	MCP-1	- chimiotactisme et activation des macrophages
	MIP-1 α	- chimiotactisme des lymphocytes
	MIP-1 β	- chimiotactisme des macrophages
Dérivés de l'acide arachidonique	LTB4	- régulation de l'activation des macrophages - chimiotactisme et activation des neutrophiles
	PGE2	- régulation de l'activation des macrophages - régulation de la prolifération des fibroblastes

Fibronectine : nous avons classé la fibronectine parmi les facteurs de croissance car son action sur les mécanismes de fibrogénèse s'apparente à celles des autres médiateurs de cette même classe.

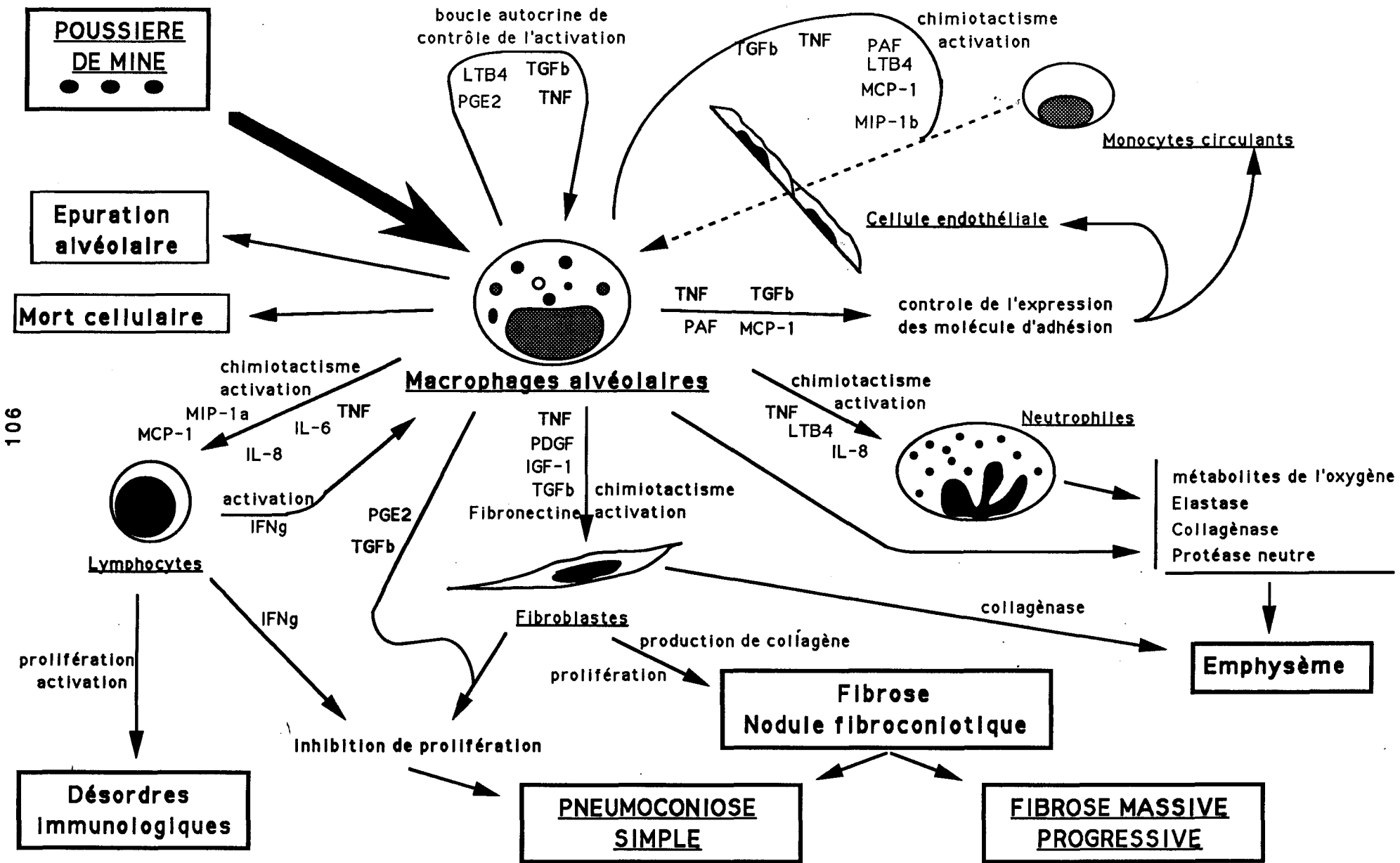


Figure XX : Schéma récapitulatif des interactions cellulaires entre les différents partenaires de la réaction inflammatoire et fibrosante observée au cours de la pneumoconiose du mineur de charbon

INITIATION, PERENNISATION ET REGULATION DE LA REACTION

INFLAMMATOIRE

L'activation du macrophage alvéolaire par les poussières de charbon conduit à la production d'un large panel de médiateurs inflammatoires (métabolites de l'oxygène, eicosanoides, monokines, chémokines). Cette activation cellulaire conduit donc à l'initiation d'une réaction inflammatoire caractérisée par un afflux de cellules inflammatoires aboutissant à l'installation et à la pérennisation d'une alvéolite de type macrophagique.

Ainsi un certain nombre de médiateurs tels que : TNF, TGFb, PAF, LTB4, MCP-1 ou MIP-1b sont chimiotactiques pour le monocyte et participent donc au développement de la composante principalement macrophagique de l'alvéolite. D'autres médiateurs sont quant à eux chimiotactiques pour le neutrophile : TNF, LTB4, IL-8, ou pour le lymphocyte : TNF, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1a.

La pérennisation de cette réaction inflammatoire est le fait de 2 mécanismes principaux :

- d'une part un défaut de l'épuration du matériel coniotique qui conduit à une activation continue du macrophage alvéolaire exposés aux poussières de mine non évacuées.

- d'autre part une activation des cellules recrutées et résidentes par les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par le macrophage alvéolaire créant ainsi une boucle d' autocrine ou paracrine d'activation continue.

Un des mécanismes de régulation de ces processus inflammatoires correspond à la capacité de certains médiateurs macrophagiques de moduler l'activité fonctionnelle des cellules avoisinantes, comme du macrophage lui-même. Un exemple de populations cellulaires participant à ces processus inflammatoires est représenté par la cellule endothéliale. Elle joue un rôle clef dans le recrutement des cellules de l'infiltrat du fait de sa fonction de barrière entre les cellules inflammatoires présentes dans la

circulation périphérique et les sites de migration de ces cellules [161]. Elle peut répondre par l'expression de molécules d'adhésion cellulaire à sa surface qui vont permettre l'adhérence et la migration transvasculaire des populations cellulaires composant l'infiltrat alvéolaire (Cf partie XX) [160]. Elle est de plus capable de produire un certain nombre de facteurs chimiotactiques (IL-6, IL-8, MCP-1,...), participant ainsi à la pérennisation de l'alvéolite (Tableau 13).

Dans l'objectif de moduler cette réaction inflammatoire, les fonctions macrophagiques peuvent être régulées par les mêmes médiateurs que ceux sécrétés par le macrophage alvéolaire soit dans le sens d'une pérennisation de la réaction inflammatoire (TNF, TGFb, IL-6, LTB4), soit dans le sens d'une inhibition (TGFb, IL-6, PGE2). Ces mêmes produits macrophagiques peuvent en outre moduler l'activation des cellules environnantes.

Nous voyons donc que l'intervention des cytokines dans la régulation de la réaction inflammatoire est complexe et non encore complètement élucidée. Toutefois, de ce schéma, nous pouvons voir ressortir 2 facteurs : le TNF et le TGFb, potentiellement impliqués dans les différents mécanismes conduisant à l'état inflammatoire du tissu pulmonaire. Un troisième facteur : l'IL-6 semble avoir des effets antagonistes, nous en discuterons.

Le rôle central du TNF dans un modèle murin de silicose avait déjà été prouvé [106]. Dans ce travail nous confirmons son implication dans le développement des processus fibrosant caractérisant la pneumoconiose du mineur de charbon (Cf partie XX). Il jouerait un rôle central dans l'initiation et la pérennisation du processus inflammatoire.

Une seconde cytokine, le TGFb, semble jouer un rôle prépondérant. Ainsi en regard du profil de sécrétion du TNF par le macrophage alvéolaire, il apparaît un profil de sécrétion inverse pour le TGFb (Cf partie XX). Dans l'analyse des rôles respectifs, il apparaît que le TGFb serait susceptible d'exprimer des effets antagonistes par rapport au TNF, ou tout au moins serait-il capable d'exprimer les 2 activités : pro et anti-

inflammatoires. Le TGFb serait capable, selon le contexte moléculaire, d'exprimer (Cf partie XX) :

- une activité pro-inflammatoire (chimiotactique pour les monocytes/macrophages, activation du macrophage, induction de l'expression du TNF [189]).

- une activité anti-inflammatoire (modèle des souris déficientes en TGFb [209], inhibition de l'expression du récepteur pour l'IL-1 [210], inhibition de l'adhérence des leukocytes à la cellule endothéliale [205-207], induction de l'expression de l'IL-1 receptor antagonist [211, 212], désactivation du macrophage pouvant conduire à une diminution de production du TNF [249]).

En résumé, le TNF jouerait un rôle central dans le développement de la réaction inflammatoire observée dans le poumon de patient présentant une fibrose massive progressive. Par contre chez les patients présentant une pneumoconiose simple, l'activité anti-inflammatoire du TGFb produit en quantité accrue ainsi que la faible production de TNF (peut être le fait du TGFb) pourrait expliquer la faible amplitude de la réaction inflammatoire observée à ce degré de sévérité de la maladie pneumoconiotique.

Nous citons aussi le rôle potentiel d'un troisième facteur : l'IL-6 qui exprime aussi les deux type d'activité : pro- et anti-inflammatoire, tout comme le TGFb. Toutefois, le profil de concentration de l'IL-6 suit les degrés de sévérité de la réaction inflammatoire, l'IL-6 et le TNF sont exprimés de façon concomitantes. Dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon, l'activité anti-inflammatoire de l'IL-6 ne semble donc pas s'exprimer ou apparait masquer par la forte activité proinflammatoire du TNF, tout particulièrement chez les patients présentant une fibrose massive progressive. Toutefois, l'IL-6 pourrait constituer une réponse de l'organisme dans le contexte de la réaction inflammatoire exagérée observée à ce degré de sévérité de la maladie ([185]).

LES MECANISMES DE FIBROSE

Nous avons pu voir précédemment que l'exposition du macrophage alvéolaire aux poussières de mine stimulait la sécrétion d'un certain nombre de médiateurs capable de moduler l'activité fonctionnelle du fibroblaste. Les macrophages de patients pneumoconiotiques sont capable de produire : TNF, IL-6, PDGF, IGF-1 (Cf partie XX) mais aussi : Fibronectine, PGE2.

Le TNF et le TGFb ont une activité chimiotactiques pour les fibroblastes. La fibronectine va faciliter leur attachement à la matrice extracellulaire. Le TNF active les fonctions sécrétoires du fibroblastes mais aussi du macrophage, le TNF stimulant la production de PDGF et IGF-1 par les 2 types cellulaires. Le PDGF et l'IGF-1 ainsi produits vont stimuler la prolifération fibroblastique. Une autre activité du fibroblaste correspond à sa capacité à produire les constituants de la matrice extracellulaire (et notamment le collagène), cette production pouvant être modulée par l'ensemble des médiateurs précités.

Pris dans leur ensemble ces phénomènes vont conduire à une prolifération accrue des fibroblastes et à une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire, notamment dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive. Ces processus pouvant être focalisés au niveau de zone de dépôts importants de matières coniotiques, cela va aboutir à la formation de nodule fibroconiotique.

A ce stade de la discussion nous devons à nouveau souligner la dualité fonctionnelle du TGFb. Il peut en effet exprimer, selon la concentration, les activités pro ou anti-fibrosantes. A faible concentration, il stimule la prolifération fibroblastique, celle-ci étant inhiber à plus forte concentration [197, 198]. Toutefois cette dualité n'est pas observée pour la sécrétion de protéines de matrice (Cf partie XX) [163].

Nous pouvons maintenant dégagé 2 voies possibles dans le devenir de ce nodule fibroconiotique selon qu'il se développe une pneumoconiose simple ou une fibrose massive progressive.

Dans le schéma de développement d'une fibrose massive progressive, le profil de sécrétion des différentes cytokines (TNF, PDGF, IGF-1 élevés et TGFb faible) va permettre une stimulation de l'activité prolifératrice des fibroblastes et une stimulation de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire. Cela va aboutir à un grossissement des nodules et enfin à leur coalescence.

Dans le cas de la pneumoconiose simple, un profil inverse de sécrétion des médiateurs macrophagiques est observé (TNF, PDGF, IGF-1 faible et TGFb élevé). Dans ces conditions, 2 explications possibles peuvent être avancées pour expliquer le faible développement des processus fibrotiques :

- un effet inhibiteur exprimé par le TGFb sur la prolifération fibroblastique.
- un faible niveau de sécrétion des médiateurs profibrosants, pouvant résulter

d'un effet inhibiteur du TGFb.

Dans le but de s'opposer au développement des lésions fibrotiques, 3 autres médiateurs peuvent être impliqués. L'IL-6 et la PGE2 produit par les macrophages alvéolaires ou l'IFN γ produit par les lymphocytes présents dans l'infiltrat alvéolaire. L'IFN γ et la PGE2 sont deux médiateurs connus pour leurs activités anti-fibrosantes [250, 251]. Toutefois, à notre connaissance, ces 2 médiateurs ne semblent pas devoir être impliqués dans le déterminisme de la pneumoconiose simple ni dans celui de la fibrose massive progressive. Enfin l'IL-6 est capable de réguler l'accumulation de collagène *in vivo* [178].

En Conclusion

Le rôle clef du TNF avait été souligné par de nombreux auteurs. L'hypothèse physiopathologique posée après ces observations portait sur une expression anormalement élevée du TNF qui était responsable du développement de la fibrose massive progressive.

Après ces différentes observations, il apparaît que le TGFb semble jouer un rôle non négligeable dans le contrôle de la réaction inflammatoire et fibrosante consécutive à l'inhalation de poussières de mine. Nos résultats permettent d'avancer maintenant de

nouvelles hypothèses basées sur les propriétés biologiques importantes du TGFb. Celle-ci ne sont pas incompatibles avec la précédente, mais au contraire permettent d'intégrer les précédentes conclusions et de les expliquer.

Compte tenu des propriétés exprimées par le TGFb, nous pouvons aboutir à la conclusion que les différents états évolutifs de la pneumoconiose du mineur de charbon seraient influencer par la présence ou l'absence de production de TGFb.

I. Le développement d'une fibrose massive progressive serait dû à un défaut de sécrétion ou d'expression du gène codant pour le TGFb.

II. A l'opposé, le maintien au stade de pneumoconiose simple serait dû à la production accrue de TGFb qui jouerait ainsi un rôle inhibiteur de la prolifération fibroblastique.

III. En conclusion, le TGFβ jouerait un rôle protecteur vis-à-vis de la progression du processus fibrosant.

Toutefois la première hypothèse nous semble préférable au regard des observations réalisées chez les sujets sains concernant la sécrétion de TGFb. Ainsi Yamauchi *et al* décrit une sécrétion non négligeable de TGFb dans le poumon de sujets témoins [252]. Ce facteur aurait un effet de stabilisation des populations cellulaires structurales du poumon normal. De plus dans d'autres pathologies pulmonaires fibrosantes, il a été décrit une sécrétion faible de TGFb voir même inférieure à celle observée chez les sujets témoins [253]. Ces observations sont à rapprocher des données que nous avons obtenu pour notre population de patients présentant une fibrose idiopathique diffuse.

En nous replaçant dans le cadre de la maladie pneumoconiotique et en particulier dans la situation du poumon de patients présentant une pneumoconiose simple, la sécrétion de TGFb serait normale au regard de l'activation induite par l'exposition aux

poussières de mine. La faible sécrétion des autres facteurs serait le fait d'une activité inhibitrice du TGF β [249].

Nous avons vu en introduction que le développement des lésions pneumoconiotiques était sous le contrôle d'un ou de plusieurs facteurs individuels. Ces facteurs permettraient d'expliquer pourquoi un mineur développe une fibrose massive progressive bien qu'il soit soumis au même risque qu'un mineur développant une pneumoconiose simple. D'après le schéma physiopathologique que nous présentons ici, il semble que la capacité de sécrétion du TGF β puissent être un facteur individuel potentiel contrôlant le déterminisme pneumoconiose simple *versus* fibrose massive progressive.

L'INSTALLATION DES LÉSIONS EMPHYSEMATEUSES

La pneumoconiose du mineur de charbon peut se compliquer par le développement de lésions emphysemateuses.

Définition et pathogénie de l'emphysème.

L'emphysème est généralement défini comme un élargissement permanent des espaces alvéolaires accompagné d'une destruction protéolytique des parois alvéolaires [170-172]. Bien que dans la plupart des cas, l'emphysème soit associé avec une consommation de tabac exagérée, beaucoup de fumeurs ne développent pas de lésions emphysemateuses. Cela suggère donc l'implication d'autres facteurs responsables de l'augmentation de la susceptibilité de certains patients aux effets de la fumée de cigarette [254].

L'hypothèse principalement retenue concernant la physiopathologie de l'emphysème repose sur une perturbation de la balance protéase/antiprotéase (Tableau 15 et 16)[255, 256]. Spécifiquement, la perturbation de la balance Elastase

leukocytaire/ α 1-antitrypsine (α 1-AT) conduit à une inhibition de l'activité anti-protéolytique. A l'opposé le développement des lésions emphysémateuses pourrait être une conséquence des processus inflammatoires et de réparation impliquant les cellules de l'infiltrat. L'activation des cellules inflammatoires conduirait à une augmentation de l'expression des enzymes protéolytiques à activité élastolytique [254, 257]. Toutefois différentes études ont abouti à la conclusion que sous le terme d'emphysème différents processus pathogéniques pouvaient conduire aux lésions caractéristiques de cette pathologie [170-172, 254, 257].

Tableau 15 : Protéases exprimées par les cellules inflammatoires [258].

Protéases	Type	Origine cellulaire	Activité élastolytique
Elastase	Sérine	Neutrophile Macrophage	+
Protéinase 3	"	Neutrophile	+
Cathepsine G	"	Neutrophile	+ / -
Tryptase	"	Mastocyte	
Chymase	"	Mastocyte	
Plasminogen activator	"	Macrophage	?
Procollagénase	Métallo	Neutrophile	
Gélatinase	"	Neutrophile	
Collagénase 92-72 Kd	"	Macrophage	+
Stromélysine	"	Macrophage	
Collagénase interstitielle	"	Macrophage	
Cathepsine B	Cystéine	Macrophage	
Cathepsine L	"	Macrophage	+
Cathepsine S	"	Macrophage	+

Dans le laboratoire Wallaert *et al* ont démontré que chez les patients fumeurs emphysémateux la perturbation de la balance protéase/antiprotéase est due à l'inactivation oxydative du site actif de l' α 1-AT [254]. Ainsi cette inactivation serait due à une activation des cellules inflammatoires (macrophages alvéolaires) [259] ou résidentes (pneumocyte II) [260] conduisant à la génération de métabolites de l'oxygène. Cette inactivation oxydative du site actif de l' α 1-AT serait de plus potentialisée par la présence de myéloperoxydase générée lors du processus inflammatoire par l'activation des neutrophiles [259]. Il ressort donc que

l'inactivation de l'a1-AT n'est effective que lorsqu'il est des neutrophiles sont présents dans l'infiltrat inflammatoire (seuil évalué expérimentalement à environ 3% de la population cellulaire totale recueillie par lavage bronchoalvéolaire).

Tableau 16 : Anti-élastases pulmonaires [256].

Anti-élastases	Origine cellulaire	Cibles
a1-anti-trypsin	neutrophiles monocytes macrophages hépatocytes	Elastase leucocytaire Cathepsine L
a2-macroglobuline	monocytes macrophages hépatocytes	Metalloélastase Elastase leucocytaire
Inhibiteur bronchique	cellules épithéliales	Elastase leucocytaire
Cysteine-Pi	hépatocytes	Cathepsine L
TIMP	cellules endothéliales fibroblastes monocytes macrophages	Metalloélastase
MPI	macrophages	Elastase leucocytaire

Cysteine-Pi : cysteine protease inhibitor; TIMP : tissular inhibitor of metalloproteinase; MPI : monocyte proteinase inhibitor

Emphysème et Pneumoconiose du mineur de charbon

Bien qu'il soit observé une augmentation de l'activité élastolytiques dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de patients pneumoconiotiques [70], les différentes hypothèses développées ci-dessus ne semble pas pouvoir expliquer complètement de développement des lésions emphysémateuses. En effet la capacité des cellules de l'infiltrat inflammatoire, recueillies par lavage bronchoalvéolaire, d'inactiver l'a1-AT s'est avérée non significative (Wallaert *et al* résultats personnels, [261]). Bien que les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques expriment un métabolisme oxydatif élevé [123], l'inactivation de l'a1-AT reste ineffective. Une explication possible mais non vérifiée serait que l'infiltrat alvéolaire ne serait pas assez riche en neutrophile et donc en myéloperoxydase générée (Tableau 4).

L'hypothèse d'une perturbation de la balance élastase/a1-AT par inhibition de l'activité anti-élastolytique s'avérant non relevante dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon, certains auteurs s'appuient sur des hypothèses différentes pour expliquer le développement des lésions emphysémateuses. L'une d'elle repose sur une augmentation de l'expression d'autres enzymes protéolytiques à activité élastolytiques lors des processus inflammatoires rencontrés dans différentes pathologies (Tableau 15)[258, 262]. Une des principales enzymes mise en cause est la collagénase qui peut être produite par différentes cellules inflammatoires telles que les macrophages [166, 167]. Cette dernière hypothèse semble plus attractive du fait de la modulation possible de l'expression de cette enzyme par les médiateurs proinflammatoires. Ainsi il a été montré que le TGF β est susceptible d'induire l'expression de la collagénase par le macrophage [166] et par d'autres types cellulaires (cellule endothéliale, fibroblaste,...)[165]. D'autres travaux concernant le rôle du TNF dans la régulation de l'expression de la collagénase arrivent aux mêmes conclusions [167]. Ces données n'ont toutefois pas encore été vérifiées dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon.

Nous avons décrit le rôle central du macrophage dans la pathogénie de la pneumoconiose. De par sa capacité à sécréter différentes protéinases à activité élastolytiques, mais aussi leurs inhibiteurs spécifiques [256, 258], le macrophage alvéolaire est amené à jouer un rôle clef dans le développement des lésions emphysémateuses. En définitive, de la qualité et de la quantité des activités élastolytiques exprimées au sein des structures alvéolaires, dépendront la gravité de la lésion emphysémateuse. Nous trouvons donc ici une hypothèse de travail intéressante du fait que les deux médiateurs précités sont impliqués dans la physiopathologie des lésions pneumoconiotiques. L'expression du TNF est augmentée dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive. Le TGF β est augmenté chez les patients présentant une pneumoconiose simple. Nous trouvons donc un terrain favorable au développement d'un emphysème dans les 2 cas de figures.

DESORDRES IMMUNOLOGIQUES ET LEURS CONSEQUENCES

La pneumoconiose du mineur de charbon peut être liée à l'expression d'un type HLA particulier. Elle peut aussi se compliquer de processus autoimmuns qui sont le fait d'une activation lymphocytaire [55-59]. Nous avons ainsi pu montrer l'existence de stigmates d'autoimmunité chez les patients pneumoconiotiques (présence d'anticorps anti-fibroblaste et réactivité lymphocytaire vis-à-vis d'une structure fibroblastique augmentés chez les patients présentant une fibrose massive progressive). Toutefois nous n'avons pas d'évidences permettant de conclure entre cause ou conséquence du développement d'une fibrose massive progressive et l'apparition de ces désordres immunologiques. D'autre part l'alvéolite observée chez les patients pneumoconiotiques, bien que majoritairement de type macrophagique, conduit aussi à un afflux de lymphocytes au niveau alvéolaire. Cet afflux bien que peu important en pourcentage représente un nombre élevé de cellules présentes au niveau de l'alvéole.

La population lymphocytaire est augmentée et activée. Cela peut donc conduire à une production accrue de lymphokines. Les interactions entre lymphocytes et macrophages dans une situation immunologique ont été clairement établies et largement documentées [263]. Par contre dans les situations de fibrose pulmonaire, les relations entre ces 2 populations cellulaires reste moins évidentes. Dans un modèle expérimental de silicose, Rakesh *et al* ont récemment souligné la participation des lymphocytes dans la réponse du tissu pulmonaire à une exposition à la silice [264]. Ils démontre que les lymphocytes sont capables d'induire la sécrétion de facteurs de croissance pour les fibroblastes par des macrophages issus d'animaux exposés à la silice mais non à l'oxyde de titane. Ils suggèrent de plus le rôle de l'interféron g.

Récemment un travail de Brody *et al* semble tempéré ces conclusions [251]. En effet ils démontrent bien que l'IFNg est capable de stimuler la production de facteurs de croissance pour le fibroblaste et notamment le PDGF. Mais ils démontrent aussi que

l'IFN γ est inhibiteur de la prolifération fibroblastique. D'autre part l'IFN γ est aussi capable d'inhiber les fonctions sécrétoires du fibroblaste [163].

Dans le schéma pathogénique que nous présentons nous pouvons donc inclure l'IFN γ en tant que facteur profibrosant (induit la production de PDGF par le macrophage), mais aussi en tant que facteur inhibiteur de la prolifération fibroblastique. Nous ne pouvons toutefois pas l'impliquer en tant que facteur déterminant l'évolution de la pneumoconiose simple vers la fibrose massive progressive. Nous n'avons en effet aucun résultat définitif démontrant soit :

- une susceptibilité particulière des macrophages vis-à-vis de l'IFN γ ,**
- une activation augmentée des lymphocytes dans l'un ou l'autre stade évolutif**

de la maladie.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Utilisant les macrophages alvéolaires récoltés par lavage bronchoalvéolaire chez les patients pneumoconiotiques nous avons pu montrer l'existence de dysfonctions sécrétoires de ces cellules et l'expression accrue des gènes codant pour ces médiateurs. Différentes cytokines ont pu être identifiées (TNF, IL-6, PDGF, IGF-1, TGF β) et leur rôle dans le développement des lésions pneumoconiotiques a été précisé [265-269]. Cependant la libération de ces médiateurs ne résume pas la physiopathologie de la maladie. Comme pour l'exposé des hypothèses pathogéniques, les perspectives de recherche seront présentées successivement pour les 3 principaux mécanismes lésionnels rencontrés dans la pneumoconiose du mineur de charbon :

- analyse des mécanismes contrôlant l'afflux cellulaire au cours de la réaction inflammatoire
- analyse des co-facteurs, monokines et cytokines, intervenant dans la dysrégulation des fonctions fibroblastiques aboutissant au développement de la fibrose
- analyse des mécanismes biologiques favorisant le développement des lésions emphysémateuses.

INITIATION, PÉRENNISATION ET RÉGULATION DE LA RÉACTION INFLAMMATOIRE

La pneumoconiose est caractérisée par une alvéolite macrophagique, associée à une augmentation du nombre absolu des autres populations cellulaires : neutrophiles et lymphocytes.

Le fait couramment retenu permettant d'expliquer un afflux de cellules inflammatoires dans un site donné est une augmentation de l'activité chimiotactique des cellules résidentes pour ces populations inflammatoires. Certaines molécules impliquées dans le recrutement des cellules de l'infiltrat alvéolaire ont ainsi été décrites. Parmi celles-ci, les molécules de la famille des chémokines, l'IL-8, le MCP-1, le RANTES, les MIP-1a et MIP-1b, ont été décrites comme ayant une activité chimiotactique pour différentes populations cellulaires (Tableau 17) [119, 157-159].

Une approche possible des mécanismes du recrutement des cellules macrophagiques est l'étude de l'activité chimiotactique des surnageants de macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques pour les monocytes dans un système *in vitro*. L'étude de l'activité chimiotactique peut être aussi étendue aux liquides de lavage bronchoalvéolaire. Ce système biologique d'évaluation de l'activité chimiotactique devrait nous permettre d'identifier la ou les molécules impliquées dans le recrutement des monocytes au niveau alvéolaire et de déterminer la part effective de chacun de ces médiateurs.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des différents facteurs chémoattractants susceptibles d'influencer la composition de l'infiltrat inflammatoire.

Chemokines	Sources	Cellules recrutées
Interleukine-8	macrophage cellule endothéliale fibroblaste	neutrophile lymphocyte
RANTES	lymphocyte plaquette	monocyte lymphocyte T neutrophile
MIP-1a	lymphocyte macrophage fibroblaste	lymphocyte T CD8+ lymphocyte B neutrophile monocyte
MIP-1b	lymphocyte macrophage	lymphocyte T monocyte ?
MCP-1	macrophage cellule endothéliale fibroblaste	monocyte

D'or et déjà, un des facteurs chimiotactiques cités dans le Tableau 17 nous paraît intéressant de part sa spécificité vis-à-vis du monocyte : le MCP-1. Sa sécrétion par le macrophage alvéolaire activé a déjà été démontré dans quelques modèles [156, 157]. Le MCP-1 apparaît d'autant plus intéressant qu'il est capable de moduler l'activation du macrophages. Il est en effet capable d'augmenter la production de médiateurs proinflammatoires (IL-1 et IL-6 mais pas le TNF) par le macrophage et d'augmenter l'expression de molécules d'adhésion à la surface du macrophage [248]. Il est donc logique d'étudier l'expression du MCP-1 par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques. La sécrétion de MCP-1 par le macrophage alvéolaire sera évaluée par dosage de ce facteur dans les surnageants de culture. De plus, l'expression de ce facteur dans le poumon pneumoconiotique pourra être apprécié par sa détection dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire, ou par une étude au niveau tissulaire en immunohistochimie ou en hybridation *in situ*.

Une autre hypothèse expliquant l'accumulation de macrophages au niveau alvéolaire est la prolifération de ces cellules [270-273]. Bien que la prolifération des macrophages alvéolaires reste faible [273], elle a déjà été impliquée dans l'accumulation des macrophages dans différents modèles de réactions inflammatoires chroniques [270]. Récemment Rom *et al* ont suggéré le rôle d'un facteur de croissance pluripotent : l'IGF-1 dont ils démontrent la présence d'un récepteur spécifique à la surface du macrophage alvéolaire uniquement dans les situations où une prolifération cellulaire est observée [274]. D'autre part nous avons démontré une sécrétion accrue de ce même facteur : l'IGF-1 par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques . Dans ce contexte il est logique de supposer que les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques possèdent une activité prolifératrice accrue. La seconde partie du programme sera donc associée à l'étude de la prolifération des macrophages alvéolaires en réponse à une stimulation par les poussières de mine et ainsi qu'à l'étude des régulations possibles par les facteurs impliqués dans le développement de la pneumoconiose du mineur de charbon. La prolifération cellulaire nécessite l'effet additif de 2 signaux : un signal de compétence et un signal de

progression [186]. L'IGF-1 est décrit comme un facteur de progression [141]. L'étude des régulations possibles de l'activité prolifératrice des macrophages devrait donc nous permettre d'identifier le ou les facteurs de compétence (par exemple TNF ou TGF β ou encore d'autres facteurs de croissance : PDGF, M-CSF, ...).

Enfin, un dernier mécanisme possiblement responsable de l'accumulation des cellules inflammatoires au niveau alvéolaire fait appel aux molécules d'adhésion dans la régulation de la migration trans-endothéliale des cellules inflammatoires [110]. A cours du précédent contrat nous avons analysé *in vitro* le comportement de la cellule endothéliale dans une situation de réaction inflammatoire chronique. Dans ces conditions, la cellule endothéliale exprime de façon exclusive l'ICAM-1, molécule impliquée dans l'adhérence et la migration des cellules inflammatoires. Après ces observations, l'expression des différentes molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium vasculaire (ICAM-1, E-sélectine, VCAM-1) mais aussi l'expression des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules inflammatoires, seront analysées au niveau tissulaire.

Par ces différentes approches, nous devrions préciser le ou les mécanismes responsables chez le sujet pneumoconiotique de l'afflux de cellules inflammatoires vers le poumon et en particulier l'accumulation de monocytes au niveau alvéolaire.

LES MÉCANISMES DE FIBROSE

Les perspectives d'étude des mécanismes de fibrose chez les patients pneumoconiotiques peuvent être séparé en 3 parties :

- expression des ARN messagers spécifiques des médiateurs profibrosants par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques,
- approche *in vitro* de la modulation de l'expression /sécrétion des facteur de croissance et en particulier du TGF β ,

- analyse des coopérations entre macrophages alvéolaires et fibroblastes.

Expression des ARN messagers spécifiques des médiateurs profibrosants par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques

Dans le cadre des travaux que nous venons de présenter, nous avons étudié l'implication de trois médiateurs profibrosants : PDGF, IGF-1 et TGFb dans le développement de la pneumoconiose du mineur de charbon. Dans ce travail nous mettons en avant le rôle particulier du TGFb en tant que facteur susceptible de prévenir le développement de la fibrose massive progressive. Cette étude avait été menée par la mesure de la sécrétion spontanée de ces trois médiateurs par le macrophage alvéolaire.

De façon analogue à la démarche utilisée pour l'étude de l'expression des messagers spécifique du TNF et de l'IL-6, nous envisageons l'analyse de l'expression des ARN codant pour le PDGF, IGF-1 et TGFb par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques, mais aussi par les autres cellules du tissu pulmonaire (pneumocytes, fibroblastes, ...). Cette approche sera effectuée au niveau cellulaire et au niveau tissulaire, sur pièces de lobectomie de patients pneumoconiotiques. L'analyse au niveau tissulaire devrait nous permettre d'identifier les différentes sources cellulaires de ces facteurs autres que les macrophages alvéolaires.

Dans un second temps, l'expression des messagers spécifiques des mêmes facteurs : PDGF, IGF-1 et TGFb sera étudiée en fonction du tissu rencontrés et secondairement en fonction des types de lésions observées. Alors qu'il est observé une répartition potentiellement égale des particules minérales dans tout le poumon (supposant une répartition égale de la sécrétion des médiateurs dans tout le poumon) seules quelques zones se développent en nodules fibroconiotiques. Par une étude en hybridation *in situ*, il sera possible de déterminer si il y a expression préférentielle du PDGF et IGF-1 à proximité des zones de prolifération fibroblastique et une expression du TGFb en dehors de ces zones. Cette étude devrait nous permettre de mieux définir le rôle *in vivo* de chacun de ces médiateurs.

Approche in vitro de la modulation de l'expression et de la sécrétion des facteurs de croissance et en particulier du TGFb.

Nous avons débattu longuement du rôle particulier du TGFb dans la pathogénie de la pneumoconiose du mineur de charbon. Ce facteur serait susceptible de prévenir le développement d'une fibrose massive progressive. Il apparaît donc primordial de déterminer les facteurs qui vont réguler l'expression et la sécrétion du TGFb par les macrophages alvéolaires.

Pour cela différents axes de recherche seront développés faisant intervenir la charge en poussières de charbon ou encore les coopérations possibles entre lymphocytes et macrophages alvéolaires [263]. Ces différents axes de travail sont résumés dans la figure 19.

Concernant le premier point, nous avons démontré précédemment que le niveau d'expression de 2 médiateurs proinflammatoire : le TNF et l'IL-6 est en relation avec la charge des macrophages alvéolaires en particules minérales. Afin de préciser si la sécrétion de TGFb augmente avec le niveau d'activation du macrophage ou si à un certain niveau d'exposition il y a diminution de cette sécrétion, l'expression des ARN messagers codant pour le TGFb et sa sécrétion seront étudiés sur macrophages alvéolaires humains en présence de quantités croissantes de poussières de charbon, de silice ou d'oxyde de titane.

Dans un second temps, nous étudierons la modulation de sécrétion du TGFb par les macrophages alvéolaires sous l'effet de médiateurs lymphocytaires et en particulier l'Interferon g. L'IFNg est capable d'activer le macrophage [251]. Nous analyserons donc l'effet de l'IFNg sur l'expression des ARN messagers et la sécrétion de TGFb par les macrophages alvéolaires en recherchant la sensibilité des cellules de patients pneumoconiotiques à l'IFNg. Il sera de plus intéressant d'analyser le rôle de l'IFNg dans le modèle précédent d'exposition des macrophages à des doses croissantes de particules minérales.

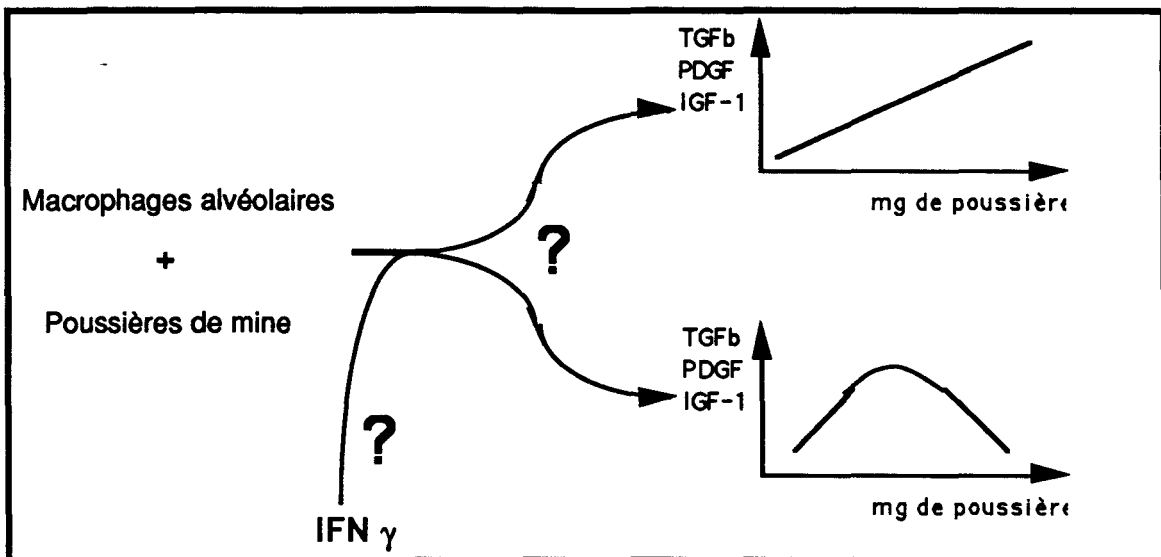


Figure 19 : résumé des trois axes d'étude de la production du TGF β

Dans la perspective où aucune de ces hypothèses de travail ne permette d'expliquer la faible sécrétion de TGF β observée chez les patients présentant une fibrose massive progressive, nous pouvons supposer que cette dysrégulation de l'expression du TGF β serait due à un dysfonctionnement du gène lui-même. Nous pouvons envisager un dysfonctionnement du promoteur de ce gène.

Analyse des coopérations entre macrophages alvéolaires et fibroblastes.

Les surnageants de macrophages de patients présentant une pneumoconiose simple sont capables d'inhiber la prolifération fibroblastique, du fait de concentration accrue en TGF β , alors que les surnageants de patients présentant une fibrose massive progressive ont un effet inverse dû à la sécrétion importante de PDGF et IGF-1.

Dans les phénomènes de fibrose pulmonaire, une augmentation de la synthèse de collagène total est observée. L'analyse des types de collagène sécrétés (notamment type I et III par rapport au type IV) permet de différencier une activité de synthèse normale ou un processus fibrosant [143, 163]. Il a ainsi été montré que le rapport collagène type I/type III était modifié dans le poumon de patients présentant une fibrose massive progressive [30, 31].

L'étude précédente n'avait pris en compte que l'aspect de prolifération du fibroblaste sans s'intéresser aux capacités sécrétrices de cette cellule. Or il est connu que de

nombreux médiateurs macrophagiques sont susceptibles de moduler l'activité sécrétrice du fibroblaste [143]. L'activation du fibroblaste peut conduire à une activité de synthèse et dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et en particulier du collagène. Un aspect important de l'étude des coopérations entre macrophages alvéolaires et fibroblastes pourra donc être l'analyse de la production *in vitro* de collagène induite par les surnageants de macrophages et l'identification des médiateurs impliqués dans ce processus. L'étude du rôle des différents médiateurs ou l'effet d'une combinaison de médiateurs sur le profil de sécrétion des différents types de collagène complètera ce travail *in vitro*.

D'autre part le processus fibrosant s'accompagne d'une variation du phénotype exprimé par des fibroblastes. Les caractéristiques de différents clones de fibroblastes varient en fonction de l'expression de molécules de surface (récepteur pour le C1q : C1qR par les fibroblastes humain, ou antigène Thy1 par les fibroblastes murins)[275, 276]. De plus cette expression de molécules particulière a été corrélée au niveau de sécrétion du collagène (les fibroblastes à expression forte sécrètent de grandes quantité de collagène).

Dans ce contexte, l'analyse de l'expression d'un phénotype particulier par les fibroblastes humain normaux (par exemple l'expression du C1qR) permettra d'analyser l'effet des médiateurs macrophagiques *in vitro*, et la répartition des ces différents phénotypes dans le poumon de patients pneumoconiotiques.

Ces différentes approches devrait nous permettre de mieux préciser les populations cellulaires impliquées dans la production des facteurs profibrosants, le ou les mécanismes conduisant à la production de ces facteurs profibrosants et en particulier le TGF β , et enfin le rôle des différents facteurs aux différents sites ou aux différents stades d'évolution de la maladie pneumoconiotiques (prolifération des fibroblastes, synthèse de collagène).

INSTALLATION DES LÉSIONS EMPHYSÉMATEUSES

La pneumoconiose du mineur de charbon implique 2 grandes pathologies : une fibrose et une bronchopathie chronique qui peut aboutir à des lésions emphysemateuses. Concernant les mécanismes physiopathologiques de l'emphysème, deux hypothèses ont été avancées [171, 172, 255, 256] :

- une perturbation de la balance protéase antiprotéase et plus spécifiquement élastase leucocytaire/ α 1-anti-trypsine (α 1-AT) par inhibition de l'activité antiprotéasique de l' α 1-AT.

- l'implication des processus inflammatoires conduisant à une augmentation de l'activité protéasique due à une augmentation de l'expression de protéases à activité élastolytique.

Dans le cadre de l'emphysème du fumeur, nous avons pu montrer que la perturbation de la balance élastase leucocytaire/ α 1-AT est due à une inactivation oxydative de l' α 1-AT potentialisée par la myéloperoxydase relarguée par les neutrophiles activés, soulignant l'implication des processus inflammatoires [254, 259, 260].

En ce qui concerne la pneumoconiose du mineur de charbon, une approche similaire sera développée, consistant à évaluer *in vitro* le degré d'inactivation de l' α 1-AT par les cellules de l'espace alvéolaire recueillies par lavage bronchoalvéolaire.

De façon parallèle, nous rechercherons une possible augmentation de l'expression d'une activité élastolytique par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques. Nous rechercherons la présence de collagénase, plasminogène activator, ou stromélysine, ainsi que les inhibiteurs correspondants dans les surnageants de macrophages alvéolaires.

Ces deux types d'approche devraient nous permettre de déterminer les niveaux d'implication de chacune des hypothèses précitées dans le cadre de l'emphysème du mineur de charbon.

Toutefois, une dernière hypothèse concernant le développement des lésions emphyémateuses sur terrain de fibrose, fait appel à la notion de rétraction du tissu fibreux [171, 172, 257]. Ce phénomène suppose le développement d'une activité contractile au sein du tissu interstiel et donc à une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

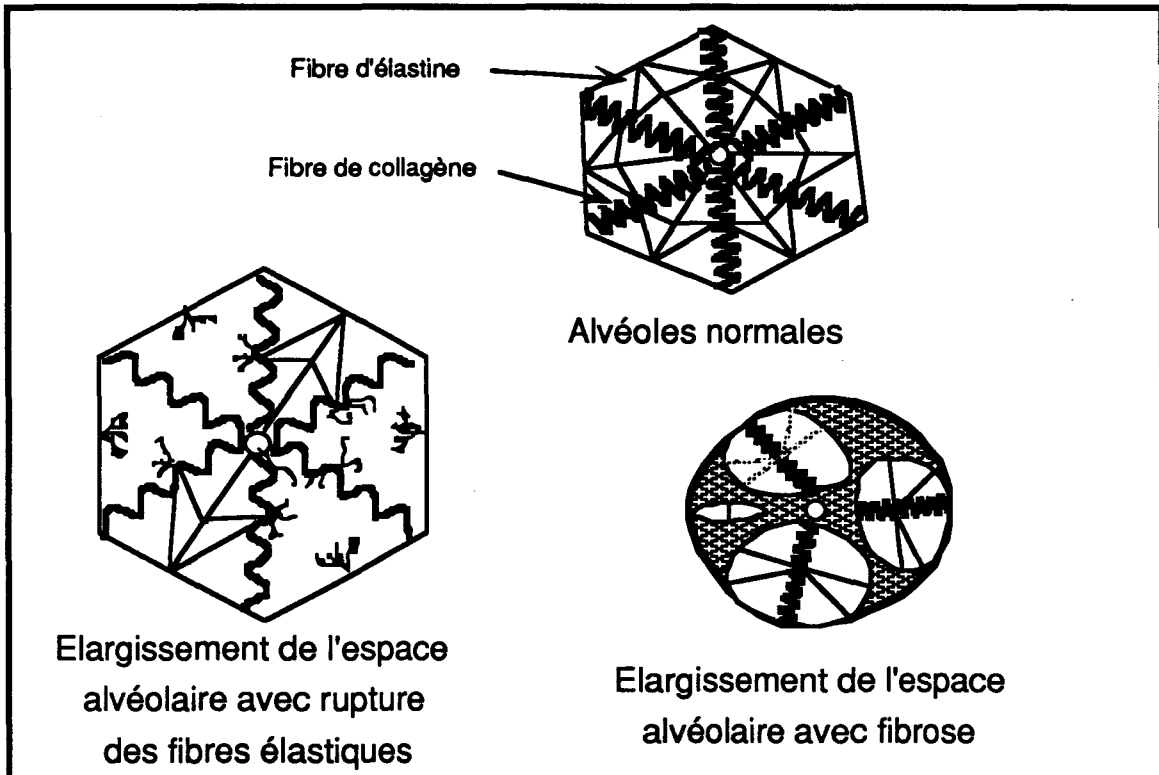


Figure 20 : Représentation schématiques des alvéoles dans un poumon normal; dans un poumon emphyémateux avec rupture des fibres élastiques (cas d'un emphyème panlobulaire); dans une fibrose pulmonaire développant des lésions emphyémateuses (cas d'un emphyème centrolobulaire).

Différentes études ont montré que le fibroblaste pouvait acquérir certaines caractéristiques propre à une activité contractile et en particulier l'expression de l'alpha smooth muscle actin (aSMA) signant l'apparition du phénotype myofibroblaste [277, 278].

Dans le cadre de la pneumoconiose du mineur de charbon, nous envisageons donc deux axes de recherche concernant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

Dans un premier temps nous étudierons l'effet de cytokines (TNF, IL-6, TGFb, PDGF, IGF-1) ou l'effet des surnageants de macrophages alvéolaires sur la différenciation des fibroblastes en suivant l'expression de l'aSMA.

Dans un deuxième temps nous étudierons l'expression de l'aSMA dans le poumon de patients pneumoconiotiques en nous intéressant surtout à la localisation des cellules exprimant cette protéine particulière.

En conclusion, dans le cas de la pneumoconiose du mineur de charbon associé à un emphysème, deux mécanismes physiopathologiques pourraient coexister :

- le développement d'un emphysème à répartition panlobulaire dû à une augmentation de l'activité élastolytique ou une diminution des défenses anti-élastolytiques.

- le développement d'un emphysème à répartition centrolobulaire dû à une variation phénotypique des fibroblastes qui se différencieraient en fibre contractile (myofibroblaste).

CONCLUSION

Les macrophages alvéolaires sont présents en grand nombre dans les poumons de patients présentant une **Pneumoconiose du mineur de charbon**. Chez ces patients ces cellules produisent des taux accrus d'un large panel de médiateurs et de cytokines. Alors que la charge en particules inhalées est souvent similaire chez les mineurs de charbon, et malgré la capacité intrinsèque des poussières d'induire la production de tous les médiateurs, les différences qualitatives et quantitatives des sécrétions macrophagiques peuvent représenter une explication intéressantes des différences observées entre **Pneumoconiose Simpe** et **Fibrose Massive Progressive**. Certains mineurs, de par un profil de sécrétion des cytokines différents peuvent développer, malgré une exposition au risque similaire, une forme plus sévère de pneumoconiose avec des lésions pulmonaires plus étendues et une diminution de la fonction respiratoire. Il apparait donc que l'évaluation du profil de sécrétion des cytokines, et en particulier le TGFb, puissent ouvrir de nouvelles issues dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la pneumoconiose mais aussi probablement d'autres pathologies interstitielles affectant le tissu pulmonaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bégin R, Cantin A, Boileau R, Bisson G. 1987. Spectrum of alveolitis in quartz exposed human subjects. *Chest*. 92 : 1061-1067.
2. Dumontet C, Vincent M, Laennec E, Girodet B, Vitrey D, Meram D, Van Straaten L. 1991. Silicosis due to inhalation of domestic cleaning powder. *Lancet*. 338 : 1085.
3. Kotloff RM, Richman PS, Greenacre JK, Rossman MD. 1993. Chronic beryllium disease in a dental laboratory technician. *Am Rev Respir Dis*. 147 : 205-207.
4. Landas SK, Schwartz DA. 1991. Mica-associated pulmonary interstitial fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 144 : 718-721.
5. Oxman AD, Muir DCF, Shannon HS, Stock SR, Hnizdo E, Lange HJ. 1993. Occupational dust exposure and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic overview of the evidence. *Am Rev Respir Dis*. 148 : 38-48.
6. Papas GP, Newman LS. 1993. Early pulmonary physiologic abnormalities in beryllium disease. *Am Rev Respir Dis*. 148 : 661-666.
7. Voisin C, Lenoir L. 1985. Notions générales sur les pneumoconioses. *Encycl Med Chir (Paris, France) Poumon*. 6039 T⁶⁰ :
8. Naeye RL. 1972. Types of fibrosis in coal worker pneumoconiosis. *Ann NY Acad Sci*. 200 : 381-400.
9. Parkes WR, *Occupational lung disorders*. 2nd ed. ed. Butterworth. Vol. London. 1982,
10. Soutar CA, Collins HPR. 1984. Classification of progressive massive fibrosis of coal miners by type of radiographic appearance. *Br J Ind Med*. 41 : 334-339.
11. Voisin C, Wallaert B, Lassalle P, Grailles M. 1991. Physiopathology of progressive massive fibrosis in coal workers. In "Mechanism in occupational lung diseases", P. Sebastien Editor. INSERM Ed. 203 : 3-22.
12. Moores SR, Black A, Evans JC, Evans CN, Holmes A, Morgan A. 1981. The effect of quartz, administered by intratracheal instillation, on the rat lung. *Environ Res*. 24 : 275-285.
13. Morgan WKC, Handelsman L, Kilbelstis J, Lapp NL, Reger RB. 1974. Ventilatory capacity and lung volumes of US coal miners. *Arch Environ Health*. 28 : 182-189.
14. Voisin C, Wallaert B. 1992. Empoussièrage professionnel et bronchopneumopathie chronique obstructive, de l'approche étiopathogénique au problème de réparation en milieu minier. *Bull Acad Natle Méd*. 176 : 43-252.

15. Cochrane AL. 1973. Relation between radiographic categories of pneumoconiosis and expectation of life. *Br Med J.* 2 : 532-534.
16. Ortmeyer CE, Costello J, Morgan WKC, Swecker S, Peterson M. 1974. The mortality of Appalachian coal miners, 1963 to 1971. *Arch Environ Health.* 29 : 67-72.
17. Voisin C, Gosselin B, Lenoir L. 1985. Silicose et pneumoconioses à poussières mixtes. *Encycl Med Chir (Paris, France) Poumon.* 6039 T⁷⁰ :
18. Pezerat H. 1991. Biological activity and surface characteristics of particles. In "mechanism in occupational lung diseases", P. Sebastien Editor. INSERM Ed. 203 : 71-88.
19. Heppleston AG. 1951. Coal workers' pneumoconiosis. *Arch. Ind Hyg and Occup Med.* 4 : 270-288.
20. Ruckley VA, Gauld SJ, Chapman JS, Davis JMG, Douglas AN, Fernie JM, Jacobsen M, Lamb D. 1984. Emphysema and dust exposure in a group of coal workers. *Am Rev Respir Dis.* 129 : 528-532.
21. Ryder R, Lyons JP, Campbell IH, Gough J. 1970. Emphysema in coal workers' pneumoconiosis. *J Brit Med.* 3 : 481-487.
22. Cokcroft A, Wagner JC, Ryder R, Seal RME, Lyons JP, Anderson N. 1982. Post-mortem study of emphysema in coal workers and non-coal workers. *Lancet.* 11 : 600-603.
23. Douglas AN, Robertson A, Chapman JS, Ruckley VA. 1986. Dust exposure, dust recovered from the lung and associated pathology in a group of british coal miners. *Br J Ind Med.* 43 : 795-801.
24. Rogan JM, Attfield MD, Jacobsen M, Rae S, Walker DD, Walton WH. 1973. Role of dust in the working environment in development of chronic bronchitis in british coal miners. *Brit j Indust Med.* 30 : 217-226.
25. Becklake MR. 1991. Dust and emphysema. In "Mechanism in occupational lung diseases", P. Sebastien Editor. INSERM Ed. 203 : 139-147.
26. Hnizdo E, Sluis-Cremer GK, Abramowitz JA. 1991. Emphysema type in relation to silica dust exposure in south africa gold miners. *Am Rev Respir Dis.* 143 : 1241-1247.
27. Le Bouffant L, Martin JC, Henin JP, Daniel H. 1975. Mesure de la rétention et de l'épuration pulmonaires au moyen de particules solides radioactives. *Rev Franc Mal Respir.* 3 : 91-100.
28. Chariot P, Couste B, Guillon F, Gaudichet A, Bignon J, Brochard P. 1992. Nonfibrous mineral particles in bronchoalveolar lavage fluid and lung parenchyma from the general population. *Am Rev Respir Dis.* 146 : 61-65.
29. Davis JMG, Chapman J, Collings P, Douglas AN, Fernie J, Lamb D, Ruckley VA. 1983. Variations in the histological patterns of the lesions of coal worker pneumoconiosis in Britain and their relationship to lung dust content. *Am Rev Respir Dis.* 128 : 118-124.

30. Bateman ED, Turner-Warwick M, Adelman-Grill BC. 1981. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung diseases. *Thorax*. 36 : 645-653.
31. Sault MC, Guerret S, Janin A, Gosselin B. 1991. A technique for measurement of specific collagen types. Application in coal worker's pneumoconiosis. In "Mechanism in occupational lung diseases", P. Sebastien Editor. M. INSERM Ed. 203 : 139-147.
32. Gernez-Rieux C, Tacquet A, Devulder B, Voisin C, Tonnel AB, Aerts C, Policard A, Martin JC, Le B L., Daniel H. 1972. Experimental study of interactions between pneumoconiosis and mycobacterial infections. *Ann NY Acad Sci*. 200 : 106-126.
33. Gernez-Rieux C, Balgaities E, Fournier P, Voisin C. 1958. Une manifestation souvent méconnue de la pneumoconiose des mineurs : la liquéfaction aseptique des formations pseudotumorales. *Sem Hop Paris*. 34 : 1081-1089.
34. Heppleston AG, Gloyne SR. 1949. Pulmonary aspergillosis in coal workers. *Thorax*. 4 : 168-172.
35. Douglas AN, Lamb D, Ruckley VA. 1982. Bronchial gland dimensions in coal miners : influence of smoking and dust exposure. *Thorax*. 37 : 760-764.
36. Hurley JF, Alexander WP, Hazledine DJ, Jacobsen M. 1987. Exposure to respirable coal mine dust and incidence of progressive massive fibrosis. *Br J Ind Med*. 44 : 661-672.
37. Miller BG, Jacobsen M. 1985. Dust exposure, pneumoconiosis and mortality of coal miners. *Br J Ind Med*. 42 : 723-733.
38. Sheron N, Lau JN, Hofmann J, Williams R, Alexander GJM. 1990. Dose-dependent increase in plasma interleukin-6 after recombinant tumor necrosis factor infusion in humans. *Clin Exp Immunol*. 82 : 427-432.
39. Nagelschmidt G, Rivers D, King EJ, Travella W. 1963. Dust and collagen content of lungs of coal workers with progressive massive fibrosis. *Br J Ind Med*. 20 : 181.
40. Miller AA, Ramsden F. 1961. Carbon pneumoconiosis. *Brit J Indust Med*. 18 : 103-113.
41. Talini D, Paggiaro PL, Rognini M, Bernard P, Baldacci L, Carrara M, Di Tomassi M, Paoletti P. 1991. Mineral content of alveolar macrophages in pneumoconiosis. *Eur Respir J*. 4 : 195s (Abstr).
42. Warson AJ, Black J, Doig AT, Nagelschmidt G. 1959. Pneumoconiosis in carbon electroplating workers. *Br J Ind Med*. 16 : 274-285.
43. Pratt PC. 1968. Role of silica in progressive massive fibrosis. *Arch Environ Health*. 16 : 734-737.
44. Ruckley VA, Frenie JM, Chapman JS, Collings P, Davis JMG, Douglas AN, Lamb D, Seaton A. 1984. Comparison of radiological appearances with associated pathology and lung dust content in a group of coal workers. *Br J Ind Med*. 41 : 459-467.
45. James WRL. 1954. The relationship of tuberculosis to the development of massive pneumoconiosis in coal workers. *Brit J Chest*. 48 : 89-96.

46. Rivers D, James WRL, Davies DG, Thompson S. 1957. Prevalence of tuberculosis at necropsy in progressive massive fibrosis of coal workers. *Brit J Ind Med.* 14 : 39-42.
47. Caplan A. 1953. Certain radiological appearances in the chest of coal miners suffering from rheumatoid arthritis. *Thorax.* 8 : 29-37.
48. Dole NJ, Stankus RP, Hughes J, Weill H, Gupta RC, Rodriguez M, Jones RN, Alspaugh MA, Salvaggio JE. 1981. Immune complexes and autoantibodies in silicosis. *J Allergy Clin Immunol.* 68 : 281-285.
49. Jones RN, Turner-Warwick M, Ziskind M, Weill H. 1976. High prevalence of antinuclear antibodies in sandblaster's silicosis. *Am Rev Respir Dis.* 113 : 392.
50. Kang KY, Yagura T, Yamamura Y. 1973. Antinuclear factors in pneumoconiosis. *N Engl J Med.* 288 : 1615.
51. Lippman M, Eckert HL, Hahon N. 1973. Circulating antinuclear and rheumatoid factors in coal miners. *Ann Intern Med.* 79 : 807-811.
52. Rom WN, Turner WG, Kanner RE, Renzetti AD, Peebles C, Eng T, Olsen DM. 1983. Antinuclear antibodies in Utah coal miners. *Chest.* 83 : 515-519.
53. Soutar CA, Turner-Warwick M, Barkes WR. 1974. Circulating antinuclear antibodies and rheumatoid factor in coal pneumoconiosis. *Brit Med J.* 5 : 145-152.
54. Burrell R. 1972. Immunologic aspects of coal workers' pneumoconiosis. *Ann NY Acad Sci.* 200 : 94-105.
55. Kumar RK, Li W, O'Grady R. 1990. Activation of lymphocytes in the pulmonary inflammatory response to silica. *Immunol Invest.* 19 : 363-372.
56. Schuyler MR, Ziskind MM, Salvaggio J. 1977. Cell-mediated immunity in silicosis. *Am Rev Respir Dis.* 116 : 147-151.
57. Schuyler MR, Ziskind MM, Salvaggio J. 1979. Function of lymphocytes and monocytes in silicosis. *Chest.* 75 : 340-344.
58. Watanabe S, Shirakami A, Takeichi T, Ohara T, Saito S. 1987. Alterations in lymphocyte subsets and serum immunoglobulin levels in patients with silicosis. *J Clin Lab Immunol.* 23 : 45-51.
59. Youinou P, Ferec C, Zabbe C, Philippon P, Dewitte JD, Guillerm D, Clavier J. 1985. Immunological effect of silica dust analysed by monoclonal antibodies. *J Clin Lab Immunol.* 16 : 207-210.
60. Pearson DJ, Mentnech MS, Elliott JA, Taylor G, Major PC. 1981. Serologic changes in pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 124 : 696-699.
61. Gualde N, De L J., Serizay B, Malinvaud G. 1977. HLA and silicosis. *Am Rev Respir Dis.* 116 : 334-336.
62. Honda K, Hirayama K, Kikuchi I, Nagato H, Tamai H, Sasazuki T. 1988. HLA and silicosis. *N Engl J Med.* 319 : 1610.

63. Heise ER, Mentnech MS, Olenchock SA, Kurz SA, Morgan WKC, Merchant JA, Major PC. 1973. HLA-A1 and coal worker's pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis.* 119 : 903-908.
64. Wagner MMF, Parke C. 1979. HLA-A and B antigen frequencies in welsh coal workers with pneumoconiosis and caplan syndrome. *Tissue antigen.* 14 : 165-168.
65. Honda K, Kimura A, Dong RP, Tamai H, Nagato H, Nishimura Y, Sasazuki T. 1993. Immunogenetic analysis of silicosis in Japan. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8 : 106-111.
66. Gregor A, Singh S, Turner-Warwick M, Lawler S, Parkes WR. 1979. The role of histocompatibility (HLA) antigens in asbestosis. *Brit J Dis Chest.* 73 : 245-252.
67. Koskinen H, Tiilikainen A, Nordman H. 1983. Increased prevalence of HLA-Aw19 and the phenogroup Aw19, B18 in advanced silicosis. *Chest.* 83 : 843-852.
68. Hayem A, Scharfman A, Lane A, Lafitte JJ, Degand P. 1983. Le lavage bronchoalvéolaire dans la pneumoconiose des mineurs de charbon. Aspect biochimiques. *Rev Fr Mal Resp.* 11 : 417-426.
69. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanama O, Ferrans VJ, Crystal RG. 1979. Inflammatory and immune processes in human lung in health and diseases. Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol.* 97 : 149-206.
70. Sablonniere B, Scharfman A, Lafitte JJ, Laine A, Aerts C, Hayem A. 1983. Enzymatic activities of bronchoalveolar lavage in coal workers'pneumoconiosis. *Lung.* 161 : 219-228.
71. Voisin C, Wallaert B, Ramon P, Lafitte JJ, Tonnel A, Aerts C. 1981. Study of the cellular population collected by bronchoalveolar lavage in pneumoconiotic coal miners. *Europ J Resp Dis.* 62 : 62-70.
72. Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Higgins JM, Ridder G. 1990. Pulmonary response to silica or titanium dioxide : Inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2 : 381-390.
73. Rom WN, Bitterman PB, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. 1987. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking subjects with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am Rev Respir Dis.* 136 : 1429-1434.
74. Donaldson K, Brown GM, Brown DM, Slight J, Xiao Y Li. 1992. Epithelial and extracellular matrix injury in quartz-inflamed lung : role of the alveolar macrophage. *Environ Health Perspect.* 97 : 221-224.
75. Rom WN, Bitterman B, Rennard S, Crystal RG. 1984. Alveolar macrophage mediated fibroblast proliferation in the pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis.* 119 : 160.
76. Rom WN. 1991. Relationship of inflammatory cell cytokines to disease severity in individuals with occupational inorganic dust exposure. *Am J Ind Med.* 19 : 15-27.
77. Warheit DB, Chang LY, Hill L, Hook GER, Crapo JD, Brody AR. 1986. Pulmonary macrophage accumulation and asbestos-induced lesions at the site of fiber deposition. *Am Rev Respir Dis.* 134 : 128-133.

78. Dauber JH, Rossman MS, Daniele RP. 1982. Pulmonary fibrosis : bronchoalveolar cell types and impaired functions of alveolar macrophages in experimental silicosis. *Environ Res.* 27 : 226-236.
79. Sibille Y, Reynolds HY. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 141 : 471-501.
80. Brown GM, Brown DM, Donaldson K. 1992. Persistent inflammation and impaired chemotaxis of alveolar macrophages on cessation of dust exposure. *Environ Health Perspect.* 97 : 91-94.
81. Morgan A, Moores SR, Holmes A, Evans JC, Evans NH, Black A. 1980. The effect of quartz administered by intratracheal instillation. I. Cellular response. *Environ Res.* 22 : 1-12.
82. Heppleston AG, Wright NA, Stewart JA. 1970. Experimental alveolar lipoproteinosis following the inhalation of silica. *J Pathol.* 101 : 293-307.
83. Heppleston AG. 1982. Silicotic fibrogenesis : a concept of pulmonary fibrosis. *Ann Occup Hyg.* 26 : 449-462.
84. Reiser KM, Hesterberg TW, Haschek WM, Last JA. 1983. Long term effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol.* 110 : 30-41.
85. Beck BD, Brain JD, Bohannon DE. 1982. An in vivo bioassay to assess the toxicity of particulates for the lungs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 66 : 9-29.
86. Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS, Weissner J, Mandell NS. 1985. Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. *J Lab Clin Med.* 105 : 547-553.
87. Linderschmidt RC, Driscoll KE, Maurer JK, Perkins MA, Higgins JM. 1988. Bronchoalveolar lavage fluid analysis following silica administration. *Toxicologist.* 8 : 69-75.
88. Linderschmidt RC, Driscoll KE, Perkins MA, Higgins JM, Maurer JK, Belfiore KA. 1990. The comparison of a fibrogenic and two nonfibrogenic dusts by bronchoalveolar lavage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 102 : 268-281.
89. Perkins MA, Linderschmidt RC, Driscoll KE, Maurer JK, Higgins JM. 1988. Bronchoalveolar lavage fluid analysis following aluminium oxide and titanium dioxide administration. *Toxicologist.* 8 : 69-75.
90. Oghiso Y, Yamada Y, Shibata Y. 1992. Effects of instilled fibrogenic particles on the clonal growth of murine pulmonary alveolar macrophages. *Environ Health Perspect.* 97 : 159-161.
91. Vallyathan V, Shi X, Dalal NS, Irr W, Castranova V. 1988. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust : Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 138 : 1213-1219.
92. Adamson IYR, Prieditis H, Bowden DH. 1992. Instillation of chemotactic factor to silica-injected lungs lowers interstitial particle content and reduces pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 141 : 319-326.

93. Bowden DH, Adamson IY. 1984. The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 144 : 149-161.
94. Dauber JH, Rossman MS, Pietra CG, Jimenez SA, Daniele RP. 1980. Experimental silicosis. Morphologic and biochemical abnormalities produced by intratracheal instillation of quartz into guinea-pig lungs. *Am J Pathol.* 101 : 595-612.
95. Sjöstrand M, Rylander R. 1984. Lung cell reactions in guinea pigs exposed to tobacco smoke and silica dust or bacterial lipopolysaccharides. *Toxicology.* 29 : 271-280.
96. Christman JW, Emerson R, Graham WGB, Davis GS. 1985. Mineral dust and cell recovery from the bronchoalveolar lavage in healthy Vermont granite workers. *Am Rev Respir Dis.* 132 : 393-399.
97. Voisin C, Gosselin B, Ramon P, Wallaert B, Aerts C, Lenoir L. 1983. Le lavage bronchoalvéolaire dans la pneumoconiose du mineur de charbon. Aspects cytologiques. *Rev Franc Mal Resp.* 11 : 455-466.
98. Voisin C, Wallaert B, Aerts C. 1987. Caractéristiques cellulaires du lavage bronchoalvéolaire dans la pneumoconiose du mineur de charbon. Apport à la connaissance physiopathologique de la maladie. In "Silicose et pneumoconiose à poussières mixtes", Editor. INSERM Ed. 155 : 43-60.
99. Hildeman S, Hammer C, Krombach F. 1992. Heterogeneity of alveolar macrophages in experimental silicosis. *Environ Health Perspect.* 97 : 53-57.
100. Terzidis-Trabelsi H, Lefevre JP, Bignon J, Lambre CR. 1992. Decreased sialidase activity in alveolar macrophages of guinea pigs exposed to coal mine dust. *Environ Health Perspect.* 97 : 103-107.
101. Sjöstrand M, Absher PM, Hemenway DR, Trombley L, Baldor LC. 1991. Comparison of lung alveolar and tissue cells in silica-induced inflammation. *Am Rev Respir Dis.* 143 : 47-52.
102. Burns CA, Zarkower A. 1983. Increased alveolar macrophage effector cell function after intratracheal instillation of particulates. *J Clin Lab Immunol.* 10 : 107-112.
103. Lugano EM, Dauber JH, Daniele RP. 1982. Acute experimental silicosis. Lung morphology, histology and macrophage chemotaxis secretion. *Am J Pathol.* 109 : 27-36.
104. Driscoll KE, Higgins JM, Laytart MJ, Crosby LL. 1990. Differential effects of mineral dust on the *in vitro* activation of alveolar macrophage eicosanoid and cytokine release. *Toxicol In vitro.* 4 : 284-288.
105. Mohr C, Davis GS, Graebner C, Hemenway DR, Gemsa D. 1992. Enhanced release of prostaglandin E2 from macrophages of rats silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 6 : 390-396.
106. Piguet PF, Collart MA, Grau CE, Sappinot AP, Vassali P. 1990. Requirement of Tumor Necrosis Factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature.* 344 : 245-247.

107. Ouellet S, Yang H, Aubin RA, Hawley RG, Wenckebach GF, Lemaire I. 1993. Bidirectional modulation of TNF-alpha production by alveolar macrophages in asbestos-induced pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol.* 53 : 279-286.
108. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited by bleomycin or silica. *Cytokine.* 5 : 57-61.
109. Gosset P, Lassalle P, Tonnel AB, et al. 1988. Production of an interleukin-1 inhibitory factor by human alveolar macrophages from normal and allergic asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis.* 138 : 40-46.
110. Gosset P, Lassalle P, Vanhée D, Wallaert B, Aerts C, Voisin C, Tonnel AB. 1991. Production of Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed to *in vitro* coal mine dust. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5 : 431-436.
111. Janson RW, King TE, Hance KR, Arend WP. 1993. Enhanced production of IL-1 receptor antagonist by alveolar macrophages from patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 148 : 495-503.
112. Bonner JC, Goodell AL, Coin PG, Brody AR. 1993. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest.* 92 : 425-430.
113. Brown GM, Donaldson K. 1989. Inflammatory responses in lungs of rats inhaling coal mine dust : enhanced proteolysis of fibronectin by bronchoalveolar leukocytes. *Brit J Ind Med.* 46 : 866-872.
114. Davies P, Ergodu G, Hill RJ, Edward JH. 1985. Secretion of fibronectin by dust induced alveolar macrophages. In "*In vitro* effects of mineral dusts", E.G. Beck and J. Bignon Editor. S. Verlag Ed. Berlin-heidelberg. 63 : 353-358.
115. Gritter HL, Adamson IYR, King GM. 1986. Modulation of fibroblast activity by normal and silica exposed alveolar macrophages. *J Pathol.* 148 : 263-271.
116. Lugano EM, Dauber JH, Elias JA, Bashey RJ, Jimenez SA, Daniele RP. 1984. The regulation of lung fibroblast proliferation by alveolar macrophage in experimental silicosis. *Am Rev Respir Dis.* 129 : 767-771.
117. Williams AO, Flanders KC, Saffiotik U. 1993. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β 1 in rats with experimental silicosis, alveolar type II hyperplasia, and lung cancer. *Am J Pathol.* 142 : 1831-1840.
118. Kuhn DC, Stanley CF, El-Ayouby N, Demers LM. 1990. Effect of *in vivo* coal dust exposure on arachidonic acid metabolism in the rat alveolar macrophage. *J Toxicol Environ Health.* 29 : 157-168.
119. Wolfe SD, Cerami A. 1989. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 3 : 2565-2573.
120. Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R. 1993. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8 : 311-318.

121. Piguet PF, Grau GE, de Kossodo S. 1993. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary fibrosis induced in mice by bleomycin. *Exp Lung Res.* 19 : 579-87.
122. Wallaert B, Bart F, Aerts C, Ouaiissi MA, Neyrink JL, Voisin C. 1987. Sécrétion spontanée d'anions superoxydes, de facteurs chimiotactiques des polynucléaires neutrophiles et de fibronectine par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques. In "Silicose et pneumoconiose à poussières mixtes", Editor. INSERM Ed. 155 : 115-121.
123. Wallaert B, Lassalle P, Fortin F, Aerts C, Bart F, Fournier E, C. V. 1990. Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of nonsmoking coal workers. *Am Rev Respir Dis.* 141 : 129-133.
124. Borm PJA, Pamen N, Engelen JJM, Buurman WA. 1988. Spontaneous and stimulated release of Tumor Necrosis Factor α (TNF) from blood monocytes of miners with coal worker pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis.* 138 : 1589-1594.
125. Schmidt J, Oliver CN, Lepe-Zuniga JL, Green I, Grey I. 1984. Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to Interleukin-1 : potential role for Interleukin-1 in the pathogenesis of silicosis. *J Clin Invest.* 73 : 1462-1472.
126. Dubois CM, Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M. 1989. Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. Autoregulatory role of leukotriene B₄. *Am Rev Respir Dis.* 139 : 1257-1264.
127. She ZW, Wewers MD, Herzyk DJ, Sagone AL, Davis WB. 1989. Tumor necrosis Factor primes neutrophils for hypochlorous acid production. *Am J Physiol.* 257 : L338-L345.
128. Bauman MD, Jetten AM, Bonner JC, Kumar RK, Bennett RA, Brody AR. 1990. Secretion of a platelet-derived growth factor homologue by rat alveolar macrophages exposed to particulates *in vitro*. *Eur J Cell Biol.* 51 : 327-334.
129. Brown GP, Monick M, Hunninghake GW. 1988. Fibroblast proliferation induced by silica-exposed human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis.* 138 : 85-89.
130. Schapira RM, Osornio-Vargas A, Brody AR. 1991. Inorganic particles induce secretion of a macrophage homologue of platelet-derived growth factor in a density and time dependent manner *in vitro*. *Exp Lung Res.* 17 : 1011-1024.
131. Davies R, Ergodgu G. 1989. Secretion of fibronectin by mineral dust-derived alveolar macrophages and activated peritoneal macrophages. *Exp Lung Res.* 15 : 285-297.
132. Osornio-Vargas A, Kalter VG, Badgett A, Hernandez-Rodriguez N, Aguilar-Delfin I, Brody AR. 1993. Early-passage rat lung fibroblasts do not migrate *in vitro* to Transforming growth factor β . *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8 : 468-471.
133. Kalter VG, Brody AR. 1989. Secretion of TGF- β by rat alveolar macrophages and characterization of receptors for TGF- β on rat lung fibroblasts. *Cytokine.* 1 : 76 (Abstr.).
134. Kumar RK, O'Grady R, Li W, Velan GM. 1992. Mitogenic activity for fibroblasts induced by silica and titanium dioxide particles *in vitro* and *in vivo*. *Int J Exp Pathol.* 73 : 573-583.

135. Voisin C, Wallaert B, Aerts C, Grosbois JM. 1985. Bronchoalveolar lavage in coal workers' pneumoconiosis. Oxidant and antioxidant activities of alveolar macrophages. In "In vitro effects of mineral dusts", E.G. Beck and J. Bignon Editor. Springer-Verlag Ed. Berlin Heidelberg. 63 : 93-100.
136. Lassalle P, Gosse tP, Aerts C, Benhamou M, Fortin F, Wallaert B, Tonnel AB, Voisin C. 1989. Alveolar macrophage secretory dysfunctions in coal workers' pneumoconiosis. Comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. In "Effects of mineral dusts on cells", B.T. Mossman and R.O. Begin Editor. Sringer-Verlag Ed. Berlin-Heidelberg. H30 : 65-71.
137. Lassalle P, Gosset P, Aerts C, Fournier E, Lafitte JJ, Degreeef JM, Wallaert B, Tonnel AB, Voisin C. 1990. Abnormal secretion of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor alpha by alveolar macrophages in coal worker pneumoconiosis : comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. *Exp Lung Res.* 16 : 73-80.
138. Bost T, Newman L, Riches D. 1993. Increased TNF-alpha and IL-6 mRNA expression by alveolar macrophages in chronic beryllium disease. *Chest.* 103 : 138.
139. Bitterman PB, Rennard SI, Adelberg S, Crystal RG. 1983. Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J Cell Biol.* 97 : 1925-1932.
140. Brody AR, Bonner JC, Overby LH, Badgett A, Kalter V, Kumar RK, Bennet RA. 1992. Interstitial pulmonary macrophages produced platelet-derived growth factor that stimulates rat lung fibroblast proliferation *in vitro*. *J Leukoc Biol.* 51 : 640-648.
141. Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Crystal RG. 1988. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor 1-type molecule. *J Clin Invest.* 82 : 1685-1693.
142. Flynn RM, Palladino MA. 1991. TNF and TGF- β : the opposite sides of the avenue ? In "Tumor Necrosis Factors : The molecules and their emerging role in medicine", B. Beutler Editor. R. Press Ed. New York. : 131-144.
143. Kovacs EJ. 1991. Fibrogenic cytokines : The role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today.* 12 : 17-23.
144. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figar IS, Palladino MA, Shepard HM. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science.* 230 : 943-945.
145. Vilcek J, Palombelle VJ, Henryksen-DeStefano D, et al. 1986. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med.* 163 : 632-643.
146. Gosset P, Perez T, Lassalle P, Duquesnoy B, Farre JM, Tonnel AB, Capron A. 1991. Increased TNF- α secretion by alveolar macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Am Rev Respir Dis.* 143 : 593-597.
147. Voisin C, Aerts C, Wattel F, Tonnel AB. 1969. Cytotoxicité des poussières de silice et des poussières mixtes pour les macrophages alvéolaires de cobaye en survie *in vitro*. Essai d'appréciation quantitative. *Ann Inst Pasteur-Lille.* 20 : 183-192.
148. Aerts C, Grosbois JM, Bart F, Wallaert B, Voisin C. 1987. Etude de la cytotoxicité de la silice. Corrélation entre la toxicité de la silice vis-à-vis des

macrophages alvéolaires et le contenu intracellulaire en glutathion. In "Silicose et pneumoconiose à poussières mixtes", Editor. M. INSERM Ed. 155 : 151-160.

149. Van snick J, Cayphas S, Vinck A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira M, Simpson RJ. 1986. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a cell-derived lymphokine with growth activities for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83 : 9679-9685.

150. Emilie D, Peuchmau rM, Maillot MC, Crevon MC, Brousse N, Delfraissy JF, Dormont J, Galanaud P. 1990. Production of Interleukins in Human Immunodeficiency Virus-1-replicating lymph nodes. *J Clin Invest*. 86 : 148-159.

151. Queva C, Ness SA, Graf T, Vandebunder B, Stehelin D. 1992. Expression patterns of c-myb and of v-myb induced myeloid-1 (mim 1) gene during the development of the chick embryo. *Development*. 114 : 125-133.

152. Vandebunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D. 1989. Complementary patterns of the expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood forming system of the chick embryo. *Development*. 107 : 265-274.

153. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. 1989. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 142 : 144-147.

154. Okusawa S, Geifand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. 1988. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with Tumor Necrosis Factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*. 81 : 1162-1172.

155. Van der poll T, Van Deventer SJH, Hack CE, Wolbink GJ, Aarden LA, Büller HR, Ten Cate JW. 1992. Effects on leukocytes after injection of Tumor Necrosis Factor into healthy human. *Blood*. 79 : 693-698.

156. Antoniadis HN, Neville GJ, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT. 1992. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89 : 5371-5375.

157. Briedland JK, Jones ML, Clarke SJ, Baker JB, Warren JS, Fantone JC. 1992. Effect of acute inflammatory lung injury on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 7 : 134-139.

158. Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Fracke U, Murphy PM. 1993. Structure and expression of the human macrophage inflammatory protein 1 α /RANTES receptor. *J Exp Med*. 177 : 1421-1427.

159. Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, Chensue SW, Allen RM, Evanoff HL, Phan SH, Strieter RM. 1991. Pulmonary fibroblast expression of Interleukin-8 : a model for alveolar macrophage-derived cytokine networking. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 5 : 493-501.

160. Calderon E, Lockey RF. 1992. A possible role for adhesion molecules in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 90 : 852-865.

161. Springer TA. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346 : 425-434.

162. Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R. 1990. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science*. 247 : 456-459.
163. Bornstein P, Sage H. 1989. Regulation of collagen gene expression. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol*. 37 : 67-106.
164. Solis-Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M. 1988. Tumor necrosis factor α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*. 263 : 5841-5850.
165. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*. 162 : 419-425.
166. Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE. 1993. Transforming growth factor b enhances integrin expression and type IV secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 : 4577-4581.
167. Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. 1993. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells : correlation with cellular invasion. *J Cell Sci*. 104 : 991-999.
168. Vignaud JM, Allam M, Martinet M, Pech M, Plenat F, Martinet Y. 1991. Presence of platelet-derived growth factor in normal and fibrotic lung is specifically associated with interstitial macrophages, while both interstitial macrophages and epithelial cells express the c-sis proto-oncogene. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 5 : 531-538.
169. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. 1986. The biology of platelet derived growth factor. *Cell*. 46 : 155-169.
170. Snider GL, Lucey EC, Faris C, Jung-legg Y, Stone PJ, Franzblau C. 1988. Cadmiun-chloride induced air-space enlargement with interstitial pulmonary fibrosis is not associated with destruction of lung elastin. *Am Rev Respir Dis*. 137 : 918-923.
171. Snider GL. 1992. Emphysema : the first two centuries and beyond. An historical overview, with suggestions for future research : Part 1. *Am Rev Respir Dis*. 146 : 1334-1344.
172. Snider GL. 1992. Emphysema : the first two centuries and beyond. An historical overview, with suggestions for future research : Part 2. *Am Rev Respir Dis*. 146 : 1615-1622.
173. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, et a. 1986. Stimulation of neutrophils by TNF. *J Immunol*. 136 : 4220-4225.
174. Klockars M, Savolainen H. 1992. Tumor necrosis factor enhances the asbestos-induced production of reactive oxygen metabolites by polymorphonuclear leukocytes (PMN). *Clin Exp Immunol*. 90 : 68-71.
175. Shennan DH, Whashington JS, Thomas DJ, Dick JA, Kaplan YS, Bennett JG. 1981. Factors predisposing to the development of progressive massive fibrosis in coal miners. *Brit J Ind Med*. 38 : 321-326.
176. Warren JS, Kunkel SL, Cunnungham TW, Johnson KJ, Ward PA. 1988. Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O²⁻ responses by rat alveolar macrophages. *Am J Pathol*. 130 : 489-495.

177. -Duits AJ, Jainandunsing SM, Van de Winkel GJ, Capel PJA. 1991. Selective enhancement of Leu-CAM expression by interleukin-6 during differentiation of human promocytic U937 cells. *Scan J Immunol.* 33 : 151-159.
178. Choi I, Kang HS, Yang Y, Pyun KH. 1994. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. *Clin Exp Immunol.* 95 : 530-535.
179. Dinarello CA. 1991. Inflammatory cytokines : Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Current Opinion in immunology.* 3 : 941-948.
180. Denis M. 1992. Interleukin-6 in mouse hypersensitivity pneumonitis: changes in lung free cells following depletion of endogenous IL-6 or direct administration of IL-6. *J Leukoc Biol.* 52 : 197-201.
181. Barton BE, Jackson JV. 1993. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun.* 61 : 1496.
182. Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, del Castillo J. 1991. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am J Pathol.* 138 : 1097-101.
183. Schindler R, Mancilla J, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells : IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 75 : 40.
184. Aderka D, Le J, Vilcek J. 1989. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol.* 143 : 3517.
185. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokines : induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 83 : 113-118.
186. Pledger WJ, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. 1978. An ordered sequence of events is required before BALB/c-3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 75 : 2839-2843.
187. Martinet Y, Bitterman PB, Mornex JF, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG. 1986. Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature.* 319 : 158-160.
188. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. 1987. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 : 6020-6024.
189. Wahl SM, Mc Cartney-Francis N, Mergenhagen SE. 1989. Inflammatory and immunomodulatory role of TGF β . *Immunol Today.* 10 : 258-261.
190. Bergmeyer HU, Garvehn K. 1978. Methods of enzymatic analysis. In Editor. N.Y.A. Edition Ed. 2 : 233.
191. Bonner JC, Hoffman M, Brody AR. 1989. Alpha-macroglobulin secreted by alveolar macrophages serves as a binding protein for a macropahge-derived homologue of Platelet-Derived Growth Factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1 : 171-179.

192. Kumar RK, Bennett RA, Brody AR. 1988. A homologue of Platelet-Derived Growth Factor produced by rat alveolar macrophages. *FASEB J.* 2 : 2272-2277.
193. Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang MLS, et al. 1987. The transforming growth factor β system, a complex pattern of cross reactive ligands and receptors. *Cell.* 48 : 409-415.
194. Lyons RM, Keski-Oja J, Loses HL. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* 106 : 1659-1665.
195. Kelley J, Shull S, Walsh JJ, Cutroneo KR, Absher M. 1993. Auto-induction of transforming growth factor- β in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8 : 417-424.
196. Anzano MA, Roberts AB, Sporn MB. 1986. Anchorage-independent growth of primary rat embryo cells is induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type-beta transforming growth factor. *J Cell Physiol.* 126 : 312-318.
197. Bategay EJ, Raines E, Seifert RA, Bowen-pope DF, Ross R. 1990. TGF β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of autocrine PDGF loop. *Cell.* 63 : 515-524.
198. Moses HL, Yang EY, Pietropol JA. 1990. TGF β stimulation and inhibition of cell proliferation : New mechanistic insights. *Cell.* 63 : 245-247.
199. Paulsson Y, Beckmann MP, Westermark B, Heldin CH. 1988. Density-dependent inhibition of cell growth by Transforming growth factor β 1 in normal human fibroblasts. *Growth factors.* 1 : 19-25.
200. Denholm EM, Rollins SM. 1993. Expression and secretion of Transforming growth factor β by bleomycin-stimulated rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 264 : L36-L42.
201. Khalil N, O'Connor N, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. 1991. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-b in idiopathic pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5 : 155-162.
202. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, Mc Donald JA. 1991. Transforming growth factor b1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88 : 6642-6646.
203. Leroith D, Clemmons D, Nissley P, Rechler MM. 1992. Insulin-like growth factors in health and disease. *Ann Int Med.* 116 : 854-862.
204. Marinelli WA, Polunovsk VA, Harmon KR, Bitterman PB. 1991. Role of platelet-derived growth factor in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5 : 503-504.
205. Gamble JR, Vadas MA. 1988. Endothelial cell adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by Transforming growth factor β . *Science.* 242 : 97.
206. Gamble JR, Vadas MA. 1991. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by TGF β . *J Immunol.* 146 : 1149-1160.

207. Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. 1993. Transforming growth factor β inhibits E-Selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol.* 150 : 4494-4503.
208. Kulkarni AB, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor-b knockout mice. A mutation in one cytokine gene cause a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol.* 143 : 3-9.
209. Shull M, Ormsby MI, Kier AB, Pawlowsk iS, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. 1992. Targeted disruption of the mouse Transforming growth factor β 1 gene results in multi-focal inflammatory disease. *Nature.* 359 : 693-700.
210. Dubois CM, Ruscette FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ, Keller JR. 1990. Transforming growth factor β is a potent inhibitor of Interleukin 1 (IL-1) receptor expression : Proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J Exp Med.* 172 : 737-744.
211. Turner M, Chantry D, Katsikis P, Berger A, Brennan FM, Feldman M. 1991. Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by Transforming growth factor β . *Eur J Immunol.* 21 : 1635.
212. Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Wahl LM, Berger AE. 1993. Transforming growth factor b mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol.* 150 : 3553-3560.
213. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Enander I, Venge P, Peterson C, Ahlstedt S, Michel FB, Godard P. 1991. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 88 : 649-660.
214. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. 1991. Activated T cells and eosinophils in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 88 : 935-942.
215. Bentley AM, Menz G, Storz CHR, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay A. 1992. Identification of T-lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis.* 146 : 500-506.
216. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AMA, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB. 1991. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 88 : 661-674.
217. Poston RN, Chanez P, Lacoste JY, Litchfield T, Lee TH, Bousquet J. 1992. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis.* 145 : 918-921.
218. The BAL Cooperative Group Steering Committee. 1990. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis.* 141 : S188-S192.
219. Lee TH, Lane SJ. 1992. The role of macrophages in the mechanisms of airway inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 145 : 27-30.

220. Ohkawara Y, Yamauchi K, Tanno Y, Tamura G, Ohtani H, Nagura H, Ohkuda K, Takishima T. 1992. Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor α in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7 : 385-392.
221. Scott T, Kaliner M. 1993. Mast cells in asthma. In "The mast cell in health and disease", M.A. Kaliner and D.D. Metcalfe Editor. Ed. New York. 1 : 575-608.
222. Broide DH, Lotz M, Cuomo A, Coburn DA, Federman EC, Wasserman SI. 1991. Cytokines in symptomatic asthma airways. *J Allergy Clin Immunol.* 89 : 958-967.
223. Gordon JR, Galli SJ. 1990. Mast cell as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature.* 346 : 274-276.
224. Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B, Joseph M, Tonnel AB, Capron A. 1991. Increased secretion of Tumor Necrosis Factor and Interleukine-6 by alveolar macrophages during late asthmatic reaction after bronchial allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 88 : 561-571.
225. Sun Ying, Robinson DS, Varney V, Qiu M, A. T, Moqbel R, Durham SR, Kay AB, Hamid Q. 1991. TNF α mRNA expression in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy.* 21 : 745-750.
226. Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 67 : 1033-1036.
227. Holtzman MJ, Look DC. 1992. Cell adhesion molecules as targets for unraveling the genetic regulation of airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7 : 246-247.
228. Osborn L. 1990. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell.* 62 : 3-6.
229. Haskard DO, Lee H. 1992. The role of leukocyte-endothelial interactions in the accumulation of leukocytes in allergic inflammation. *Am Rev Respir Dis.* 145 : S10-S13.
230. Pober JS. 1988. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathol.* 133 : 426-436.
231. Bevilacqua MP, Setngelin S, Gimbrone J M.A., Seed B. 1989. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 243 : 1160-1165.
232. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick D, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone J M.A. 1986. Two distinct monokines, Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol.* 136 : 1680-1687.
233. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassalli C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. 1989. Direct expression cloning of Vascular Cell Adhesion Molecule 11, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 59 : 1203-1211.
234. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick D, Cotran RS, Gimbrone J M.A. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 : 9238-9242.

235. Luscinskas FW, Brock AF, Arnaout MA, Gimbrone J M.A. 1989. Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 dependent and leukocyte (CD11/CD18)-dependent mechanism contribute to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine-activated human vascular endothelium. *J Immunol.* 141 : 2257-2263.
236. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins : identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52 : 2745-2755.
237. Wallis WJ, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. 1985. Human monocyte adherence to cultured vascular endothelium: monoclonal antibody-defined mechanism. *J Immunol.* 135 : 2323-2330.
238. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65 : 55-63.
239. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. 1991. Cloning of the human gene for intercellular Adhesion Molecule-1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol.* 147 : 2777-2786.
240. Pober JS, Slowik MR, De L L.G., Ritchie AJ. 1993. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 150 : 5114-5123.
241. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Tompkins B D., Ramberg J, Lipsky PE. 1991. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol.* 147 : 2913-2921.
242. Weg VB, Williams TJ, Lobb RR, Nourshargh S. 1993. A monoclonal antibody recognizing Very Late Activation Antigen-4 inhibits eosinophil accumulation *in vivo*. *J Exp Med.* 177 : 561-566.
243. Luscinskas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone J M.A. 1991. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1. *J Immunol.* 146 : 1617-1625.
244. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA, Perez M, Singhal AK, Hakomori SI, Paulson JC. 1990. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Le^x. *Science.* 250 : 1130-1131.
245. Van Kooyk Y, Van de Wiel-Van Kemenade E, Weder P, Huijbens RJF, Figdor CG. 1993. Lymphocyte Function-associated Antigen 1 dominates Very Late Antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. *J Exp Med.* 177 : 185-190.
246. Beekhuizen H, Blokland I, Van Furth R. 1993. Cross-linking of CD14 molecules on monocytes results in a CD11/CD18- and ICAM-1-dependent adherence to cytokine-stimulated human endothelial cells. *J Immunol.* 150 : 950-959.
247. Piguet PF, Rosen H, Vesin C, Grau GE. 1993. Effective treatment of the pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica with anti-CD11 antibodies. *Am Rev Respir Dis.* 147 : 435-441.
248. Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol.* 148 : 2423-2428.

249. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor β . *Nature*. 334 : 260-266.
250. Bitterman P, Rennard S, Ozaki T, Adelberg S, Crystal RG. 1983. PGE₂ : a potential regulator of fibroblast replication in normal alveolar structures. *Am Rev Respir Dis*. 127 : 271-280.
251. Brody AR, Bonner JC, Badgett A. 1993. Recombinant interferon-gamma reduces PDGF-induced lung fibroblast growth but stimulates PDGF production by alveolar macrophages *in vitro*. *Chest*. 103 : 121-122.
252. Yamauchi K, Martinet Y, Basset P, et al. 1988. High levels of Transforming growth factor β are present in epithelial lining fluid of the normal lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*. 137 : 1360-1363.
253. Moreland LW, Goldsmith KT, Russell WJ, Young KR, Garver RI. 1992. Transforming growth factor β within fibrotic scleroderma lungs. *Am J Med*. *Am J Med* : 628-636.
254. Wallaert B, Gressier B, Marquette CH, Gosset P, Remy-Jardin M, Mizon J, Tonnel AB. 1993. Inactivation of α 1-proteinase inhibitor by alveolar inflammatory cells from smoking patients with or without emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 147 : 1537-1543.
255. Janoff A. 1985. Elastases and emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 132 : 417-433.
256. Lafuma C. 1991. Elastases and lung diseases. In mechanism in occupational lung diseases. In "Mechanism in occupational lung diseases", P. Sebastien Editor. INSERM Ed. 203 : 139-147.
257. Wellington VC, Sekhon HS, Hyde DM, Thurlbeck WM. 1993. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 147 : 975-981.
258. Stockley RA, Burnett D. 1993. Bronchoalveolar lavage and the study of proteinases and antiproteinase in the pathogenesis of chronic obstructive lung disease. *Monaldi Arch Chest Dis*. 48 : 245-253.
259. Wallaert B, Gressier B, Aets C, Mizon C, Voisin C, Mizon J. 1991. Oxydative inactivation of α 1-proteinase inhibitor by alveolar macropahges from healthy smokers requires the presence of myeloperoxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 5 : 437-444.
260. Wallaert B, Aerts C, Gressier B, Gosset P, Voisin C. 1993. Oxydative inactivaton of α 1-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type II cell. *J Appl Physiol*. 75 : 2376-2382.
261. Marko D, Scharfman A, Hayem A. 1991. Pneumoconiosis, Smoking habits and inhibitory capacity of human leukocyte elastase. In "mechanism in occupational lung diseases", P. Sebastien Editor. INSERM Ed. 203 : 149-154.
262. D'Armiento J, Dala SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. 1992. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell*. 71 :
263. Stout RD. 1993. Macrophage avtivation by T-cells : cognate and non-cognate signals. *Current Opinion in Immunology*. 5 : 398-403.

264. Rakesh WL, Kumar RK, O'Grady R, Velan GM. 1992. Role of lymphocytes in silicosis : regulation of secretion of macrophage-derived mitogenic activity for fibroblasts. *Int J Exp Pathol.* 73 : 793-800.
265. Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. 1993. Evaluation of proinflammatory cytokine expression in alveolar macrophages and in the lung of pneumoconiotic patients. In "Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres", Editor. S. Verlag Ed. Berlin-heidelberg. : in press.
266. Vanhée D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB. 1993. Secretion and mRNA expression of TNF α and IL-6 in alveolar macrophages and in the lung of pneumoconiotic patients. *Am Rev Respir Dis.* submitted :
267. Vanhée D, Delneste Y, Lassalle P, Gosset P, Joseph M, Tonnel AB. 1993. Modulation of endothelial cell adhesion molecule expression in a situation of chronic inflammatory stimulation. *Cell Immunol.* In press :
268. Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. 1993. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis : increased production of PDGF and IGF-1 in progressive massive fibrosis, and control of fibroblast growth by TGF β in simple pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis.* submitted :
269. Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB. 1994. Role of macrophage-derived cytokines in coal workers' pneumoconiosis. In "Cells and Cytokines in lung inflammation", P.M. Chignard M Renesto P, Vargaftig BB Editor. Ed. : in press.
270. Bitterman PB, Saltzman LI, Adelberg S, Ferrans VJ, Crystal RG. 1984. Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J Clin Invest.* 74 : 469-469.
271. Coggle JE, Tarling JD. 1984. The proliferation kinetics of pulmonary alveolar macrophages. *J Leukoc Biol.* 35 : 317-327.
272. Sawyer RT, Strausbach PH, Volkman A. 1982. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest.* 46 : 165-170.
273. Von Ond Ablas AB, Van Furth R. 1979. Origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med.* 149 : 1504-1518.
274. Rom WN, Pääkkö P. 1991. Activated alveolar macrophages express the insulin-like growth factor-1 receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4 : 432-439.
275. Akamine A, Raghu G, Narayanan AS. 1992. Human lung fibroblast subpopulations with C1q binding and functional properties. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 6 : 382-389.
276. Derdak C, Penney DP, Keng P, Felch ME, Brown D, Phipps RP. 1992. Differential collagen and fibronectin production by Thy 1+ and Thy 1- lung fibroblast subpopulations. *Am J Physiol.* 263 : 283-290.
277. Ronnov-Jessen L, Peterson OW. 1993. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest.* 68 : 696-707.

278. Zentella A, Massague J. 1992. Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89 : 5176-5180.