

50216  
1997  
85

Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Présentée à l'Université de Lille I,  
pour l'obtention du titre de:  
Docteur ès Sciences de la Vie et de la Santé  
Option immunologie

par

Agnès BOITELLE

MECANISMES DE RECRUTEMENT ET DE REGULATION DE  
L'ACTIVITE DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES,  
DANS UN CONTEXTE DE PATHOLOGIE INTERSTITIELLE  
PULMONAIRE



Présentée le 9 avril 1997 devant la commission d'examen:

Président:	Professeur A. DHAINAUT
Rapporteurs:	Professeur M. AUBIER Professeur P.J BORM
Directeur de thèse:	Professeur B. WALLAERT
Examineur:	Professeur A.B TONNEL



*Car il n'est rien de caché qui ne doive être découvert,  
rien de secret qui ne doive être mis au jour.*

*Marc 4; 22.*

*Veillez donc, puisque vous ne savez ni le jour,  
ni l'heure.*

*Matthieu 25; 13.*

*Je voudrais ici exprimer ma plus vive reconnaissance à:*

***Monsieur le professeur Dhainaut,***

pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse,  
soyez assuré de ma reconnaissance.

***Monsieur le professeur Aubier,***

pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que rapporteur,  
parce que vos publications ont contribué à ma réflexion au cours de cette thèse,  
je tiens à vous assurer de mon respect et de ma gratitude.

***Monsieur le professeur Borm,***

pour votre disponibilité, manifestée par le fait d'avoir accepté  
de juger ce travail en tant que rapporteur malgré la barrière de la langue,  
veuillez ici trouver l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

***Monsieur le professeur Tonnel,***

pour m'avoir permis de réaliser ce travail et pour les trois années passées au sein de votre unité,  
pour l'honneur que vous me faites en participant aujourd'hui au jury de ma thèse,  
soyez très sincèrement remercié.

***Monsieur le professeur Wallaert,***

pour la confiance que vous m'avez manifestée en me confiant ce travail,  
pour votre enthousiasme et vos nombreuses idées, et parce que «c'est la vie»,  
soyez assuré de ma reconnaissance.

*A l'ensemble des membres de l'unité INSERM U416 de l'Institut Pasteur de Lille, merci,*

*Merci au Docteur Philippe Gosset, pour ta présence et ta disponibilité, pour tes conseils, pour nos discussions et digressions, et pour m'avoir, comme promis, donné un sens de l'ordre et de la mesure, merci.*

*Aux Docteurs Anne Tsicopoulos, Joël Pestel, Philippe Lassalle et Michel Joseph, pour m'avoir aidée et conseillée, chacun dans vos domaines de compétences, pour votre disponibilité, pour la parole et pour le chocolat réconfortants au bon moment, merci.*

*A Hikmat Akoum, Catherine Duez, Catherine Degros, Sophie Galand et Sophie Molet, pour avoir été pendant plus de trois années des collègues de travail passionnées, acharnées et attentionnées, et sûrement un peu plus ..., merci.*

*A Gwenola Kervoaze, Geneviève Marchandise, Han Vorng, Philippe Marquilles, et plus particulièrement Catherine Fourneau, pour votre aide précieuse, votre moral qui au gré du Yin et du Yang reste positif, parce que sans vous le travail est impensable, merci.*

*A Dominique Vanhée, Odile Parmentier, Sabine Szeremeta et Christine Merdy, qui bien que partis sur d'autres chemins restent présents dans mon esprit, pour les moments passés, merci.*

*A tous ceux, qui, membres d'autres laboratoires de cet Institut,  
ont contribué à ce que ces années de thèse soient agréables et  
fructueuses, qu'ils soient chercheurs confirmés ou  
étudiants en phase de le devenir,  
techniciens, ...  
merci.*

*A Monsieur le Professeur Capron,  
A Madame le Professeur Capron,  
A Madame le Docteur Dissous,  
encore merci.*

*Enfin, je tiens à remercier le Conseil régional du Nord - Pas de Calais et la  
caisse autonome nationale de la sécurité dans les mines,  
qui ont soutenu financièrement ce travail.*

*Je dédie cette thèse*  
*à tous ceux de mes enseignants*  
*qui ont su me donner le goût d'apprendre*  
*et répondre à ma volonté de comprendre,*  
*en commençant par Madame Ouflin,*  
*et avec une pensée toute particulière à Monsieur Masson,*  
*« l'accoucheur de chauve-souris »*  
*grâce à qui je me suis intéressée à la biologie*

*à ma famille,*

## *Publications*

Mc Nair A, Zemzoumi K, Lütcke H, Guillerm C, **Boitelle** A, Capron A. and Dissous C. Cloning of a signal-recognition-particule subunit of *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 1995; 81: 175-177.

Vanhée D, Gosset P, **Boitelle** A, Wallaert B. and Tonnel A.B. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal worker's pneumoconiosis. Eur Resp J. 1995; 8: 834-842.

Vanhee D, Molet S, Gosset P, Tillie-Leblond I, **Boitelle** A, Wallaert B. and Tonnel AB. Expression of leucocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . Clin Exp Immunol. 1996; 106: 541-548.

Wallaert B, Gosset P, **Boitelle** A and Tonnel A.B. *In vitro* assessment of environmental toxicology using alveolar cells as target. Cell Biol Toxicol. 1996; 12: 251-256.

**Boitelle** A, Gosset P, Vanhee D, Marquette CH, Wallaert B. and Tonnel A.B. MCP-1 secretion in lung from nonsmoking patients with coal worker's pneumoconiosis. Eur Resp J. 1997; 10: 557-562.

Molet S, Gosset P, Vanhée D, **Boitelle** A, Tillie-Leblond I, Wallaert B, Capron M and Tonnel A.B. Amplification of cytokine release by human endothelial cells stimulated by eosinophil supernatants. (En préparation)

**Boitelle** A, Gosset P, Wallaert B and Tonnel A.B. Alveolar macrophage-type II pneumocyte cooperation in proinflammatory cytokine production: Involvement of cell-to-cell contact and soluble mediator release. (En préparation)

## *Communications*

**Boitelle A**, Gosset P, Wallaert B. and Tonnel A.B. Type II pneumocyte - alveolar macrophage cooperation in IL-6 and TNF synthesis: Involvement of cell-to-cell contact and soluble mediator release. ATS International conference, 17-21 may 1997, San Francisco, California. ATS International conference, 16-21 May 1997, San Francisco.

**Boitelle A**, Gosset P, Wallaert B. and Tonnel A.B. Mécanismes d'induction de la réaction inflammatoire au niveau alvéolaire: Etude de la coopération macrophage-pneumocyte II pour la sécrétion d'interleukine 6. Société Française d'immunologie. 27-29 novembre 1996, Paris.

**Boitelle A**, Gosset P, Wallaert B. and Tonnel A.B. Coopération entre le pneumocyte de type II et le macrophage pour la sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$ : Implication des contacts cellulaires et de l'échange de médiateurs solubles. Forum des jeunes chercheurs. Institut Pasteur de Lille. 18 novembre 1996. Lille.

**Boitelle A**, Gosset P, Vanhee D, Wallaert B. and Tonnel A.B. MCP-1 in bronchoalveolar lavage from patients with coal worker's pneumoconiosis. ATS International conference, 20-24 May 1995, Seattle, Washington. Am J Resp Crit Care Med. 1995; 151: A571.

Vanhee D, Molet S, Gosset P, **Boitelle A**, Joseph M, Wallaert B. and Tonnel AB. Alveolar macrophage-derived induce adhesion molecule expression in the lung of pneumoconiotic patients. ATS International conference, 20-24 may 1995, Seattle, Washington. Am J Resp Crit Care Med. 1995; 151: A52.

# SOMMAIRE

<b>Liste des abréviations</b>	1
<b>Résumé</b>	2
<b>Introduction</b>	3
<b>Revue générale</b>	
<b>I - L'alvéole. Structure et composants cellulaires.</b>	5
A, La cellule endothéliale.	6
B, Le tissu interstitiel.	9
1, Les fibroblastes.	9
2, La matrice extracellulaire.	10
3, Interaction cellule - protéines de la matrice extracellulaire; rôle prépondérant des intégrines.	13
C, Les pneumocytes.	14
1, Le pneumocyte de type I.	14
2, Le pneumocyte de type II.	14
<b>II - Le macrophage alvéolaire.</b>	22
A, Origine.	22
B, Phagocytose.	24
C, Le macrophage alvéolaire régule la réponse immune.	25
D, Les médiateurs sécrétés par le macrophage alvéolaire.	27
<b>III - Mécanismes de défense de l'alvéole.</b>	39
A, Les voies aériennes supérieures.	39
B, Défense de l'alvéole: Une cellule clé, le macrophage alvéolaire.	39
C, Initiation et modulation de la réaction inflammatoire.	41
<b>IV - La pneumoconiose du mineur de charbon.</b>	45
A, Pneumoconiose simple et fibrose massive progressive.	45
B, Facteurs de risque de la pneumoconiose.	46
C, Fibrose.	48
D, Emphysème.	51
E, Conclusion.	52

## **Travaux de recherche.**

### ***I Etude de la production pulmonaire de chimiokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ et RANTES) chez des patients atteints de pneumoconiose de mineur de charbon.***

<i>Intérêt et but du travail.</i>	53
<i>Matériel et Méthodes.</i>	55
<i>Résultats.</i>	61
<i>Discussion.</i>	68
<i>Conclusion.</i>	74

### ***II Etude de la coopération entre les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires pour la production de cytokines.***

<i>Intérêt et but du travail.</i>	75
<i>Matériel et Méthodes.</i>	77
<i>Résultats.</i>	81
<i>Discussion.</i>	92
1, Mécanismes de la coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires.	
2, Intérêt et limite du modèle, perspectives.	97

<b><i>Conclusion générale.</i></b>	100
------------------------------------	-----

<b><i>Références bibliographiques.</i></b>	102
--	-----

## **Résumé.**

Représentant 90% des cellules de l'espace alvéolaire à l'état normal et situé à l'interface air-tissu du poumon, le macrophage alvéolaire assure la défense de l'alvéole: il phagocyte les contaminants organiques et inorganiques qui ont échappé au filtre des voies aériennes supérieures, et sécrète de nombreux médiateurs immunomodulateurs. Ces substances favorisent le recrutement de neutrophiles et de monocytes/macrophages, les défenses anti-bactériennes et anti-virales, mais peuvent aussi conduire à une inflammation chronique et à une lésion du tissu pulmonaire. Aussi, le macrophage alvéolaire est considéré comme une des cellules clés de l'initiation et de la modulation de la réaction inflammatoire au niveau de l'alvéole. C'est pourquoi, il est important de comprendre les mécanismes conduisant à son recrutement, ainsi que les facteurs régulant son activité. Le travail qui fait l'objet de cette thèse concerne ces deux thématiques: (1) l'analyse des mécanismes de recrutement des monocytes dans une pathologie interstitielle provoquée par une inhalation prolongée de poussière de charbon, la pneumoconiose du mineur de charbon; (2) l'étude de l'importance des interactions entre le macrophage alvéolaire et le pneumocyte de type II pour la sécrétion de chimiokines et de cytokines modulant l'inflammation.

(1) La pneumoconiose du mineur de charbon est, par sa fréquence et sa gravité, une des maladies professionnelles les plus importantes. Cette pathologie interstitielle est associée à une alvéolite macrophagique et au développement de lésions fibrotiques et emphysémateuses. Bien que l'alvéolite macrophagique soit considérée comme jouant un rôle essentiel dans le développement ultérieur de la fibrose, aucun médiateur potentiellement impliqué dans sa pathogénèse n'a à ce jour été évalué. Notre étude s'est focalisée sur trois chimiokines actives vis à vis des monocytes, le MCP-1, le MIP-1 et le RANTES. Nous avons montré que (1) les patients pneumoconiotiques présentent une importante surproduction de MCP-1 au niveau pulmonaire, sans que ce facteur puisse, seul, rendre compte de l'alvéolite macrophagique (2) en plus des macrophages alvéolaires, les fibroblastes et les pneumocytes de type II hyperplasiques sont probablement responsables de cette augmentation.

(2) Au niveau de l'alvéole pulmonaire, les macrophages alvéolaires sont en contact étroit avec les pneumocytes de type II, dont les propriétés modulatrices de la réaction inflammatoire ont été découvertes récemment. De façon à étudier les mécanismes de coopération macrophage alvéolaire - pneumocytes de type II pour la sécrétion des cytokines, nous avons développé, *in vitro*, un modèle de coculture des macrophages alvéolaires humains avec une lignée de pneumocyte de type II d'origine humaine. Nous avons mis en évidence un effet coopératif des macrophages alvéolaires et des pneumocytes de type II sur la sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$ , et avons démontré qu'il s'exerce, d'une part, par l'interaction des macrophages alvéolaires avec des composants de la matrice extracellulaire et, d'autre part, par l'intermédiaire de médiateurs solubles relargués par les pneumocytes de types II.

En plus de préciser certains mécanismes impliqués dans le recrutement et la régulation de l'activité du macrophage alvéolaire, l'ensemble de ce travail met en évidence la participation des pneumocytes de types II, classiquement considérés comme des cellules de structure, dans le développement de la réaction inflammatoire: ces cellules interviennent de façon directe dans le recrutement des monocytes, via la sécrétion de facteurs chimiotactiques et ont, d'autre part, la capacité de moduler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages alvéolaires.

## ***Introduction.***

Parce que sa fonction est d'assurer les échanges gazeux entre le sang circulant et l'air ambiant, le poumon est soumis à de multiples agressions par des agents organiques et inorganiques variés (pathogènes, allergènes, particules minérales ou gaz...). Si l'on considère sa surface (70 m<sup>2</sup>) et le volume d'air inspiré par jour, la fréquence des infections et des pathologies développées est remarquablement faible. Le poumon dispose de deux systèmes de défense. L'un mécanique, notamment par expectoration, et l'autre dépendant des mécanismes humoraux et cellulaires, et impliquant en premier lieu le macrophage alvéolaire. Cette cellule, qui représente 90% des cellules de l'espace alvéolaire à l'état physiologique, phagocyte les contaminants organiques et inorganiques qui ont échappé au filtre des voies aériennes supérieures, et produit de nombreux médiateurs (enzymes, composés du complément, radicaux oxygénés, dérivés de l'acide arachidonique et cytokines). Certaines de ces substances sont responsables du recrutement et de l'activation de neutrophiles et de monocytes / macrophages, ce qui favorise les défenses antibactériennes et antivirales, ainsi que la clairance des particules. Cependant, l'augmentation du nombre de macrophages activés au niveau de l'alvéole, si elle se prolonge, peut entraîner une inflammation chronique, provoquer des lésions du tissu pulmonaire, induire un processus de fibrose ou de destruction, et aboutir à l'établissement d'une pathologie irréversible. C'est pourquoi il est important de comprendre les mécanismes conduisant au recrutement des monocytes / macrophages vers l'alvéole, ainsi que les facteurs régulant son activité au niveau de celle-ci. Le travail qui fait l'objet de cette thèse concerne ces deux thématiques.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'étude de l'implication de trois chimiokines actives vis-à-vis des monocytes, le MCP-1, le MIP-1 et le RANTES, dans l'alvéolite macrophagique associée à la pneumoconiose du mineur de charbon. Cette pathologie interstitielle fibrosante représente, par sa fréquence et sa gravité, une des maladies professionnelles les plus importantes. Historiquement importante dans le Nord-Pas-de-Calais, elle concerne aujourd'hui encore plus de vingt-mille personnes en France. Cette pathologie, qui

a fait l'objet de nombreux travaux au sein de l'unité de recherche U416 où a été effectuée cette thèse, constitue de plus un modèle d'étude des pathologies interstitielles consécutives à une l'inhalation prolongée de particules minérales.

Dans un second temps, Nous avons analysé l'importance des interactions entre le macrophage alvéolaire et le pneumocyte de type II pour la sécrétion de cytokines (IL-6 et TNF) et de chimiokines (IL-8 et MCP-1) modulant l'inflammation. Un nombre croissant d'arguments suggèrent en effet que le pneumocyte de type II, longtemps considéré exclusivement comme une cellule de structure, aurait un rôle actif dans la modulation de la réaction inflammatoire. Bien que les macrophages alvéolaires soient en contact étroit avec les pneumocytes de type II au niveau de l'alvéole pulmonaire, peu de travaux avaient étudié la coopération entre le macrophage alvéolaire et le pneumocytes de type II pour la sécrétion des cytokines.

La revue générale a pour but de faire la synthèse des principales connaissances actuelles sur la structure et les composants cellulaires de l'alvéole, le macrophage alvéolaire et les mécanismes de défense de l'alvéole, ainsi que sur la pneumoconiose du mineur de charbon.

## ***I - L'alvéole. Structure et composants cellulaires.***

Le poumon est l'organe des échanges gazeux entre le sang circulant et l'air ambiant. Ces échanges s'effectuent au niveau des alvéoles, dilatations terminales des bronchioles se présentant sous forme de petites cavités enveloppées par un réseau de capillaires pulmonaires. L'épithélium alvéolaire est constitué de deux types de cellules, les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II (figure 1). Ceux-ci reposent sur une membrane basale et sont recouverts d'un fin film de fluide alvéolaire. Sous la barrière alvéolaire constituée par les pneumocytes se trouvent les cellules endothéliales capillaires (Crapo *et al.*, 1982). Les cellules endothéliales sont en contact étroit avec les pneumocytes de type I, les membranes basales de ces deux types cellulaires se confondant au niveau de la zone d'échange alvéolo-capillaire. Le dioxyde de carbone et l'oxygène s'échangent par diffusion à travers la barrière air - sang formée par la cellule endothéliale, le pneumocyte de type I (tous deux très aplatis), les membranes basales fusionnées de ces deux types cellulaires et le fluide alvéolaire qui couvre la face apicale des pneumocytes de type I. Le tissu interstitiel, situé entre les épithéliums de deux alvéoles, est composé de polysaccharides glycosaminoglycannes et de protéines fibreuses formant un réseau dans lequel sont distribuées des cellules, de façon éparse. Ces cellules sont majoritairement des fibroblastes qui assurent la synthèse de composants matriciels et notamment des collagènes. D'autres cellules sont plus rarement mise en évidence: des cellules musculaires lisses, des péricytes, des macrophages interstitiels et des cellules dendritiques. Dans l'espace alvéolaire, au contact des pneumocytes, se trouvent essentiellement des macrophages, mais aussi des neutrophiles, des éosinophiles, des lymphocytes, dont le rôle est d'assurer la défense de l'alvéole.

# **Revue générale.**

## **I - L'alvéole. Structure et composants cellulaires.**

A, La cellule endothéliale.

B, Le tissu interstitiel.

1, Les fibroblastes.

2, La matrice extracellulaire.

3, Interaction cellule - protéines de la matrice extracellulaire;  
rôle prépondérant des intégrines.

C, Les pneumocytes.

1, Le pneumocyte de type I.

2, Le pneumocyte de type II.

## **II - Le macrophage alvéolaire.**

A, Origine.

B, Phagocytose.

C, Le macrophage alvéolaire régule la réponse immune.

E, Les médiateurs sécrétés par le macrophage alvéolaire.

## **III - Mécanismes de défense de l'alvéole.**

A, Les voies aériennes supérieures.

B, Défense de l'alvéole: Une cellule clé, le macrophage alvéolaire.

C, Initiation et modulation de la réaction inflammatoire.

## **IV - La pneumoconiose du mineur de charbon.**

A, Pneumoconiose simple et fibrose massive progressive.

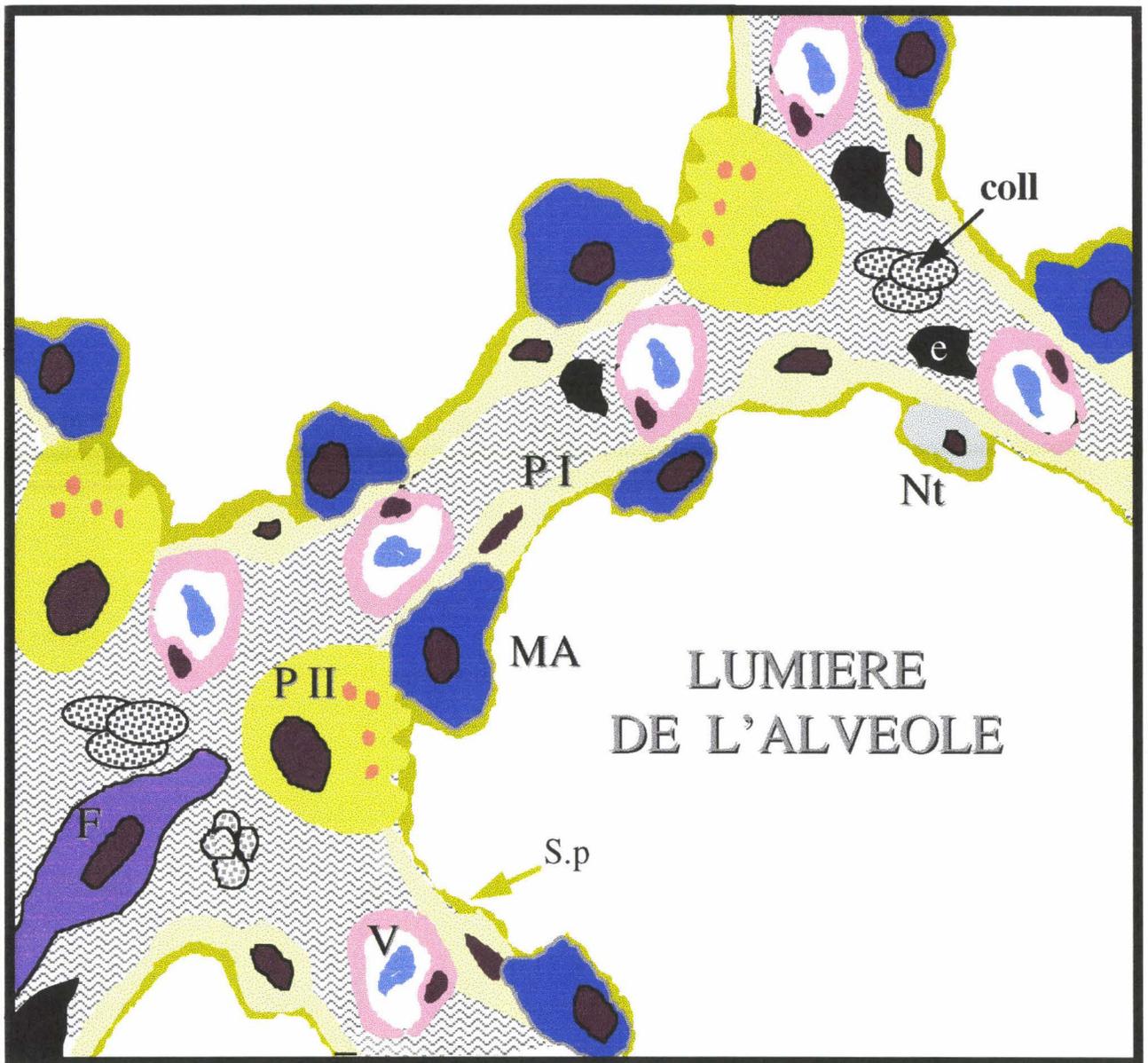
B, Facteurs de risque de la pneumoconiose.

C, Fibrose.

D, Emphysème.

E, Conclusion.

# L'ALVEOLE



**Figure 1: Schéma de l'alvéole**

PI: Pneumocyte de type I; PII: Pneumocyte de type II;  
F: Fibroblaste; V: Vaisseau; coll: collagène; e: élastine;  
MA: Macrophage alvéolaire; N: Neutrophile;  
S.p: surfactant pulmonaire.

## ***A, La cellule endothéliale.***

Les cellules endothéliales capillaires représentent 30% des cellules pulmonaires (Crapo *et al.*, 1982) et constituent le plus vaste réseau capillaire de l'organisme humain. A proximité du noyau, le cytoplasme de ces cellules contient des mitochondries, des appareils de Golgi, ribosomes et d'autres structures témoignant de leur activité métabolique. A l'inverse, leurs extensions cytoplasmiques, qui ont une épaisseur inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , sont dépourvues en organelles spécialisées mais contiennent de nombreuses vésicules de pinocytose, ouvertes sur l'espace vasculaire (Ryan et Ryan, 1977). Les cellules endothéliales sont en contact étroit les une avec les autres, associées par des jonctions serrées (Tight and gap junction) (Schneeberger, 1981).

**Les cellules endothéliales constituent une barrière physique continue entre l'air alvéolaire et le sang circulant.** Elles assurent la diffusion rapide des gaz, de façon passive, tout en régulant l'échange des liquides et des solutés. Ce sont de plus des cellules spécialisées pour le transport de matériel entre le sang et les tissus (Simionescu, 1981). La cellule endothéliale est très sensible aux agressions. La lésion de l'endothélium pulmonaire provoque une perméabilité vasculaire accrue qui peut conduire à la formation d'oedèmes, à l'initiation d'une alvéolite et, de façon plus rare, au développement d'une fibrose.

**Les cellules endothéliales produisent des métabolites de phospholipides membranaires pouvant augmenter la vasoperméabilité:** le PAF (Platelet activating factor), et des dérivés de l'acide arachidonique, les leucotriènes LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub>, et la prostaglandine PGE<sub>2</sub>.

**Les cellules endothéliales régulent la vasomotricité.** Elles capturent et dégradent l'adénosine triphosphate et l'adénosine diphosphate qui sont de puissants vasodilatateurs ainsi que la sérotonine et de la norepinephrine qui sont, quand à eux, de puissants vasoconstricteurs. Elles synthétisent et sécrètent des substances vasodilatatrices, telles

l'oxyde nitrique et les prostaglandines PGI<sub>2</sub> (prostacycline) et PGE<sub>2</sub>, et d'autres vasoconstrictrices, telles l'endothéline et le PAF. Les cellules endothéliales expriment de façon constitutive l'enzyme de conversion de l'angiotensine, enzyme qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II (puissant vasoconstricteur) et dégrade la bradykinine (puissant vasodilatateur). Leur activité constrictrice est augmentée dans les conditions d'hypoxie, et diminuée dans les conditions d'hyperoxie. (Revue. Berlin et Lenfant, 1982; Delneste, 1993).

**Les cellules endothéliales peuvent moduler l'inflammation.** Sous l'influence d'endotoxines et de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 et le TNF $\alpha$ , elles produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6), des chimiokines (IL-8, RANTES) et des facteurs de croissance (G-CSF, M-CSF, GM-CSF) (Revue. Tonnel *et al.*, 1996). Les cellules endothéliales produisent d'autre part des phospholipides chimiotactiques pour les phagocytes: le PAF (Lewis *et al.*, 1988), le LTC<sub>4</sub>, le LTD<sub>4</sub> (Feinmark et Cannon, 1986), le PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et le PGE<sub>2</sub> (qui est de plus un inhibiteur des lymphocytes Th1 et B) (Johnson *et al.*, 1981).

**Le réseau de capillaires pulmonaires constitue un réservoir important de leucocytes, constitué essentiellement de neutrophiles.** Ces leucocytes forment le pool marginé pulmonaire qui peut être rapidement mobilisé afin de répondre aux agressions (Ambrus *et al.*, 1954). Cette rétention des cellules aux niveau des capillaires est due à la faible pression sanguine (Karatzas et Lee, 1969), à la taille importante des leucocytes (environ 10  $\mu$ m de diamètre) par rapport au diamètre des capillaires (4 à 6  $\mu$ m) (Schmid-Schonbein *et al.*, 1980) et aussi à l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules d'adhérence (Bevilacqua *et al.*, 1985). Les cellules endothéliales expriment certaines molécules d'adhérence de façon constitutive, comme les molécules de la super-famille des immunoglobulines telles L'ICAM-1, l'ICAM-2 (ligand des intégrines LFA-1 et Mac-1 exprimées par tous les leucocytes) et, de façon moins importante, le VCAM-1 (intervenant dans l'adhérence des monocytes, des lymphocytes T, des éosinophiles et des basophiles) (Schleimer *et al.*, 1992). L'expression de ces molécules d'adhérence est fortement augmentée par le LPS et des cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Dustin *et al.*, 1988;

Wellicome *et al.*, 1990). D'autres molécules d'adhérence ne sont exprimées par les cellules endothéliales que lorsqu'elles sont activées. C'est le cas de la E-sélectine (ELAM-1) (dont l'expression, transitoire, est induite par le LPS, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ ) (Bevilacqua *et al.*, 1987), de la L-sélectine (impliquée dans la localisation des leucocytes dans les organes lymphoïdes périphériques) (Revue, Butcher, 1990) et de la P-sélectine (qui médie essentiellement l'adhérence des neutrophiles) (McEver *et al.*, 1989). L'expression accrue des molécules d'adhésion, en réponse aux signaux pro-inflammatoires et chimiotactiques, permet une adhérence plus forte des leucocytes aux cellules endothéliales, indispensable à la diapédèse des leucocytes. Les mécanismes de base de la migration transvasculaire semblent nécessiter l'activation des cellules endothéliales (Gundel *et al.*, 1991). Celles-ci, normalement jointives, vont se disjoindre temporairement, permettant ainsi aux leucocytes de quitter la lumière des vaisseaux. Les cellules endothéliales ont donc un rôle crucial dans la régulation de la migration leucocytaire transvasculaire (Revue, Issekutz, 1992)

## ***B, Le tissu interstitiel.***

Le tissu interstitiel est constitué d'une matrice extracellulaire dans laquelle des cellules, majoritairement des fibroblastes, sont distribuées de façon éparse.

### ***1, Les fibroblastes.***

L'interstitium est occupé pour la moitié de son volume par des cellules. Celles-ci ne sont pas associées entre elles, mais sont entourées de tissu conjonctif. Parmi ces cellules, des cellules musculaires lisses, des péricytes (cellules aplaties entourant les cellules endothéliales capillaires et pouvant avoir une fonction contractile) et les cellules effectrices (macrophages, mastocytes, lymphocytes, cellules dendritiques) peuvent être mises en évidence. Toutefois, les fibroblastes constituent la grande majorité des cellules de l'interstitium.

Les fibroblastes sont des cellules allongées, contenant un large noyau ovale, et dont le cytoplasme est riche en organites, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et mitochondries. Leur fonction principale est la synthèse des composants de la matrice extracellulaire: glycosaminoglycanes, fibronectine et collagènes. Les collagènes de type I et de type III sont les produits majeurs de sécrétion des fibroblastes et représentent respectivement 80 et 15 à 20% du collagène synthétisé par ces cellules. Les fibroblastes sécrètent aussi des enzymes, dont la collagénase, et des inhibiteurs de métalloprotéases (TIMPs).

## **2, La matrice extracellulaire.**

### **a, composition.**

La matrice extracellulaire est un réseau complexe composé de deux classes principales de macromolécules, les polysaccharides glycosaminoglycannes et les protéines fibreuses (Revue par Alberts et al., 1992).

#### **$\alpha$ , Les polysaccharides glycosaminoglycannes.**

A l'exception de l'acide hyaluronique, polysaccharide acide de  $4 \times 10^3$  à  $8 \times 10^6$  daltons, les glycosaminoglycannes sont tous liés de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycannes (comme l'héparine et l'héparane sulfate). Ces molécules n'atteignent pas 10% du poids des protéines fibreuses mais remplissent la plus grande partie de l'espace extracellulaire; très hydrophiles, elles forment un gel dans lequel sont noyées les protéines fibreuses. Cette phase aqueuse permet la diffusion des nutriments, des métabolites, des hormones du sang et des cellules du tissu. Les glycosaminoglycannes permettent à la matrice extracellulaire de résister aux forces de compression. Ces macromolécules peuvent être dégradées par de nombreuses enzymes dont l'élastase leucocytaire et, dans le cas de l'acide hyaluronique, la hyaluronidase. (Revue par Alberts et al., 1992).

#### **$\beta$ , Les protéines fibreuses sont soit structurales (collagène, élastine), soit adhésives (fibronectine, laminine).**

**Les fibres de collagène** sont les principales protéines du tissu conjonctif, représentant 60 à 70% de l'ensemble de la trame conjonctive pulmonaire. Elles résistent aux forces d'étirement et participent à l'organisation de la matrice extracellulaire. L'unité fondamentale du collagène est le tropocollagène, protéine formée de trois sous-unités polypeptidiques de 1050 acides-aminés (chaînes  $\alpha$ ), enroulées l'une sur l'autre pour former une triple hélice droite maintenue par des liaisons hydrogènes. Dans l'espace extracellulaire, les molécules de tropocollagène se polymérisent pour former des fibres de collagène, insolubles et fortement résistantes à la tension. Il existe 20 chaînes  $\alpha$  différentes mais seulement 12 types de

collagène. Les principaux collagènes du tissu conjonctif sont les collagènes de type I et de type III, qui représentent respectivement 60-70% et 30% du collagène dans le poumon sain. Les collagènes peuvent être clivés, au trois quart de leur partie N terminale, par les collagénases. Les deux composants générés sont spontanément dénaturés à la température corporelle, ce qui les rend sensibles à l'attaque par des enzymes protéolytiques moins spécifiques et à l'ingestion par les macrophages. (Revue Kelley, 1989)

**L'élastine**, protéine hydrophobe de 830 acides-aminés, est le composant principal du réseau de fibres élastiques qui confèrent son élasticité au tissu conjonctif pulmonaire. Elle représente 20 à 30% du tissu conjonctif pulmonaire.

**La fibronectine** est un homodimère dont les deux sous-unités de 2500 acides-aminés, riches en groupes carbohydrés (sucres et acide sialique), sont reliées par un pont disulfure. La fibronectine existe sous trois formes: (1) Sous forme d'oligomère, elle peut être attachée de façon transitoire, à la surface des cellules. (2) La fibronectine plasmiqque est la forme circulante dans le sang et les autres fluides corporels, et peut aussi être incorporée dans la matrice extracellulaire. Elle favorise la coagulation, la cicatrisation et la phagocytose. Cette forme est présente dans les fluides de lavage bronchoalvéolaire (LBA) de sujets sains et à des taux plus élevés dans ceux de sujets fumeurs et de patients atteints de fibrose idiopathique diffuse. (3) La fibronectine matricielle correspond aux fibrilles insolubles de la matrice extracellulaire. La fibronectine est une glycoprotéine d'adhérence. Elle présente des sites de fixation, distincts et séparés, à la fois pour les récepteurs de surface cellulaire et pour d'autres protéines telles le collagène natif, le collagène dénaturé (gélatine), la fibrine, les protéoglycannes (comme l'acide hyaluronique et l'héparine). La fibronectine a un rôle important non seulement dans l'adhérence, mais aussi dans la migration cellulaire. La dégradation de la fibronectine par les protéases comme l'élastase peut rompre l'architecture de la matrice et exposer ainsi le collagène et l'élastine à l'attaque d'enzymes moins spécifiques. (Revue par Gee et Walker Smith, 1983; Ruoslahti, 1988)

**La laminine** est une glycoprotéine de  $85 \times 10^3$  daltons qui se trouve majoritairement dans les membranes basales. Elle se lie à la fois aux cellules, notamment les cellules épithéliales, et au collagène de type IV, principal collagène de la membrane basale.

***b, Particularités de la membrane basale.***

La membrane basale est une mince matrice extracellulaire spécialisée qui se trouve à l'interface des cellules épithéliales et du tissu conjonctif sous-jacent. Elle exerce un rôle fondamental dans la régénération tissulaire après une lésion. Quand l'épithélium est endommagé, la membrane basale constitue une charpente qui guide la migration des cellules en voie de régénération. La membrane basale sert aussi de barrière sélective, elle empêche les fibroblastes du tissu conjonctif sous-jacent d'entrer en contact avec les cellules épithéliales mais laisse passer les macrophages et les lymphocytes. Enfin, la membrane basale détermine la polarité cellulaire, influe sur le métabolisme cellulaire et induit la différenciation cellulaire.

La membrane basale est composée essentiellement de collagène de type IV, d'héparane sulfate et de laminine. Le collagène de type IV est spécifique des membranes basales. Contrairement aux autres types de collagène, il ne forme pas des fibrilles mais s'assemble en un réseau sous forme de feuillet. La membrane basale est constituée de plusieurs couches distinctes, la *lamina lucida*, adjacente à la membrane plasmique basale des cellules épithéliales, la *lamina densa* située en dessous et la *lamina réticularis*, contenant des fibrilles de collagène, qui relie la membrane basale au tissu conjonctif adjacent.

### ***3, Interaction cellule - protéines de la matrice extracellulaire; rôle prépondérant des intégrines.***

Les cellules possèdent différents domaines de liaison à la matrice extracellulaire: la membrane plasmique des cellules est composée de façon intrinsèque de protéoglycanes qui se lient à la plupart des composants de la matrice extracellulaire. De plus les cellules expriment à leur surface des récepteurs glycoprotéiques spécifiques. Parmi ceux-ci, les intégrines sont les mieux caractérisées. Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  associées de façon non covalente. Les intégrines sont classées en sous-familles en fonction de leur sous-unité  $\beta$ . Huit sous-unités  $\beta$  différentes et quatorze sous-unités  $\alpha$  ont été caractérisées à ce jour. Chacune de ces sous-unités est une glycoprotéine transmembranaire ayant un unique domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine cytoplasmique court (inférieur à 50 acides-aminés), qui interagit avec les protéines du cytosquelette. Le site d'interaction des intégrines à leur substrat est formé à la fois par le domaine N terminal de la chaîne  $\alpha$  et de la chaîne  $\beta$ .

Toutes les sous-familles d'intégrines n'interagissent pas avec les protéines de la matrice extracellulaire. La sous-famille  $\beta 1$  des intégrines, aussi appelée VLAs, comprend des récepteurs pour de nombreux composants de la matrice extracellulaire. La plupart des intégrines reconnaissent la séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) qui se trouve sur la fibronectine, le fibrinogène, la laminine, la vitronectine et certains collagènes (notamment le collagène de type I), mais certaines, comme le VLA4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) et l' $\alpha 4\beta 7$  reconnaissent la séquence Glu-Ile-Asp-Leu-Val (EIDLV) de la région CS-1 de la fibronectine ou le VLA2 qui interagit avec la séquence Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) du collagène de type I et de la laminine. (Ruoslahti et Pierschbacher, 1987; Revue par Albelda et Buck, 1990; Ruoslahti, 1991).

## ***C, Les pneumocytes.***

### ***1, Le pneumocyte de type I.***

Les pneumocytes de type I représentent 8% des cellules de la région alvéolaire mais couvrent plus de 90% de la surface alvéolaire (Crapo *et al.*, 1982). Ce sont des cellules quiescentes, aplaties, pauvres en organites. Presque tout le métabolisme énergétique de ces cellules sert au maintien de leurs structures. Les pneumocytes de type I favorisent un échange efficace de l'oxygène et du dioxyde de carbone grâce à leur amincissement extrême, mais empêchent en même temps le passage de la plupart des molécules et de l'eau. Les pneumocytes de type I, très sensibles aux agressions, ne peuvent être renouvelés après leur destruction que par la multiplication des pneumocytes de type II qui se différencient ensuite en pneumocytes de type I (Mason *et al.*, 1977).

### ***2, Le pneumocyte de type II.***

Les pneumocytes de type II représentent environ 15% du total des cellules alvéolaires. Ce sont des cellules de forme cuboïdale, localisées au coin des alvéoles (Crapo *et al.*, 1982). Le pneumocyte de type II est une cellule polarisée, sa face apicale, alvéolaire, présente de nombreuses microvillosités. Le pneumocyte de type II est une cellule sécrétoire au métabolisme actif, son cytoplasme est riche en organites, inclusions lamellaires et granulations de type sécrétoires.

#### ***a, Responsable du maintien de l'intégrité de l'alvéole.***

Le pneumocyte de type II est classiquement décrit comme responsable du maintien de l'intégrité de l'alvéole:

### ***α, Cellule souche de l'épithélium alvéolaire.***

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le pneumocyte de type II est une véritable cellule souche de l'épithélium alvéolaire. Lorsque les pneumocytes de type I sont détruits suite à une agression, la membrane basale est mise à nue. Les pneumocytes de type II, plus résistants que les pneumocytes de type I, prolifèrent et se différencient en pneumocytes de type I, assurant ainsi la réépithélisation alvéolaire (Voekler et Mason, 1989). Les pneumocytes de type II sont moins sensibles aux agressions que les pneumocytes de type I du fait de leur surface moins importante et de leur contenu riche en enzymes anti-oxydantes (Freeman *et al.*, 1986). Il semble que la régénération rapide de l'épithélium par les pneumocytes de type II soit essentielle pour prévenir les processus de fibrose suite à la lésion de l'épithélium (Hascheck et Witschi, 1979). Le signal de prolifération, simple perte d'inhibition de contact ou facteur plus spécifique, n'est pas connu. Durant la phase de réparation, le nombre de pneumocytes de type II augmente de façon transitoire, puis la proportion de pneumocyte de type I par rapport au pneumocyte de type II est restaurée. Si la lésion est chronique, les pneumocytes de type II se divisent mais ne se différencient plus en pneumocytes de type I. Dès lors, une partie de l'alvéole est délimitée par des cellules cubiques de type II, ce qui réduit la surface disponible aux échanges gazeux. Les pneumocytes de type II isolés en culture perdent leurs caractéristiques et se différencient en cellules présentant un phénotype semblable à celui des pneumocytes de type I (Edelson *et al.*, 1989).

### ***β, Contrôle du volume de fluide alvéolaire.***

Le fluide alvéolaire, qui recouvre la surface alvéolaire, résulte de la combinaison entre le surfactant sécrété par le pneumocyte de type II, l'exsudation plasmatique des capillaires sous-jacents et les produits de sécrétion du macrophage alvéolaire (lysosyme, fibronectine). Le pneumocyte de type II contrôle le volume de fluide alvéolaire, de façon à le maintenir minimal, condition nécessaire à un bon échange gazeux. Cette régulation fait intervenir des mécanismes de transports actifs de sodium (et autres solutés), du fluide alvéolaire vers l'espace interstitiel, qui créent un gradient de pression osmotique et un mouvement d'eau passif contre celui-ci (Mason *et al.*, 1982; Sakuma *et al.*, 1994).

### *γ, Renouveaulement du surfactant pulmonaire.*

Le pneumocyte de type II synthétise, stocke, sécrète et recycle le surfactant pulmonaire qui tapisse la surface des alvéoles. Le surfactant pulmonaire est composé à 90% de lipides (majoritairement des phospholipides, du triacylglycérol et du cholestérol), 10% de protéines (au nombre de quatre, les protéines du surfactant SP-A, SP-B, SP-C et SP-D) et de carbohydrate à l'état de traces (Rooney *et al.*, 1994). C'est une substance tensioactive, qui abaisse la tension superficielle des alvéoles et empêche ainsi leur collapsus télé-expiratoire spontané (Goerke, 1974).

### *δ, Renouveaulement de la membrane basale.*

Le pneumocyte de type II intervient dans la synthèse et la dégradation de certains composants de la matrice extracellulaire, participant ainsi au remodelage de la membrane basale (Ranels *et al.*, 1992). Le pneumocyte de type II synthétise et sécrète de la fibronectine, du collagène de type IV, de la laminine, des protéoglycanes, de la thrombospondine et de l'acide hyaluronique (Sage *et al.*, 1983; Rannel *et al.*, 1987; Dunsmore *et al.*, 1995). Il a été rapporté qu'une lignée cellulaire de l'épithélium pulmonaire foetal de rat (FRLE) synthétisait du collagène de type I, de type III, et de type V (Federspiel, 1990) mais aucune preuve n'a été établie à ce jour quand à une activité analogue du pneumocyte de type II de poumon adulte. Le pneumocyte de type II sécrète deux sortes d'enzymes protéolytiques: certaines ont la capacité intrinsèque de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire (Ranels *et al.*, 1992) alors que d'autres initient une cascade protéolytique conduisant à l'activation des métalloprotéases qui peuvent alors dégrader le collagène (Werbs *et al.*, 1977). Le pneumocyte de type II produit d'autre part des inhibiteurs de protéases, tels l' $\alpha$ 1-antitrypsine, principal inhibiteur des sérines protéases (et en particulier de l'élastase) (Venembre *et al.*, 1994), et le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1), un inhibiteur des activateurs du plasminogène, sous forme soluble dans l'espace alvéolaire ainsi que sous forme intégrée à la matrice extracellulaire (Parton *et al.*, 1992).

### ***ε, Participation à la réparation tissulaire.***

Il a été montré plus récemment que, comme la plupart des autres cellules épithéliales, le pneumocyte de type II participe, par la synthèse de facteurs paracrines, à la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules avoisinantes après les agressions: en condition d'hyperoxie, qui conduit à la destruction de cellules endothéliales, le pneumocyte de type II sécrète des taux accrus de VEGF (vascular endothelial growth factor), facteur de croissance mitogénique spécifique des cellules endothéliales. Il contribue de ce fait à la restauration de l'endothélium vasculaire et prévient ainsi les processus de fibrose.

### ***b, Pneumocyte de type II et défense pulmonaire.***

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le pneumocyte de type II aurait aussi un rôle dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires au niveau de l'alvéole.

### ***α, Cellule présentatrice d'antigène.***

Le pneumocyte de type II présente toutes les caractéristiques d'une cellule présentatrice d'antigène. Il possède la machinerie nécessaire à la transformation et à la présentation des antigènes: le pneumocyte de type II est capable de capter les molécules qui se trouvent à sa surface et de les dégrader grâce à ses enzymes lysosomiales (Williams, 1984). Il exprime des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II (Cunningham, 1994) ainsi que l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), qui peut agir en tant que molécule accessoire lors de la présentation des antigènes au lymphocytes T. Enfin, des études *in vitro* ont montré que les pneumocytes de type II peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigène dans les réactions leucocytaires mixtes, et stimuler la prolifération des lymphocytes T allogéniques (Armstrong *et al.*, 1992).

### ***β, Intervention dans la migration des cellules phagocytaires à la surface de l'alvéole.***

Le pneumocyte de type II peut interagir avec les cellules inflammatoires via des mécanismes dépendant des contacts cellulaires. Il exprime des carbohydrates de surface qui permettent l'adhérence des neutrophiles (Crestani *et al.*, 1993). D'autre part, l'ICAM-1 qu'il exprime à sa surface est le ligand naturel des  $\beta$ 2-integrines LFA-1 (leucocyte function associated antigen-1) (CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18) exprimées par les leucocytes. Cette expression d'ICAM-1 par le pneumocyte de type II est différente selon les espèces étudiées. Chez la souris, l'ICAM-1 est exprimé, dans le poumon sain, à la surface apicale des pneumocytes de type I et de façon beaucoup moins importante à la surface des pneumocytes de type II. L'expression d'ICAM-1 par les pneumocytes de type II est induite par l'hyperoxie (Kang *et al.*, 1993). Chez le rat, l'ICAM-1 n'est pas détecté à la surface des pneumocytes de type II fraîchement isolés, mais apparaît après un jour de culture et est fortement exprimé lorsqu'ils se différencient en pneumocyte de type I (Christensen *et al.*, 1993). Chez l'humain, contrairement à ce que l'on observe chez ces rongeurs, l'ICAM-1 est exprimé de façon constitutive par les pneumocytes de type II (Guzman *et al.*, 1994). Cette expression favorise probablement la migration des phagocytes à la surface des alvéoles et les mécanismes d'adhérence des leucocytes lors des alvéolites inflammatoires.

### ***γ, Propriétés immunorégulatrices du surfactant pulmonaire***

Les composants du surfactant ont, outre leur propriété tensioactive, des caractéristiques immunorégulatrices: Il a été montré que le surfactant pulmonaire synthétique inhibait la sécrétion de cytokines (IL-6, TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) par le macrophage alvéolaire préalablement activé par des endotoxines (Thomassen *et al.*, 1992). Les phospholipides du surfactant peuvent inhiber la réponse lymphocytaire T (Ansfield et Benson, 1980; Sitrin *et al.*, 1985) ainsi que la production, par les macrophages alvéolaires, de métabolites de l'acide arachidonique (Foldes-Folep *et al.*, 1994) et de radicaux libres de l'oxygène (Hayakawa *et al.*, 1989). La protéine du surfactant SP-A peut participer à l'opsonisation de cellules infectées par des virus (Van Iwaarden *et al.*, 1992a) et des bactéries (Mc Neely et Coonrod, 1994). De

même, la protéine du surfactant SP-D peut se lier aux bactéries et, à forte concentration, causer leur agglutination ( Kuan *et al.*, 1992). La protéine du surfactant SP-A, en interagissant avec des récepteurs spécifiques de forte affinité exprimés par les macrophages alvéolaires ( Kuroki *et al.*, 1988), induit leur migration, leur activité phagocytaire (Tenner *et al.*, 1989) et leur sécrétion d'IL-3 et de GM-CSF (Blau *et al.*, 1994). Enfin, les protéines du surfactant SP-A et SP-D modulent l'activité oxydative des macrophages alvéolaires (Van Iwaarden *et al.*, 1990,1992b; Katsura *et al.*, 1993).

#### *δ, Synthèse des protéines du complément.*

Le pneumocyte de type II synthétise et sécrète les protéines du complément C2, C3, C4, C5 et le facteur B (Strunck *et al.*, 1988). Lorsqu'elle est activée, la cascade du complément produit des fragments peptidiques qui sont chimiotactiques pour les leucocytes, activent les phagocytes, opsonisent les micro-organismes, lysent directement les cellules, provoquent le catabolisme de l'acide arachidonique membranaire des neutrophiles, et augmentent le flux sanguin au site d'activation ainsi que la perméabilité capillaire aux molécules du plasma. En produisant les molécules du complément, le pneumocyte de type II peut servir à amplifier ces processus.

#### *ε, Production des dérivés de l'acide arachidonique.*

Le pneumocyte de type II génère des dérivés de l'acide arachidonique, notamment les prostaglandines PGE2 et PGI2 (Van Overeld *et al.*, 1992). La PGE2 ainsi produite a des propriétés vasodilatatrices et inhibitrices de l'activation des lymphocytes T, de la prolifération fibroblastique et de la synthèse de collagène par ceux-ci. Contrairement aux autres activités du pneumocyte, il semble que cette synthèse augmente lorsque le pneumocyte de type II se différencie en pneumocyte de type I (Lipchik *et al.*, 1990). De plus, le pneumocyte de type II contribue à la synthèse de métabolites de l'acide arachidonique par d'autres cellules. L'acide arachidonique relargué par ce dernier peut être capté par le macrophage alvéolaire et métabolisé en différents produits tels le leucotriène B4 (LTB4) et l'acide 12-hydroxyeicosatetraénoïque (Chaucey *et al.*, 1988). De même, la culture de neutrophiles avec des pneumocytes de type II

résulte en une production de LTB<sub>4</sub> supérieure à celle des neutrophiles seuls (Grimminger *et al.*, 1992). Ce LTB<sub>4</sub> contribue alors au recrutement des neutrophiles, des monocytes et des éosinophiles, et agit en synergie avec la PGE<sub>2</sub> pour la perméabilité vasculaire.

### *ζ, Sécrétion de cytokines.*

Les cultures primaires de pneumocytes de type II de rat synthétisent et sécrètent du GM-CSF, qui active les neutrophiles et les éosinophiles, stimule la prolifération ainsi que l'activité cytolytique des macrophages, augmente l'activité immunostimulante des cellules dendritiques et initie l'activité des lymphocytes T. Ces mêmes cultures produisent de l'IL-3, qui présente des propriétés communes avec le GM-CSF et est impliqué dans la réponse éosinophilique (Blau *et al.*, 1994).

D'autre part, le pneumocyte de type II participe vraisemblablement au recrutement des cellules de l'inflammation. Sous l'effet d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$ , monokines dérivées des macrophages, la lignée cellulaire de pneumocyte de type II humain A549 sécrète de l'IL-8, du MCP-1, respectivement chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes, et de l'IL-6. (Standiford *et al.*, 1990, 1991; Crestani *et al.*, 1994). De la même façon, la production de RANTES (chimiotactique pour les monocytes) par les pneumocytes de type II de rat est inductible par le TNF $\alpha$  (Van Otteren *et al.*, 1995). De façon intéressante, ces chimiokines ne sont pas directement inductibles par les endotoxines bactériennes, mais par des cytokines de la réponse immédiate. Cependant, contrairement à ce qui est observé pour la lignée humaine A549, le LPS peut induire la sécrétion de MCP-1 par les pneumocytes de type II de rat en culture primaire (Paine *et al.*, 1993). Bien que la différence de réponse ne soit pas comprise, ces observations suggèrent que le pneumocyte de type II participe à la réponse inflammatoire contre les bactéries, soit en amplifiant l'effet des macrophages alvéolaires, soit en répondant directement aux endotoxines bactériennes. La sécrétion d'IL-8 par la lignée cellulaire A549 peut aussi être induite par une infection virale, tout comme la production d'IL-6 et de TNF-R1 (Arnold *et al.*, 1994). De même, l'infection d'une culture primaire de pneumocyte de type II de rat par le virus influenza induit le production d'IFN (Hahon et Castranova, 1989).

*η, Activité immunorégulatrice du pneumocyte hyperplasique.*

De nombreuses pathologies, telles que celle causée par l'hyperoxie (Crapo *et al.*, 1980), le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS) (Standley *et al.*, 1992), les infections virales, la sarcoïdose, la pneumoconiose, la fibrose interstitielle diffuse idiopathique ou secondaire, sont caractérisées par l'hyperplasie des pneumocytes de type II. Cette modification morphologique est associée à une activité mitotique accrue. D'autre part, il a été montré par immunomarquage sur coupes de poumons fibrotiques humains que les pneumocytes hyperplasiques exprimaient, *in vivo*, certaines cytokines pro-inflammatoires tels l'IL-6 (Crestani *et al.*, 1994) et le TNF $\alpha$  (Nash *et al.*, 1993), anti-inflammatoires tels le TGF $\beta$  (Khalil, 1991) et l'IL-1Ra (Smith *et al.*, 1995), chimiotactiques comme le MCP-1 (Antoniade *et al.*, 1992) et du facteurs de croissance aux propriétés fibrosantes, le PDGF (Antoniades *et al.*, 1990).

Ainsi, le pneumocyte de type II, et dans une moindre mesure le pneumocyte de type I, participent vraisemblablement aux mécanismes de défense non-spécifiques dirigés contre les pathogènes, à la modulation de la réponse immune, au recrutement et à la modulation de l'activité fonctionnelle des cellules inflammatoires ainsi qu'aux processus de fibrose.

## ***II - Le macrophage alvéolaire.***

Le macrophage alvéolaire est une grande cellule dont la forme irrégulière, de par la présence de nombreuses invaginations et la surface riche en microvillosités, traduit la motilité, la phagocytose et la sécrétion. Son noyau excentré, comprenant un ou deux nucléoles et une chromatine nucléaire diffuse, et son cytoplasme abondant, riche en mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, inclusions cytoplasmiques, granules, vacuoles et vésicules de pinocytose, reflètent son métabolisme très actif.

Le macrophage alvéolaire se déplace sur la cellule épithéliale, sous le surfactant. Du fait de sa situation entre l'air et les tissus sous-jacents, le macrophage alvéolaire est directement exposé aux particules organiques et inorganiques qui ont échappé au filtre des voies respiratoires. Le macrophage alvéolaire est une cellule phagocytaire mononucléée, à fort pouvoir microbicide impliqué dans les mécanismes de défense non-immunitaire. De plus, il initie et module la réponse immunitaire, joue un rôle central dans l'inflammation locale et participe à la réparation tissulaire. De par ses propriétés, le macrophage alvéolaire est considéré comme une cellule clé du poumon profond.

### ***A, Origine***

Les macrophages sont largement distribués dans les nombreux tissus de l'organisme en l'absence de toute situation inflammatoire. Les mécanismes de recrutement des monocytes du sang périphérique vers les tissus en l'absence d'inflammation ne sont pas totalement compris. Cependant, il est établi que les macrophages sont issus de cellules pluripotentes, localisées dans la moelle osseuse. Ces cellules souches se différencient successivement en monoblastes puis en promonocytes et en monocytes. Ceux-ci quittent la moelle osseuse pour la circulation sanguine où leur demi-vie est d'environ deux jours. Les monocytes pénètrent ensuite dans les différents tissus de l'organisme où ils se différencient en macrophages résidents. Il semble, de plus, qu'environ 5% des macrophages proviennent de la division locale de monocytes nouvellement arrivés dans les tissus. La durée de vie des macrophages dans les tissus est de plusieurs mois.

Ainsi, le maintien du nombre de macrophages au niveau alvéolaire résulte d'un équilibre entre l'arrivée des monocytes sanguins provenant de la moelle osseuse et le départ ou la mort des macrophages alvéolaires. L'origine myéloïde des macrophages alvéolaires a été illustrée par une étude portant sur des sujets ayant subi une greffe de moelle osseuse. Celle-ci montre que, moins de cent jours après la greffe, les poumons des receveurs sont peuplés majoritairement par des macrophages ayant pour origine les cellules mononucléées du donneur (Thomas *et al.*, 1976). Au cours des processus inflammatoires, l'augmentation du nombre de macrophages alvéolaires résulte du recrutement accru de monocytes sanguins. Celui-ci est induit par la production de divers facteurs chimiotactiques comme les chimiokines (MCP-1, RANTES), les peptides du complément, le leucotriène B4 et les fibrinopeptides (Ogisho et Yamada, 1993).

De nombreuses études suggèrent que, outre leur origine monocyttaire, les macrophages alvéolaires proviennent aussi de leur propre réplication. En effet, leur nombre *in vivo* se maintient après l'aplasie médullaire (Tarling *et al.*, 1987). De plus, les macrophages alvéolaires ont la capacité de proliférer *in vitro* sous l'influence de facteurs de croissance (Tarling *et al.*, 1987). Le compartiment interstitiel serait un site d'activité proliférative du macrophage (Bowden *et al.*, 1978). Si le taux de macrophages alvéolaires se divisant semble négligeable chez le sujet sain (environ 1%), chez les patients présentant une inflammation chronique du poumon cette proportion est augmentée de 2 à 15 fois (Bitterman *et al.*, 1984; Pforte *et al.*, 1993). Chez les patients atteints de sarcoïdose, non seulement les macrophages alvéolaires immatures ont la capacité de proliférer *in vitro*, mais aussi les macrophages alvéolaires matures (Van Hal, 1995). Ainsi, l'alvéolite macrophagique résulterait non seulement du recrutement accru des monocytes, mais aussi, pour une moindre part, d'une augmentation de la réplication locale des macrophages résidents.

## ***B, Phagocytose***

Le macrophage alvéolaire exprime différents types de récepteurs lui permettant de reconnaître des déterminants spécifiques des micro-organismes, les différenciant de l'hôte: les récepteurs mannoses, impliqués dans la reconnaissance des résidus mannose, fucose et N-acétylglucosamine terminaux (Ezekowitz et Stahl, 1982) et les récepteurs scavengers (RS-A, B et C), présentant une affinité pour des ligands polyanioniques, incluant les LDL acétylés, certains polysaccharides, l'acide lipoeichoïque et des endotoxines (Krieger et Herz, 1994). De plus, il a été montré récemment que le RS-A intervenait dans la capture de particules oxydées présentes dans l'environnement (Kobzik, 1995).

D'autre part, la phagocytose peut être favorisée par l'opsonisation préalable du contaminant. L'opsonisation permet au macrophage de reconnaître, avec un nombre limité de récepteurs, une grande variété de particules exogènes présentant des déterminants de surface très hétérogènes. Par ces récepteurs Fc (récepteurs pour les IgG, IgE et IgA), le macrophage alvéolaire peut phagocyter les antigènes reconnus et agrégés par les anticorps. Le macrophage alvéolaire exprime des récepteurs spécifiques pour les peptides du complément, lui permettant de reconnaître les microbes opsonisés par ceux-ci. De nombreux micro-organismes provoquent l'activation de la cascade du complément et le macrophage est lui-même une source de facteurs du complément. Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, le macrophage alvéolaire exprime des récepteurs de forte affinité pour la protéine du surfactant SP-A qui joue également un rôle important dans l'opsonisation des particules à phagocyter. Le nombre et l'affinité de ces récepteurs est modulable par de nombreux facteurs

L'internalisation de la particule fixée au récepteur membranaire nécessite le réarrangement de l'actine du cytosquelette et l'invagination de la membrane cytoplasmique. Le macrophage alvéolaire détruit le micro-organisme phagocyté par ses radicaux libres dérivés de l'oxygène (superoxyde, hydrogène peroxyde) ou par des mécanismes indépendants de l'oxygène; la vacuole de phagocytose, le phagosome, fusionne avec les lysosomes qui contiennent de nombreuses molécules aux propriétés microbicides, comprenant les défensines (petites protéines cationiques), le lysozyme, les hydrolases acides et la peroxydase (Elbash et Weiss, 1988). Cette fusion provoque une acidification de la vacuole jusqu'à un pH 4-5, ce qui peut être

suffisant pour provoquer la destruction du microbe, et est aussi le pH optimal des hydrolases acides. Les substances indigestes restent dans les phagolysosomes où elles forment les corps résiduels.

## ***C, Le macrophage alvéolaire régule la réponse immune***

### ***1, Le macrophage alvéolaire en tant que cellule présentatrice d'antigène***

La fonction de cellule présentatrice d'antigène nécessite la transformation de l'antigène et sa présentation à la membrane en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), mais aussi l'expression concomitante de molécules accessoires appropriées, notamment les récepteurs membranaires B7 (B7-1, CD80 et B7-2, CD86) et l'IL-1, qui stimule la prolifération des lymphocytes T et leur différenciation (expression des récepteurs à l'IL-2 et sécrétion d'IL-2).

Le macrophage alvéolaire, comme les autres phagocytes mononucléés, possède à priori plusieurs caractéristique propres aux cellules présentatrices d'antigène: Les protéines endocytées sont dégradées dans les endosomes, puis transportées vers le réticulum endoplasmique. Les peptides générés croisent la voie de biosynthèse des molécules du CMH de classe II. Ils sont présentés à la surface des macrophages alvéolaires en association avec ces molécules (HLA DR, DP, DQ) et peuvent interagir avec les récepteurs des lymphocytes T (TCR). Comme tous les macrophages, le macrophage alvéolaire exprime un fort taux de molécules du CMH de classe II. Il assure donc une présentation optimale des peptides antigéniques.

Cependant, le macrophage alvéolaire a une efficacité en tant que cellule accessoire inférieure à celle des macrophages d'autres tissus et des monocytes sanguins. cette faible efficacité est probablement due, en partie à leur activité suppressive, mais aussi à un défaut d'expression de cosignaux d'activation. Contrairement aux cellules dendritiques qui expriment constitutivement les molécules B7, les macrophages et les monocytes doivent être activés pour exprimer ces molécules. Des études récentes ont montré l'importance de l'interaction des molécules B7 avec les molécules de surface CD28 et/ou CTLA4 des lymphocytes T pour délivrer un second signal d'activation. L'absence de ce cosignal peut causer l'anergie des

lymphocytes T interagissant avec une cellule présentatrice d'antigène uniquement par l'interface TCR / peptide - CMH II et produire un état de tolérance. Or, contrairement au monocyte sanguin, le macrophage alvéolaire ne répond pas à la stimulation par l'IFN $\gamma$  par l'expression des antigènes B7-1 ou B7-2. De plus, l'addition d'antigènes anti-CD28 dans des cocultures de macrophages alvéolaires et de lymphocytes T provoque la prolifération des lymphocytes T. Ces observations suggèrent que le macrophage alvéolaire est incapable d'activer les lymphocytes T parce qu'il ne peut pas fournir le signal de costimulation passant par le CD28 ( Chelen *et al.*, 1995).

## ***2, Le macrophage alvéolaire et les lymphocytes***

Le macrophage alvéolaire supprime la prolifération des lymphocytes T induite par des mitogènes ou des antigènes *in vitro* (McCombs *et al.*, 1982; Holt, 1979). Cet effet semble médié par la production de prostaglandines, de TGF $\beta$ , d'IL-1Ra, d'oxyde nitrique et par des mécanismes dépendant des contacts cellulaires (Monick *et al.*, 1987; Roth et Golub, 1993; More *et al.*, 1992; Mills, 1991; Rich *et al.*, 1991). *In vivo*, des expériences de déplétion des macrophages alvéolaires chez le rat ont montré que, lors de l'inhalation d'un allergène, le macrophage alvéolaire inhibait la réponse lymphocytaire T et limitait la production d'IgE par les lymphocytes B. Ces résultats indiquaient de plus que le macrophage alvéolaire inhibait la réponse immunitaire non seulement en supprimant l'activation des lymphocytes T présents dans les alvéoles, mais aussi en contrôlant l'influx des lymphocytes vers le poumon (Thepen *et al.*, 1992; Strickland *et al.*, 1993).

Par ces mécanismes, le macrophage alvéolaire prévient la sensibilisation du poumon aux antigènes et évite ainsi le développement d'inflammations chroniques. Cependant, dans d'autres contextes, le macrophage alvéolaire contribue au contraire à l'activation des lymphocytes T et au développement de la réaction inflammatoire. En effet, une des fonctions majeures du macrophage alvéolaire est d'initier et de faciliter la réponse immune cellulaire contre les pathogènes.

Il semble que l'action du macrophage alvéolaire dépende du rapport macrophage alvéolaire / lymphocyte T: lorsque ce rapport est élevé, le macrophage alvéolaire a un rôle suppresseur et à l'inverse, lorsque ce rapport est faible, le macrophage alvéolaire a un effet inhibiteur (Rich *et al.*, 1987). Ainsi, le nombre relativement faible de réaction d'hypersensibilité pulmonaire pourrait en partie s'expliquer par le fait que le rapport macrophage alvéolaire / lymphocyte T au niveau de l'alvéole d'un sujet sain est de dix. D'autre part, l'activité immunosuppressive des macrophages alvéolaires est levée par le GMCSF et, dans une moindre mesure, par le  $TNF\alpha$ , le  $TGF\beta$  et l'IL-4, cytokines produites rapidement en présence d'endotoxines et dans les premières phases de la réponse inflammatoire (Bilyck et Holt, 1993).

## ***D, Les médiateurs sécrétés par le macrophage alvéolaire***

Le macrophage alvéolaire a la capacité de sécréter plus de cent molécules différentes dont le poids moléculaire varie de 17 Da (radical hydroxyle) à 720 kDa (alpha2-M) et dont les activités biologiques vont de la croissance à la mort cellulaire (Sibille et Reynolds, 1990). Certaines de ces molécules sont synthétisées et sécrétées de façon constitutives, comme le lysozyme, les facteurs du complément et l'apoprotéine E, mais la plupart nécessitent une stimulation appropriée du macrophage alvéolaire.

### ***1, Enzymes et inhibiteurs d'enzymes***

Le macrophage alvéolaire sécrète plusieurs types d'enzymes dont l'activité antibactéricide n'a pas été clairement établie contrairement à leur capacité de dégradation du tissu conjonctif. Le lysosyme est sécrété de façon constitutive. Si cette enzyme peut digérer la paroi de certaines bactéries, son efficacité en tant qu'agent bactéricide n'en reste pas moins incertaine. Les hydrolases acides lysosomiales sont sécrétées en réponse à de nombreux stimuli tels l'interaction avec les récepteurs Fc ou les récepteurs des composés du complément, des cytokines et des produits bactériens. Ces hydrolases acides peuvent dégrader le collagène, la membrane basale, hydrolyser le complément, les immunoglobulines et les kinines. Les protéases neutres comprennent des collagénases, l'élastase, la convertase d'angiotensine,

l'activateur de plasminogène et la protéase cystéine. Alors que les macrophages alvéolaires du poumon sain sécrètent très peu de protéases, les macrophages alvéolaires activés en sécrètent de grandes quantités. Cette sécrétion peut être induite par les cytokines, les endotoxines, la phagocytose et les protéases elles mêmes. La sécrétion des protéases neutres peut être inhibée par l'antiprotéase  $\alpha$ 2-macroglobuline. Le macrophage alvéolaire sécrète des lipases comme la lipoprotéine lipase et la phospholipase A2. Le macrophage relargue aussi des inhibiteurs d'enzymes comme l'antiprotéase  $\alpha$ 2-macroglobuline, l'inhibiteur de l' $\alpha$ 1-antitrypsine, de l'activateur de plasminogène, de collagénases, et de phospholipases.

## ***2, Composés du complément***

Le macrophage sécrète des composés du complément de la voie classique (C1, C2, C3, C4 et C5) et de la voie alternative (facteur B, facteur D et properdine). Il génère et sécrète aussi des composés actifs du complément comme le C3a, C3b, C5a et Bb. La sécrétion des composés du complément par le macrophage alvéolaire est augmentée lors des infections. En plus de leur rôle dans les mécanismes de défense non spécifique, les composés du complément participent au déclenchement de la réaction inflammatoire: Ils provoquent la vasodilatation et interviennent dans le recrutement et l'activation des cellules phagocytaires. Par exemple, les anaphylatoxines C3a et le C5a stimulent la migration du macrophage alors que le Bb l'inhibe. D'autre part, les anaphylatoxines agissent en synergie avec le LPS dans l'induction de l'IL-1 et du TNF. (Haeffner- Cavaillon et Cavaillon, ; Roitt et al., 1994)

## ***3, Les dérivés de l'oxygène***

Les dérivés de l'oxygène sont des radicaux libres caractérisés par la présence sur une orbitale externe d'un électron isolé non apparié. Cette caractéristique lui confère une réactivité biologique particulière, car ce radical va tendre à arracher un électron à une molécule avoisinante créant de ce fait un nouveau radical libre. C'est là le point de départ d'une réaction en chaîne susceptible de perturber le fonctionnement cellulaire. Certains dérivés de l'oxygène libérés par le macrophage alvéolaire activé, comme l'anion superoxyde, sont de piètres oxydants et ne sont

dangereux que parce qu'ils peuvent engendrer des espèces plus oxydantes alors que d'autres, comme le radical hydroxyle, sont très oxydants.

Leurs propriétés oxydantes leur permettent de tuer les bactéries, mais peuvent aussi les conduire à détruire les cellules de l'hôte. Cette cytotoxicité est principalement due à la peroxydation des acides gras non saturés contenus dans les membranes cellulaires. Celle-ci altère les propriétés de semi-perméabilité de la membrane et conduit à la mort cellulaire.

Les dérivés de l'oxygène sont capables d'influencer la balance protéases/antiprotéases au niveau du poumon: ils inactivent l' $\alpha$ 1-antitrypsine ( $\alpha$ 1pI), inhibiteur physiologique de l'élastase leucocytaire, soit directement par oxydation de la méthionine de son site actif, soit indirectement par l'activation des métalloprotéases qui vont cliver l' $\alpha$ 1pI. En effet, les dérivés de l'oxygène activent les métalloprotéases (gélatinases, collagénases) libérées par les phagocytes sous forme latente et inactivent le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1), ce qui favorise la formation de plasmine qui peut, elle aussi, activer les métalloprotéases latentes. Enfin, ils diminuent l'activité de la lysesyloxydase et de ce fait diminuent la vitesse de resynthèse de l'élastine.

Les dérivés de l'oxygène interviennent dans le recrutement des neutrophiles: La peroxydation des lipides membranaires par les dérivés de l'oxygène active la phospholipase A2 provoquant la libération et le métabolisme d'acide arachidonique dans certains systèmes cellulaires. L'exposition d'acide arachidonique à des dérivés de l'oxygène génère, *in vitro*, un puissant facteur chimiotactique pour les neutrophiles. D'autre part, le peroxyde d'hydrogène peut induire la synthèse de PAF par les cellules endothéliales et favoriser l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium.

Enfin, outre leur propriétés oxydantes, les dérivés de l'oxygène peuvent, à faible dose, activer les macrophages et les neutrophiles, et augmenter l'expression de certains de leurs gènes (TNF, IFN, IL-8...) (Housset, 1994).

#### ***4, PAF et éicosanoïdes***

Le PAF et l'acide arachidonique sont dérivés du clivage des phospholipides membranaires par la phospholipase A2. Ces médiateurs ne sont pas stockés dans les cellules, mais sont néoformés. (Revue par Revillard, 1994)

**Le PAF** (platelet activating factor) a une action très brève, mais multiple: il entraîne la dégranulation des plaquettes après leur agrégation et la libération de sérotonine. Il active les lymphocytes T suppresseurs et stimule l'activité des cellules NK, tout en augmentant leur libération de TNF. Il provoque la constriction des muscles lisses (ayant ainsi un effet vasoconstricteur) et augmente la vasoperméabilité. Il est chimiotactique vis à vis des éosinophiles et des neutrophiles. Il augmente l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium et induit leur dégranulation. Il active la production des dérivés de l'acide arachidonique au niveau des macrophages et des neutrophiles.

**L'acide arachidonique**, acide gras insaturé de vingt atomes de carbone, peut être oxydé selon trois voies métabolites. La première, celle du cytochrome P450, n'a probablement qu'une importance secondaire au niveau des cellules de l'immunité. Les deux autres voies (de la cyclooxygénase et lipoxygénase) produisent des substances à demi-vie brève, qui sont des immunorégulateurs locaux et/ou des médiateurs de l'inflammation. Les métabolites de l'acide arachidonique, appelés éicosanoïdes, comprennent les prostaglandines, les thromboxanes (produits de la voie cyclooxygénase), et les leucotriènes (produits de la lipoxygénase). Le macrophage produit les prostaglandines PGE2, PGF2a, PGI2 et PGD2, les thromboxanes TxA2 et TxB2 et les leucotriènes LTB4, LTC4, LTD4, et LTE4. Les éicosanoïdes modulent la vasomotricité (le PGE2 est un vasodilatateur alors que le PGD2, les leucotriènes et le TxA2 sont vasoconstricteurs) et augmentent la perméabilité capillaire. Ils sont de plus chimiotactiques vis à vis des phagocytes. Enfin, la PGE2 a un effet négatif sur la prolifération des fibroblastes et sur la synthèse de TNF par les macrophages alors que le LTB4 exerce un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de TNF par le macrophage.

## **5, *Fibronectine***

Le macrophage alvéolaire est une source importante de fibronectine. La fibronectine a une forte activité chimiotactique pour les fibroblastes et son clivage par les enzymes protéolytiques du macrophage provoque le relargage de fragments eux-mêmes chimiotactiques. Elle stimule la prolifération des fibroblastes et facilite leur attachement à la matrice extracellulaire. La fibronectine, d'autre part, peut servir d'opsonine non spécifique et faciliter la phagocytose des particules par le macrophage. Le taux de fibronectine est augmenté dans les lavages alvéolaires de nombreuses pathologies telles les fibroses idiopathiques.

## **6, *Cytokines***

Le macrophage alvéolaire est, avec le lymphocyte, la principale source identifiée de cytokines. Le macrophage alvéolaire ne sécrète pas de cytokines de façon constitutive dans le poumon sain, mais en sécrète, par contre, des taux élevés lors d'agressions pulmonaires et dans de nombreuses pathologies. Les cytokines, petits polypeptides de 8 à 30 kDa, semblent être les plus importants médiateurs multifactoriels du comportement cellulaire et de la communication intercellulaire. Elles agissent de façon paracrine et autocrine, en se fixant à des récepteurs spécifiques de forte affinité présents à la surface des cellules. Leur effet individuel dépend de leur concentration et de l'état de préactivation de la cellule cible. Leur effet combiné peut être synergique ou antagoniste. Les cytokines régulent de nombreuses fonctions de la cellule, comme la multiplication, la motilité et l'activité métabolique. Les cytokines sécrétées par le macrophage alvéolaire vont permettre la production en cascade d'autres cytokines impliquées dans l'amplification ou l'inhibition de la réponse inflammatoire. Sous l'effet de stimuli variés, le macrophage alvéolaire peut sécréter de nombreuses cytokines, des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, des chimiokines mais aussi des cytokines anti-inflammatoires. (Revue par Kelley, 1990; Borish et Rosenwasser, 1996). Durant ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux cytokines de l'inflammation, IL-6 et TNF- $\alpha$ , et à la plus puissante des chimiokines chimiotactiques pour les monocytes, le MCP-1.

### *a, Le TNF- $\alpha$*

Le TNF- $\alpha$  est une protéine de 17 kDa, dont le gène est situé sur le chromosome 6, à proximité du gène du TNF- $\beta$ , au sein de la région codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le TNF existe probablement sous forme monomérique et multimérique, mais c'est sous forme trimérique qu'il est biologiquement actif. Le TNF- $\alpha$  est principalement produit par les monocytes / macrophages, mais de nombreux types cellulaires, tels que les lymphocytes B et T, les neutrophiles, les cellules NK, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, (...), peuvent le sécréter après une stimulation appropriée. Une forme membranaire du TNF- $\alpha$ , biologiquement active lors des contacts cellulaires, a également été mise en évidence à la surface des cellules activées.

Deux récepteurs du TNF ont été identifiés et clonés. Les TNF RI et le TNF RII sont des glycoprotéines ayant respectivement un poids moléculaire de 55 et 75 kDa, et présentant 28% d'homologie. Chacun d'eux fixe aussi bien le TNF- $\alpha$  que le TNF- $\beta$ , et l'affinité du TNF RII est supérieure à celle du TNF RI. La plupart des cellules exprime les deux types de récepteurs. Cependant, le TNF RI est exprimé de façon constitutive et en faible quantité, alors que l'expression du TNF RII est inductible. Les deux types de récepteurs, TNF RI et TNF RII, existent également sous forme soluble (30 et 40 kDa respectivement), correspondant aux domaines extracellulaires des formes membranaires. Leur libération de la surface cellulaire est induite par divers stimuli. Ainsi les neutrophiles libèrent-ils leurs TNF Rs suite à l'activation par le fMLP, le C5a, le GM-CSF ou le calcium ionophore. Ces formes solubles fixent le TNF, avec une affinité plus grande pour le TNF- $\alpha$  que pour le TNF- $\beta$ . A forte concentration, elles inhibent l'activité biologique du TNF. Il semble également qu'elles puissent, à faible concentration, protéger les molécules de TNF et accroître leur demi-vie.

Les macrophages sécrètent le TNF- $\alpha$  sous l'effet de nombreux stimuli: produits microbiens (endotoxines bactériennes, certains virus, parasites ...), poussières minérales, fragments de fibronectine, fragment C5a, et diverses cytokines telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IFN $\gamma$ , le GM-CSF, CSF-1, et le TNF lui même. Les macrophages alvéolaires sécrètent des taux de TNF- $\alpha$  plus importants que les monocytes (Martinet et al., 1988).

Le TNF (tumor necrosis factor) doit son nom au fait qu'il induit une nécrose hémorragique et la dépression de certaines tumeurs chez la souris (Carswell *et al.*, 1975). Il est à l'origine d'une lyse cellulaire soit par des mécanismes nécrosants, soit par des phénomènes d'apoptose. Plusieurs lignées tumorales humaines sont sensibles à cette action *in vitro* (cellules de mélanome, de carcinome colique, de carcinome vésical ou de fibrocarcinome) alors que les cellules normales ne sont pas détruites. En dehors de ces propriétés anti-tumorales, le TNF possède un large spectre d'activités biologiques, agit sur de nombreuses cellules, immunitaires ou non, et est considéré comme un médiateur essentiel de la réponse immunitaire et de la réaction inflammatoire.

Le TNF- $\alpha$  est impliqué dans la phase effectrice de la réponse immunitaire. Cofacteur de l'activation des lymphocytes T, il co-induit la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , l'expression des récepteurs pour l'IL-2, la prolifération (en présence d'antigènes et d'IL-2), et est aussi impliqué dans l'acquisition de l'activité cytotoxique par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> allospécifiques. Le TNF- $\alpha$  est sans action sur les lymphocytes B au repos, mais peut néanmoins co-participer à leur différenciation et à leur prolifération en présence d'activateurs. Il accroît en particulier leur réponse proliférative et leur capacité de sécrétion d'immunoglobulines induite par l'IL-2. D'autre part, il augmente les propriétés cytotoxiques des macrophages et des neutrophiles, ainsi que leur capacité de phagocytose.

Le TNF amplifie la réponse inflammatoire en participant au recrutement et à l'activation des leucocytes. Il induit la production de facteurs chimiotactiques responsables du recrutement des monocytes, des neutrophiles et des lymphocytes sur le site de l'inflammation et serait, de

plus, chimiotactique pour les monocytes et les neutrophiles (Ming et al., 1987). En réponse au TNF, l'endothélium vasculaire et les neutrophiles expriment de manière accrue des molécules d'adhérence à leur surface (Gamble et al., 1985). Cette surexpression favorise l'adhérence des cellules sanguines à l'endothélium, étape précédant l'extravasation et la migration des cellules inflammatoires vers le site de l'inflammation. Le TNF entraîne aussi une hyper-perméabilité vasculaire, à l'origine d'oedème vasculaire et stimule d'autre part l'activité procoagulante des cellules endothéliales. Comme l'IL-1 et l'IL-6, il favorise la coagulation, interférant avec la fibrinolyse, et limite ainsi l'oxygénation des tissus. Le TNF stimule la multiplication des fibroblastes, ainsi que leur activité sécrétoire (PGE2, collagénase), et serait ainsi impliqué dans la cicatrisation tissulaire ainsi que dans les processus de fibrose.

Le TNF augmente la production d'oxydants par les neutrophiles (Klebanoff et al. 1986), les macrophages (Warren et al., 1988) et les fibroblastes (Meier et al., 1989) tout en induisant l'expression d'antioxydants. Il induit la dégranulation du neutrophile et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par le macrophage.

(Revue par Kelley, 1990; Borish et Rosenwasser, 1996; Cavaillon, 1996).

### ***b, L'interleukine-6***

L'IL-6, glycoprotéine de 26 kDa dont le gène est situé sur le chromosome 7, joue un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire. Les phagocytes mononucléés sont probablement la source la plus importante d'IL-6. Toutefois, l'IL-6 est une cytokine ubiquitaire pouvant être produite par de très nombreux types cellulaires lors d'une activation. Cette production est déclenchée par de multiples signaux: LPS, virus à ARN bicaténaire, HIV, poussières minérales, PGE2 et diverses cytokines dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-2, les IFNs, le PDGF et l'EGF. Ces signaux ont une certaine sélectivité selon le type cellulaire: Le LPS est plus efficace sur la lignée monocyttaire alors que l'IL-1 est plus efficace sur la lignée fibroblastique. La production d'IL-6 par les monocytes / macrophages est souvent concomitante à celle d'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . De fait, les études employant les endotoxines comme agent de

stimulation des monocytes / macrophages ont montré que les mêmes phénomènes d'amplification et d'inhibition étaient observés lors de la production de ces trois cytokines.

Le récepteur de l'IL-6 est constitué de deux glycoprotéines, l'une, de 80 kDa (l'IL-6 R), fixe l'IL-6, alors que l'autre, de 180 kDa (la gp130), fournit le signal d'activation cellulaire. En fait, le complexe IL-6/IL-6 récepteur est un hexamère constitué de deux molécules d'IL-6, deux d'IL-6 R et de deux gp130. L'IL-6 R existe sous forme soluble (s IL-6 R) et, contrairement aux récepteurs solubles de l'IL-1 et du TNF, joue un rôle amplificateur de l'IL-6.

L'IL-6 est une cytokine pléiotrope impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire, de l'hématopoïèse et de la phase aiguë de la réaction inflammatoire. Au niveau immunologique, l'IL-6 agit essentiellement sur la différenciation et l'activation des lymphocytes B. L'IL-6 est un agent de maturation terminale, elle n'agit que sur les lymphocytes B activés, les cellules B au repos étant dépourvues de récepteurs. Produite par les cellules présentant l'antigène et les lymphocytes T, l'IL-6 agit de concert avec les autres cytokines dans la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps. Après stimulation par un mitogène, l'IL-6 accroît la production d'immunoglobulines, aussi bien IgM, IgG ou IgA. Au niveau de l'hématopoïèse, l'IL-6 agit comme l'IL-1 et l'IL-4, en synergie avec les CSF. Elle induit la production de GM-CSF par les fibroblastes et les cellules hématopoïétiques à deux niveaux: très précocement, elle potentialise l'effet de l'IL-3 sur la différenciation des cellules souches, plus tardivement, elle a des effets comparables à ceux du G-CSF sur la lignée granuleuse. L'IL-6 médie l'activation, la croissance et la différenciation des lymphocytes T, et est le principal facteur impliqué dans la génération des lymphocytes T cytotoxiques à partir de la population CD8+. Comme l'IL-1, l'IL-6 potentialise l'effet de l'IL-2 en augmentant l'expression du récepteur de l'IL-2 sur les lymphocytes T activés. L'IL-6 stimule l'activité des cellules NK, induit la production d'IFN- $\gamma$  par celles-ci et augmente la génération et l'activité des cellules LAK préparées en présence d'IL-2. L'induction des cellules T cytotoxiques et l'activation des cellules NK pourraient rendre compte de l'activité antitumorale attribuée à l'IL-

6. L'IL-6 stimule la sécrétion de lysozyme, la lactoferrine et de  $\beta$ -gluconidase par les neutrophiles, et de facteurs B et C3 par les fibroblastes.

L'IL-6 présente des propriétés anti-inflammatoires. Elle induit la production, par les hépatocytes, des protéines de la phase aiguë inflammatoire, protéines ayant essentiellement un rôle anti-inflammatoire par leur capacité à limiter les effets délétères d'enzymes et de produits microbiens. Tout comme l'IL-1 et le TNF, l'IL-6 est à l'origine d'une boucle de rétroinhibition de la réaction inflammatoire, impliquant l'axe neuro-endocrinien: Elle induit la production, par l'hypothalamus, de CRF (corticotropin-releasing factor), qui agit sur les cellules de l'hypophyse pour leur faire produire de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Cette dernière, agissant sur les surrénales, est responsable de la production de glucocorticoïdes, puissant inhibiteur de la synthèse de cytokines. Enfin, l'IL-6 réprime la production d'IL-1 et de TNF par les monocytes / macrophages (Aderka *et al.*, 1989) et induit chez l'homme des taux plasmatiques accrus d'IL-1 Ra (IL-1 Receptor antagonist) et de récepteur soluble du TNF, TNFRp55 (Tilg *et al.*, 1994).

(Revue par Kelley, 1990; Kishimoto *et al.*, 1992; Borish et Rosenwasser, 1996; Cavaillon, 1996)

### *c, Le MCP-1 et les chimiokines*

Les chimiokines sont des cytokines basiques de faible poids moléculaire (7-10 kb), présentant 20 à 90% d'homologie entre elles au niveau de leur séquence primaire et ayant des propriétés chimiotactiques. Trois sous-groupes de chimiokines ont été définis ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ): les  $\alpha$  et les  $\beta$ -chimiokines possèdent quatre résidus cystéine (C) en position invariable, les deux premiers étant respectivement séparés par un acide aminé quelconque (C-X-C, sous-groupe  $\alpha$ ), ou adjacents (C-C, sous-groupe  $\beta$ ), alors que les  $\gamma$ -chimiokines, plus récemment identifiés, ne possèdent que deux cystéines (aussi appelé sous-groupe C). Les  $\alpha$ -chimiokines sont codées par le chromosome 17 et comprennent l'IL-8, le GRO $\alpha/\beta/\gamma$ , l'ENA 78, l'IP-10, le PF-4 ainsi que le PBP et ses dérivés. Les  $\beta$ -chimiokines, dont les gènes sont localisés sur le chromosome 4, correspondent au MCP-1/2/3/4, MIP-1 $\alpha/\beta$ , RANTES, I-309, fic, CCF18, MRP-1/2 et Eotaxine. Le seul membre actuellement connu des  $\gamma$ -chimiokines est la lymphotactine, dont le

gène est situé sur le chromosome 1. Cinq récepteurs pour les  $\beta$ -chimiokines humaines ont été clonés (référencés sous les noms de CCR-1 à CCR-5). Le CCR-1 fixe le MIP-1 $\alpha$ , le MCP-3 et le RANTES. Le second, qui existe sous deux isoformes (CCR-2A et CCR-2B), reconnaît le MCP-1 et le MCP-3, et dans le cas du CCR-2B, le MCP-4. Le CCR-3, exprimé exclusivement par les éosinophiles, est spécifique de l'éotaxine et du MCP-4. Enfin, le CCR-5 lie les MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$  et le RANTES (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996).

Le MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), de la sous famille des  $\beta$ -chimiokines, possède quatre cystéines qui forment des ponts disulfures (1-3 et 2-4). Les boucles qui en résultent sont nécessaires à son activité biologique car elles déterminent la configuration requise pour l'interaction avec ses récepteurs. Il existe deux formes de MCP-1: Le MCP-1 $\alpha$  et le MCP-1 $\beta$ , tous deux composés de la même chaîne de 76 AA. Ils sont codés par un gène unique, composé de trois exons, situés sur le chromosome 17. Ce gène (JE) possède un cadre ouvert de lecture codant pour 99 AA. L'hydrophobicité des 23 premiers acides-aminés est typique des séquences d'adressage, ce qui est cohérent avec le fait que le MCP-1 soit sécrété. Le MCP-1 $\alpha$  et le MCP-1 $\beta$ , sont des protéines relativement basiques qui devraient faire 8,7 kDa d'après leur composition en acides aminés mais qui ont en fait une masse moléculaire de 15 et 13 kDa respectivement, suite à des modifications post-transcriptionnelles (O-glycosilations et addition terminale de résidus sialiques).

Différents types cellulaires, outre les macrophages, sont sources de MCP-1 sous l'effet de divers stimuli, dont en particulier l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . Parmi ces cellules, ont été identifiés, les fibroblastes, les cellules endothéliales (Streiter *et al.*, 1989), les monocytes (Yoshimura *et al.*, 1989), les lymphocytes (Kaczmarek B, 1985), les cellules musculaires lisses, les pneumocytes de type II (Standiford *et al.*, 1991), et les cellules mésothéliales (Antony *et al.*, 1995).

Le MCP-1 est chimiotactique pour les monocytes, tout comme le MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , le MCP-2, le MCP-3, le MCP-4, le RANTES (Oppenheim *et al.*, 1991, Garcia-Zepeda *et al.*, 1996). *In vitro*, il semble être la plus puissante des chimiokines ayant une activité

chimiotactique pour les monocytes à faible dose (Ugucioni *et al.*, 1995, Garcia-Zepeda *et al.*, 1996). *In vivo*, l'administration de MCP-1 aboutit effectivement à l'accumulation de monocytes au site d'injection (Zachariae *et al.*, 1990). Outre son effet chimiotactique, le MCP-1 est aussi un facteur d'activation des monocytes, stimulant leur activité cytostatique dirigée contre certaines lignées de cellules tumorales (Matshushima *et al.*, 1989), leur métabolisme oxydatif (Rollins *et al.*, 1991), le relargage d'enzymes lysosomiales, l'expression des molécules d'adhérence p150,95 (CD11c/CD18) et de Mac1 (CD11b/CD18) de la famille des intégrines- $\beta$ 2, et la synthèse d'IL-6 et d'IL-1 (mais pas de TNF) (Jiang *et al.*, 1992). Plus récemment, il a été démontré que le MCP-1 agit également sur les basophiles, provoquant leur recrutement sur les sites inflammatoires et leur libération d'histamine (Fureder *et al.*, 1995), ainsi que sur les cellules NK, induisant leur migration et leur dégranulation (Allavena *et al.*, 1994; Taub *et al.*, 1995). Enfin, des études *in vitro* sur les lymphocytes T humains et *in vivo* chez la souris et le rat ont montré que le MCP-1 a un effet chimiotactique sur les lymphocytes T (Huffnagle *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1995; Taub *et al.*, 1995; Rand *et al.*, 1996). (Revue par Yoshimura et Leonard, 1992;)

### ***III - Mécanismes de défense de l'alvéole.***

#### ***A, Les voies aériennes supérieures.***

De multiples agresseurs potentiels (particules minérales, gaz toxiques, allergènes, bactéries, virus) sont véhiculés par l'air que nous inspirons. 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 particules d'un diamètre supérieur à 10  $\mu\text{m}$  se déposent par impaction dans les voies nasales et sur la paroi postérieure du pharynx. Les particules plus fines se fixent par sédimentation sur les parois bronchiques. Seules les particules d'un diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$  parviennent aux structures alvéolaires. Quel que soit leur lieu de dépôt, les particules sont immédiatement prises en charge par des mécanismes chargés d'en assurer l'élimination. L'épuration mécanique bronchique dépend de l'épithélium cilié sécrétoire qui borde les voies aériennes supérieures; le mouvement des cils entraîne les sécrétions bronchiques qui les recouvrent ainsi que les particules qui y sont fixées. Cet ascenseur muco-ciliaire véhicule les particules vers le carrefour aéro-digestif. La toux peut accélérer la progression des particules vers le rhino-pharynx, où elles seront dégluties ou expectorées.

#### ***B, Défense de l'alvéole: Une cellule clé, le macrophage alvéolaire.***

Les petites particules et les micro-organismes qui ont échappés à ces mécanismes de défense sont pris en charge, au niveau des alvéoles, par les cellules phagocytaires. Le macrophage alvéolaire est le phagocyte résidant de l'espace alvéolaire à l'état normal. Chez les sujets sains, il constitue 90% des cellules de l'espace alvéolaire, contrairement au neutrophile qui ne représente que 1%. Suite à certains stimuli, les neutrophiles, comme les macrophages, peuvent affluer vers le poumon, mais les macrophages constituent la première et la principale ligne de défense contre les agressions. Les macrophages survivent plusieurs mois, puis, remplis de corps résiduels, migrent vers l'arbre bronchique où ils sont pris en charge par

l'ascenseur muco-ciliaire. Ils peuvent aussi retourner vers l'interstitium et quitter le poumon par les vaisseaux lymphatiques.

### ***1, Epuration mécanique.***

Grâce au phénomène de phagocytose, le macrophage alvéolaire débarrasse le poumon des cellules sénescents ou endommagées, des débris cellulaires et des particules minérales, et lutte activement contre les antigènes, les bactéries, les virus et les cellules tumorales. Leur grande taille facilite la liaison des particules à leur membrane et leur permet une défense efficace contre les éléments de diamètre important. Ils sont capables d'ingérer les protozoaires, contrairement aux neutrophiles. La liaison des particules à la membrane du macrophage alvéolaire se fait soit de façon aspécifique par attraction de charge, soit via des récepteurs membranaires (Van Oss, 1986).

L'activité phagocytaire du macrophage alvéolaire est non seulement impliquée dans la clearance des particules inhalées et débris cellulaires, et dans la destruction des agents pathogènes, mais elle intervient aussi dans l'induction de l'immunité spécifique, puisqu'elle est essentielle à la présentation de l'antigène aux lymphocytes.

### ***2, Réponse immunitaire.***

La réponse immunitaire se fait en trois temps: (1) lors de la phase afférente, l'antigène atteint l'alvéole où il est capté par une cellule phagocytaire qui migre alors vers les ganglions lymphatiques pulmonaires. (2) La présentation de l'antigène à une cellule T naïve exprimant un récepteur T (TCR) compatible provoque la phase centrale qui consiste en la multiplication et en la différenciation des clones lymphocytaires spécifiques. (3) Durant la phase effectrice, les cellules T et B rejoignent la circulation sanguine et migrent vers le site de l'agression qui nécessite une réponse immunitaire spécifique. (Lipscomb *et al.*, 1993). Le macrophage alvéolaire intervient au niveau de ces trois phases pour empêcher une réponse lymphocytaire inappropriée contre les antigènes et allergènes environnementaux, non pathogènes, auxquels nous sommes constamment exposés, et contribuer à la réponse immune lors de l'inhalation d'antigènes microbiens, pathogènes.

### ***3, Le macrophage alvéolaire et les cellules dendritiques.***

La fonction de cellule présentatrice d'antigène au niveau du poumon est assurée par les cellules dendritiques. Des études histochimiques montrent qu'elles forment de petits amas avec des cellules lymphocytaires T dans le tissu interstitiel subépithélial bronchiolaire à proximité de macrophages (Van Haarst *et al.*, 1994). Elles sont très peu nombreuses au niveau alvéolaire mais peuvent être recrutées rapidement. Les cellules dendritiques sont des cellules accessoires très efficaces qui, contrairement aux autres cellules présentatrices d'antigène, peuvent activer des cellules T naïves. Les macrophages alvéolaires inhibent, *in vivo*, la fonction cellule présentatrice d'antigène des cellules dendritiques pulmonaire par la synthèse d'acide nitrique (Holt *et al.*, 1993). De plus, les macrophages alvéolaires (et les neutrophiles) séquestrent les antigènes inhalés qui ne sont plus, de ce fait, accessibles aux cellules dendritiques (Mac Lean *et al.*, 1995). Ainsi, tant que la défense du poumon peut être assurée par la phagocytose, la réponse immunitaire contre les particules inhalées n'est pas induite. Celle-ci n'est générée que lorsque la capacité de phagocytose est dépassée et que les antigènes peuvent interagir directement avec les cellules dendritiques.

## ***C, Initiation et modulation de la réaction inflammatoire.***

### ***1, La réaction inflammatoire.***

La phase initiale de la réaction inflammatoire est typiquement caractérisée par l'afflux de neutrophiles. Peu de temps après cette première réponse, qui commence dans les heures suivant l'inhalation des contaminants, c'est le nombre de macrophages alvéolaires qui augmente. Contrairement à la réponse neutrophilique, qui est relativement immédiate mais ne dure que quelques jours, l'alvéolite macrophagique est durable. Ces cellules phagocytaires nouvellement recrutées vont augmenter la capacité de clearance au niveau alvéolaire. De plus, il semble que l'inflammation soit nécessaire à la translocation des antigènes vers les ganglions lymphatiques pulmonaires. Après avoir phagocyté les particules dans l'alvéole, une partie des neutrophiles et des macrophages vont migrer vers ces ganglions lymphatiques. Les neutrophiles rejoignent les ganglions lymphatiques plus rapidement que les macrophages alvéolaires, mais la contribution

relative de ces deux types cellulaires pour la translocation des antigènes n'est pas connue. Au niveau des ganglions lymphatiques pulmonaires, les neutrophiles et les macrophages pulmonaires relarguent vraisemblablement les antigènes qu'ils transportaient. Ceux-ci seront captés par les cellules présentatrices antigènes résidentes (cellules dendritiques et macrophages lymphatiques) qui pourront alors initier la réponse immunitaire (Bice, 1993). Suite à la réponse immunitaire primaire, les lymphoblastes quittent rapidement les ganglions lymphatiques et entrent dans la circulation sanguine. Leur migration vers le site d'inflammation se fera sous le contrôle de molécules d'adhérence et de chimiokines (Berman *et al.*, 1990).

## ***2, Synthèse de facteurs pro-inflammatoires par le macrophage.***

Le macrophage alvéolaire est la cellule clé de l'initiation et de la modulation de la réaction inflammatoire. En réponse à de nombreux stimuli, le macrophage alvéolaire synthétise et sécrète des facteurs qui attirent et activent les neutrophiles et les macrophages. Ce recrutement favorise la défense antibactérienne et antivirale, et la clearance des particules, lorsque la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires résidents est dépassée. La synthèse et la sécrétion de facteurs chimiotactiques et de cytokines pro-inflammatoires par le macrophage alvéolaire sont activées par de nombreux stimuli d'origine diverses, organiques et inorganiques. Une même stimulation peut induire la sécrétion de nombreux facteurs et la sécrétion d'un même facteur peut être induite par plusieurs stimuli différents:

- Les produits bactériens tels les endotoxines activent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFNs) et de facteurs chimiotactiques (Chimiokines, fibronectine, dérivés de l'acide arachidonique) qui induisent ou régulent le recrutement des autres types cellulaires (notamment les neutrophiles) et favorisent leur activation.

- Durant les processus de phagocytose, le macrophage alvéolaire libère la plupart des substances microbicides qu'il élabore (comme les dérivés de l'oxygène et les enzymes lysosomales) non seulement dans les phagosomes, mais aussi dans le milieu extérieur (Johnston *et al.*, 1978).

- La phagocytose indépendante de l'opsonisation ou dépendante de la fixation du C3 à son récepteur provoque une activation minimale du macrophage alvéolaire. A l'inverse, la phagocytose médiée par le récepteur Fc (phagocytose de complexes immuns ou de micro-organismes opsonisés par des immunoglobulines) résulte en une augmentation du relargage de métabolites de l'oxygène, de dérivés de l'acide arachidonique, d'activateur de plasminogène, d'enzymes lysosomales, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Kobzik *et al.*, 1990, 1993; Pestel *et al.*, 1981, 1984).

- Le résultat de la phagocytose est le plus souvent la destruction du micro-organisme ingéré, mais certains, tels *Mycobacterium tuberculosis* et *Toxoplasma gondii* peuvent survivre dans le macrophage. La persistance de ces microbes dans le macrophage alvéolaire est aussi un facteur d'activation.

- En réponse aux infections virales, les macrophages alvéolaires produisent de l'IFN $\alpha/\beta/\gamma$ , de l'IL-1, du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-8 (Acton et Myrvik, 1966; Roberts *et al.*, 1986; Nain *et al.*, 1990; Dudding *et al.*, 1989).

- L'exposition *in vivo* à des irritants gazeux comme l'ozone induit l'augmentation de la production de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 et IL-8) par les macrophages alvéolaires humains (Arsalane *et al.*, 1995). Chez le rat, il a été montré que l'ozone induisait la sécrétion, par les macrophages alvéolaires, de TNF- $\alpha$  et d'IL-1, mais aussi de peroxyde d'hydrogène, d'oxyde nitrique, et de fibronectine (Pendino *et al.*, 1993, 1994).

- Les particules inorganiques activent elles aussi les macrophages alvéolaires. *In vitro*, la silice et les poussières de charbon activent la synthèse d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , d'IL-1, de dérivés de l'acide arachidonique, de fibronectine et de PDGF (Revue par Vanhée *et al.*, 1995).

- Le macrophage présente de nombreux récepteurs aux cytokines (IL-1, TNF, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2,...). La synthèse de ces cytokines par le macrophage alvéolaire peut donc résulter en une activation autocrine de celui-ci. Par exemple, l'IL-8 est produit par le macrophage en réponse à l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1- $\beta$ , et au TNF- $\alpha$ .

- D'autre part, les produits de sécrétion du macrophage alvéolaire stimulent les cellules voisines. Celles-ci vont alors sécréter des facteurs qui pourront à leur tour activer le macrophage alvéolaire de façon paracrine.

### ***3, Conséquences de l'alvéolite macrophagique.***

Lors de la réponse immunitaire et inflammatoire suite à une agression, le nombre de macrophages alvéolaires est accru de façon transitoire ou prolongée. Cette augmentation du nombre de macrophages alvéolaires activés, bien que nécessaire aux mécanismes de défense, peut nuire à l'intégrité du poumon. Une libération trop importante de cytokines inflammatoires, de radicaux oxygénés et d'enzymes lysosomales (hydrolases acides, protéases neutres) peut entraîner une inflammation chronique, provoquer des lésions du tissu interstitiel pulmonaire et aboutir à un processus de fibrose. Cette réponse excessive des macrophages alvéolaires est caractéristique de différentes pathologies pulmonaires comme les lésions provoquées par les drogues, la sarcoïdose, la fibrose idiopathique et les pneumoconioses.

## ***IV - La pneumoconiose du mineur de charbon.***

La pneumoconiose du mineur de charbon est, avec la silicose et l'asbestose, une des maladies professionnelles les plus importantes, à la fois par sa fréquence et sa gravité. Cette pathologie interstitielle est causée par l'inhalation prolongée de poussières de charbon, inhérente à l'activité du mineur, mais elle n'est mise en évidence, généralement, que 15 à 20 ans après l'arrêt de l'exposition. Elle se développe sans réaction inflammatoire fébrile, aiguë ou subaiguë, mais est caractérisée par des réactions tissulaires lentes et progressives. La pneumoconiose du mineur de charbon est associée à un dépôt de poussières inorganiques au niveau du tissu pulmonaire (amas coniotiques), une alvéolite macrophagique, une bronchite chronique, et le développement de lésions fibrotiques et emphysémateuses. (Voisin et Wallaert, 1992;)

### ***A, Pneumoconiose simple et fibrose massive progressive.***

Les patients pneumoconiotiques sont classiquement divisés en deux groupes, en fonction de leur image radiologique; la pneumoconiose simple (PS), où les opacités nodulaires ont un diamètre inférieur à un centimètre, et la fibrose massive progressive (FMP), caractérisée par des opacités plus étendues (> 1 cm) (Parkes, 1982; Soutar et Collins, 1984). Cette classification sur critère radiologique est cohérente avec les observations cliniques, les patients avec une FMP présentant un bilan fonctionnel respiratoire plus altéré (Morgan et al., 1974) et une espérance de vie moindre que ceux avec une PS (Cochrane, 1973).

Sur le plan anatomopathologique, ces opacités correspondent à des nodules de fibrose associés à des dépôts coniotiques. Les lésions anatomiques se situent préférentiellement dans les lobes supérieurs. Les macules sont des lésions non ou peu fibreuses, liées à l'accumulation de poussières autour des bronchioles respiratoires et des alvéoles adjacentes. Les nodules fibroconiotiques sont situés autour des bronchioles respiratoires, dans les zones péribronchiques sous pleurales. Ce sont des nodules de forme stellaire, pigmentés en périphérie, où prédomine le collagène sans organisation concentrique. Ces nodules sont de tailles variables, classés en micro et macronodules (< 7 mm et 7 à 20 mm). La fibrose massive

progressive correspond à des masses fibreuses plus ou moins pigmentées, dures, parfois excavées et de taille supérieure à 2-3 cm. L'emphysème se développe autour des macules et nodules et au centre des lobules (Revue par Wastiaux, 1993). Il existe une relation significative entre la sévérité des lésions emphysemateuses et la charge anthracosique du poumon (Cockcroft *et al.*, 1982).

## ***B, Facteurs de risque de la pneumoconiose.***

L'apparition de la maladie dépend de la quantité de particules inhalées, de la durée d'exposition, de la nature (propriétés physico-chimiques) des particules, mais aussi de facteurs propres à l'individu.

### ***1, Influence de facteurs génétiques.***

Des mineurs ayant travaillé dans les mêmes conditions vont développer une PS qui chez certains va évoluer en FMP, alors que d'autres n'auront aucun symptôme. Les différences de réponse interindividuelle ne sont pas comprises, mais suggèrent que le fait de développer ou non une pneumoconiose est lié à des caractères individuels. Il a été constaté une prédominance de certains groupes HLA chez les mineurs ayant développés une pneumoconiose par rapport aux mineurs sains, notamment une fréquence moindre du groupe HLA-1 dans la pneumoconiose du mineur de charbon et une proportion significativement plus élevée du phénotype HLA-Aw19 chez les pneumoconiotiques par rapport aux mineurs sains ayant été exposés aux mêmes risques (Gualde *et al.*, 1977; Honda *et al.* 1988, 1993; Heise *et al.*, 1973; Koskinen *et al.*, 1983). Ces observations laissent supposer l'existence d'un facteur génétique, lié à la région HLA, conférant une susceptibilité ou une protection pour cette maladie.

## ***2, Accumulation de la poussière.***

Une partie des poussières inhalées est retenue dans les alvéoles à chaque inhalation. Ces poussières sont phagocytées par les macrophages qui se dirigent alors vers les voies supérieures où ils sont pris en charge par l'ascenseur muco-ciliaire. A l'état physiologique, les mécanismes d'épuration permettent d'évacuer environ 100g de poussière par an. Le développement d'une pneumoconiose suppose que la capacité d'épuration du poumon soit dépassée, entraînant une accumulation des poussières au niveau des tissus. Les premiers dépôts de poussière s'observent au niveau péribronchique et périvasculaire, dans les lobes pulmonaires supérieurs. Un poumon pneumoconiotique, des années après la fin de l'exposition, contient 38 à 54 g de poussière. Toutefois cette explication semble insuffisante car, certaines poussières, dites inertes, n'entraînent pas de fibrose lorsqu'elles sont inhalées isolément. Elles conduisent à un empoussiérage pulmonaire sans conséquences pathologiques graves, appelé pneumoconiose de surcharge, alors que d'autres ont des propriétés sclérogènes intrinsèques qui peuvent conduire au développement d'une fibrose. (Revue par Voisin et Lenoir, 1985).

## ***3, Propriétés sclérogènes de la poussière de mine de charbon.***

La poussière de mine de charbon est complexe; elle contient, en plus du charbon, de nombreux minéraux (Le Bouffant et al., 1987). Sa sclérogénicité est associée à différentes propriétés : (1) comme de nombreuses poussières, elle fixe des molécules gazeuses irritantes ou toxiques présentes dans l'atmosphère. (2) certains de ses composants (silice, fer) sont capables de générer des radicaux OH<sup>•</sup> à partir de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sécrété par les cellules (Dalal *et al.*, 1995). (3) le quartz est toxique, provoquant à forte dose des désordres chimiques et enzymatiques dans le macrophage, notamment par la rupture de la membrane du phagolysosome. La mort des macrophages alvéolaires entraîne la libération des particules et de leur contenu cellulaire (Wastiaux, 1993). (4) Les poussières activent les macrophages alvéolaires et entraînent ainsi la libération de nombreux médiateurs proinflammatoires et profibrosants impliqués dans la pathologie.

Ainsi, la poussière de mine de charbon induit une altération des cellules épithéliales et des vaisseaux, active les macrophages alvéolaires et de provoque, de ce fait, une inflammation chronique. Les macrophages alvéolaires libèrent des facteurs chimiotactiques, des substances potentiellement lésionnelles et des facteurs fibrosants (Revue par Vanhée et al., 1995). La fibrose enserre les poussières et les débris cellulaires dans un amas fibroconiotique, ainsi les poussières restent toujours présentes, emprisonnées dans les tissus. Au fur et à mesure de l'empoussiérage, la maladie s'étend inexorablement. Une fois initiée, la pneumoconiose est irréversible et progressive.

## ***C, Fibrose.***

La fibrose est un élément ultime et non constant du processus inflammatoire d'alvéolite. Son initiation dépend de la sévérité et de la durée de dénudation de l'alvéole, de l'importance de l'infiltrat inflammatoire et de la non résorption de l'exsudat intra-alvéolaire. La fibrose consiste en un dépôt extracellulaire exagéré de collagène fibreux et autres protéines de la matrice extracellulaire. Il est notamment observé un déséquilibre du ratio collagène de type I / collagène de type III, en faveur du collagène de type I, rigide, qui prévaut alors sur le collagène de type III, plus élastique (Madri et Furthmayr, 1980). Ce processus s'accompagne d'une prolifération des fibroblastes, d'une rigidification de l'interstitium, d'un épaississement des structures et d'une diminution des échanges gazeux alvéolo-capillaires. (Revue par Phan, 1989; Burkhardt et Cottier, 1989; Carré et Léophonte, 1993; Kovacs et DiPietro, 1994; Bienkowski et Gotkin, 1995).

### ***1, Endommagement de l'épithélium.***

La mort des pneumocytes suite à une agression conduit à la dénudation de l'alvéole et à une dégradation partielle de la membrane basale. Le schéma de réaction qui en résulte dépend plus de la gravité des lésions que de la nature de l'agresseur. Si l'endommagement de l'épithélium est limité, les pneumocytes de type II prolifèrent et se différencient en pneumocytes de type I pour régénérer l'épithélium et reconstituer une architecture pulmonaire normale. De

tels événements de réparation mineure sont probablement fréquents, mais une fibrose diffuse peut se développer si le parenchyme pulmonaire subit un dommage important ou répété. Quatre mécanismes majeurs de formation des lésions fibrotiques ont été mis en évidence. (1) L'activation du métabolisme des fibroblastes par divers médiateurs, conduisant à une augmentation du tissu conjonctif dans l'interstitium. (2) La dénudation de l'alvéole est suivie du dépôt d'un exsudat composé de phagocytes, plaquettes, surfactant, débris cellulaires, fibrine et autres protéines sériques. S'il n'est pas résorbé, les pneumocytes de type II prolifèrent et forment un nouvel épithélium sur cet exsudat qui sera alors incorporé à la cloison alvéolaire, provoquant son épaissement. (3) L'endommagement des pneumocytes peut conduire à une production de surfactant moindre ou altérée. D'autre part, les protéines plasmatiques, et plus particulièrement la fibrine monomérique ou dégradée, sont de puissants inactivateurs des propriétés tensioactives du surfactant. La lésion de l'épithélium peut donc conduire à un collapsus spontané de l'alvéole. La fibrine et la fibronectine, protéines adhésives, peuvent contribuer à maintenir les parois de l'alvéole l'une contre l'autre, et la cicatrisation se fera en l'état. (4) L'endommagement de la membrane basale peut être suffisant pour permettre le passage des fibroblastes interstitiels dans la lumière alvéolaire. Ces fibroblastes, et le tissu conjonctif qu'ils sécrètent, formeront une protubérance qui sera ensuite recouverte par les pneumocytes. (Revue par Burkhardt, 1989; Burkhardt et Cottier, 1989).

## ***2, Endommagement de l'endothélium.***

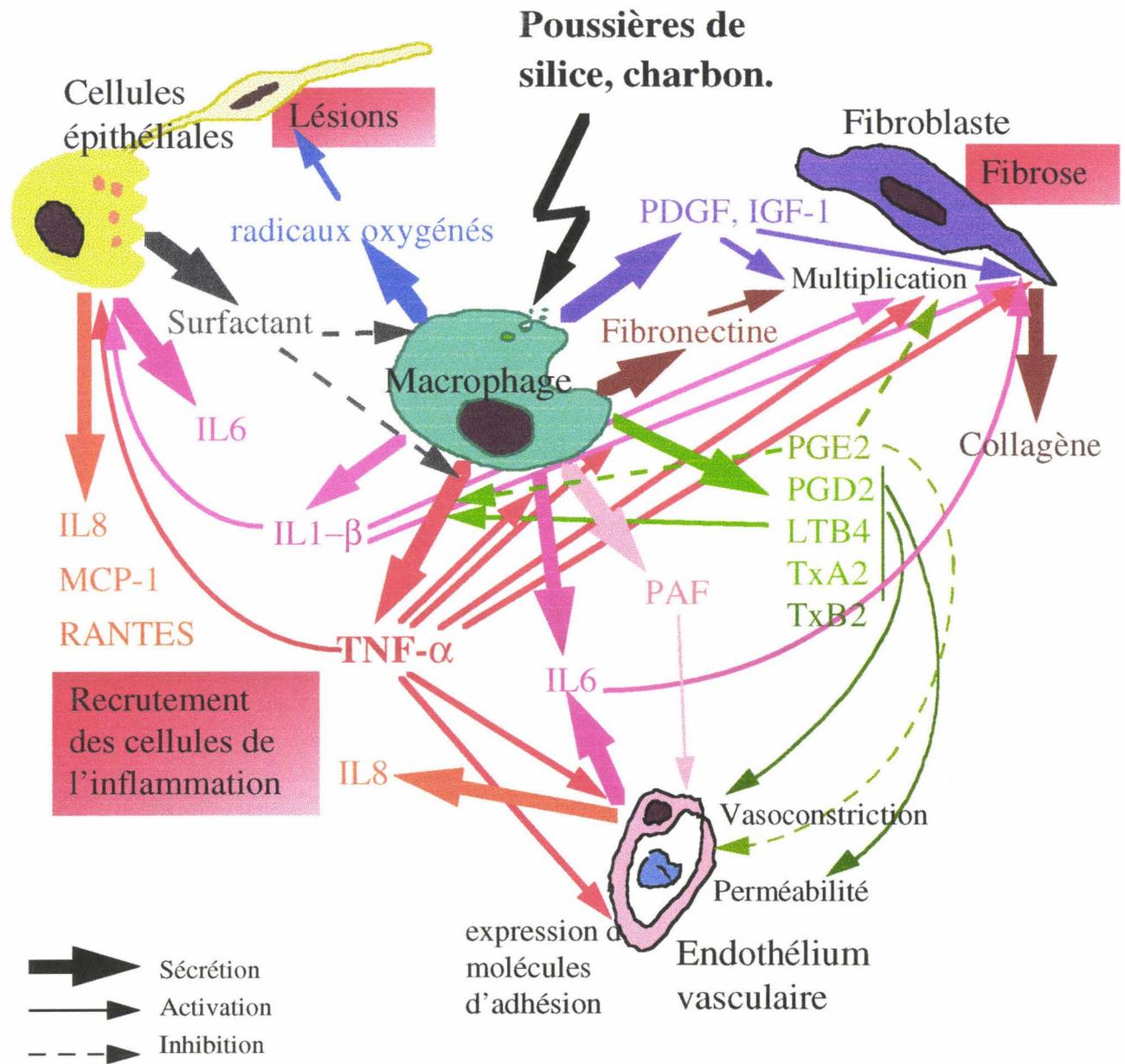
Bien que moins déterminant, l'endommagement de l'endothélium peut lui aussi participer à l'initiation de ces processus. La cellule endothéliale est, avec le pneumocyte de type I, la cellule la plus sensible aux agressions. Une conséquence majeure de la lésion de l'endothélium est l'augmentation de la vasoperméabilité qui permet le passage des protéines plasmatiques dans l'interstitium. Le contact des protéines plasmatiques avec les éléments de la matrice extracellulaire provoque l'activation du système de coagulation et du système du complément. Des médiateurs vasoactifs et inflammatoires sont alors générés amplifiant l'alvéolite, dont les conséquences ont été décrites préalablement.

### ***3, Rôle des macrophages dans le développement de la fibrose.***

Le recrutement, la prolifération et l'activation des fibroblastes, sources du tissu fibreux, sont modulés par des médiateurs cellulaires, principalement macrophagiques. De nombreuses études ont montré que les macrophages alvéolaires sont activés *in vitro* par les poussières de mines de charbon ou de silice (figure 2). Cette observation est corrélée au fait que les macrophages alvéolaires recueillis à partir de lavage bronchoalvéolaire de patients atteints de pneumoconiose sécrètent de nombreux médiateurs de façon accrue par rapport à ceux de sujets sains (Revue par Vanhée et al., 1994, 1995).

Parmi ces facteurs, la fibronectine a une forte activité chimiotactique pour les fibroblastes et son clivage par les enzymes protéolytiques du macrophage provoque le relargage de fragments eux-mêmes chimiotactiques. La fibronectine stimule d'autre part la prolifération des fibroblastes et facilite leur attachement à la matrice extracellulaire. Le PDGF a lui aussi une puissante activité chimiotactique pour les fibroblastes. Il est de plus le principal facteur de croissance des fibroblastes au niveau pulmonaire. D'autres cytokines, l'IGF-1 et les IL-1 $\alpha/\beta$ , stimulent la prolifération des fibroblastes. Le PDGF stimule la synthèse de collagène, tout comme les IL-1 $\alpha/\beta$  qui augmentent de plus la production d'acide hyaluronique. Des cytokines, c'est le TGF- $\beta$  qui a les effets les plus importants sur la production de matrice extracellulaire par les fibroblastes. Cependant, le rôle du TGF- $\beta$  dans la régulation des processus de fibrose est complexe: le TGF- $\beta$  a une puissante activité chimiotactique pour les fibroblastes, sans doute lié à sa capacité de stimuler la synthèse de fibronectine par les macrophages et les fibroblastes, mais son action sur la multiplication des fibroblastes n'est pas claire et semble dépendre de sa concentration. De même, le TNF- $\alpha$  stimule la prolifération de certaines lignées fibroblastiques à faible dose et bloque leur croissance à dose élevée. Le TNF- $\alpha$  est de plus décrit, selon les auteurs, comme stimulateur ou inhibiteur de la synthèse de collagène. Au contraire de l'effet stimulateur de la plupart des cytokines, les IFNs inhibent la prolifération des fibroblastes ainsi que leur synthèse de collagène.

**Figure 2: Effet de poussières inorganiques sur la sécrétion de médiateurs par le macrophage alvéolaire; conséquences sur les cellules de l'alvéole.**



Cellule / espèce	poussière	facteur	références
Macrophage / murin	Silice	IL-1	Gery et al., 1981
Macrophage / murin	Silice, abestose	IL-1	Oghiso et al., 1987
Monocyte / humain	Silice	IL-1	Schmidt et al., 1984
Macrophage / Humain	Charbon	Anion superoxide; fibronectine	Wallaert et al., 1987
Macrophage / murin	Silice, abestose	Fibronectine	Davies et al., 1989
Monocyte / humain	Silice, charbon	TNF	Borm et al., 1988
Macrophage / murin	Silice, abestose	TNF	Bisonette et al., 1989
Macrophage / Humain	Abestose	TNF	Perkins et al., 1993
Macrophage / Humain	Silice, abestose	TNF; LTB4	Dubois et al., 1989
Macrophage / murin	Silice, abestose	TNF; LTB4	Driscoll et al., 1990
Macrophage / Humain	Charbon	TNF, IL-6	Lassalle et al., 1990;
Macrophage / Humain	Silice, charbon	TNF, IL-6	Gosset et al., 1991
Macrophage / murin	Silice, charbon	PGE <sub>2</sub> ; TxA <sub>2</sub>	Kuhn et al., 1992
Macrophage / murin	Silice	PGE <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; TxB <sub>2</sub>	Mohr et al., 1992
Macrophage / Humain	Silice, charbon	PAF	Lapp et al., 1993
Macrophage / Humain	Silice, charbon	PDGF; TGF, IGF-1	Vanhée et al., 1994

Le processus de fibrose est due à un excès de synthèse de composant de la matrice extracellulaire, associé à un nombre accru de fibroblastes, mais résulte aussi sûrement, en partie, d'un déséquilibre de la balance protéases / antiprotéases. Les cytokines précitées régulent la synthèse de collagénases et d'inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs) par les macrophages alvéolaires et les fibroblastes. Là encore, leur effet semble parfois antagonistes: L'IL-6 augmente la production de TIMPs par les macrophages alvéolaires et les fibroblastes, Le TGF- $\beta$  à le même effet sur les fibroblastes tout en diminuant la synthèse de collagénase interstitielle pulmonaire, L'IL-1 augmente la production de TIMPs par de nombreuses cellules dont les fibroblastes mais stimule, paradoxalement, leur sécrétion de collagénase et celle des macrophages alvéolaires. Enfin, le TNF- $\alpha$  stimule la sécrétion de collagénase par les fibroblastes.

#### ***D, Emphysème.***

L'emphysème est une pathologie pulmonaire caractérisée par un élargissement permanent et anormal des espaces aériens distaux, associé à la destruction des cloisons alvéolaires, sans fibrose manifeste (Snider et al., 1985). Dans le cas de la pneumoconiose, l'emphysème est associé à la présence de lésions fibrotiques. Il existe de plus une relation significative entre les lésions emphysemateuses et la charge anthracosique du poumon (Leigh et al., 1993). L'emphysème du mineur de charbon est focal, il commence au niveau des bronchioles, dans la portion centrale des lobules, puis s'étend vers la périphérie. Ainsi, la disposition anatomique des lésions emphysemateuses est soit de type centrolobulaire, développées au contact des formations fibroconiotiques débutantes, soit de type panlobulaire, réalisant parfois de volumineuses bulles au voisinage de lésions nodulaires ou pseudo tumorales (Ruckley et al., 1984). Le mécanisme sous-jacent de l'emphysème semble être le déséquilibre de la balance protéase / anti-protéase. La réponse inflammatoire persistante est associée à un relargage trop important d'enzymes protéolytiques et élastolytiques par les neutrophiles et les macrophages alvéolaires. D'autre part, la silice inactive, du moins *in vitro*, l' $\alpha$ 1-antiprotéinase, par des mécanismes dépendants du peroxyde d'hydrogène (Zay et al., 1995).

## ***E, Conclusion.***

Alors que l'alvéolite est généralement réversible, soit spontanément, soit sous l'action d'agents thérapeutiques tels les corticoïdes, la fibrose et l'emphysème sont le plus souvent irréversibles, et l'on ne connaît pas d'agents pharmacologiques capables de les faire disparaître. Les macrophages jouent un rôle important dans l'induction de la pneumoconiose, par l'endommagement des tissus, la pérennisation de l'alvéolite inflammatoire et la sécrétion de médiateurs pro-fibrosants. Une meilleure connaissance des mécanismes de recrutement et de modulation de la réponse immunitaire reste nécessaire pour mieux appréhender de telles pathologies pulmonaires,

## ***Travaux de recherche.***

### ***I Etude de la production pulmonaire de chimiokines (MCP-1, MIP-1a et RANTES) chez des patients atteints de pneumoconiose de mineur de charbon.***

*Intérêt et but du travail.*

*Matériel et Méthodes.*

*Résultats.*

*Discussion.*

### ***II Etude de la coopération entre les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires pour la production de cytokines.***

*Intérêt et but du travail.*

*Matériel et Méthodes.*

*Résultats.*

*Discussion.*

*1, Mécanismes de la coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires.*

*2, Intérêt et limite du modèle, perspectives.*

# ***I Etude de la production pulmonaire de chimiokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ et RANTES) chez les patients atteints de pneumoconiose du mineur de charbon.***

## ***Intérêt et but du travail***

Il a précédemment été démontré, dans le laboratoire, un état d'activation spontanée des macrophages alvéolaires provenant de patients atteints de pneumoconiose du mineur de charbon. Ceux-ci présentaient une sécrétion accrue, par rapport aux macrophages alvéolaires de sujets sains, d'anion superoxyde, de fibronectine, de facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles (Wallaert *et al.*, 1987), de monokines à activité pro-inflammatoire comme le TNF $\alpha$  et l'IL-6 (Lassalle *et al.*, 1990; Vanhée *et al.*, 1994, 1995b) et de facteurs pro-fibrosants comme le PDGF et l'IGF-1 (Vanhée *et al.*, 1994b). Ces résultats confirmaient le concept selon lequel,

(1) le macrophage alvéolaire est une cellule clé de l'initiation, de la modulation et de la pérennisation de la réaction inflammatoire alvéolaire, et

(2) l'alvéolite macrophagique joue un rôle essentiel dans le développement de la fibrose.

L'accumulation de macrophages au niveau de l'alvéole est principalement le résultat d'un recrutement actif des monocytes sanguins, suite à une sécrétion accrue de facteurs chimioattractants par les cellules résidentes (Revue par Furie et Randolph; 1995). Cependant, peu de travaux ont évalué le rôle de médiateurs potentiellement impliqués dans la pathogénèse de l'alvéolite macrophagique observée dans les pathologies interstitielles humaines provoquées par l'inhalation de particules minérales. Dans la continuité du travail réalisé dans le laboratoire, nous nous sommes intéressés à la production de certaines chimiokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et RANTES) participant potentiellement au recrutement des monocytes/macrophages au cours de la pneumoconiose du mineur de charbon. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude du MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), car cette protéine est considérée comme la plus puissante des chimiokines ayant une activité vis-à-vis des monocytes (Uguccioni *et al.*, 1995).

Afin d'établir si les taux de MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et RANTES étaient augmentés dans le fluide de l'espace aérien des patients pneumoconiotiques, nous avons dosé ces chimiokines dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients pneumoconiotiques, aux deux stades d'évolution de la maladie (pneumoconiose simple et fibrose massive progressive), et de sujets contrôles.

Nous nous sommes, d'autre part, intéressés aux macrophages alvéolaires (MA), cellule clé de la réaction l'inflammatoire, et avons cherché à établir s'ils intervenaient dans leur propre recrutement, via la sécrétion de ces chimiokines. De façon à évaluer leur activité *in vivo*, leur sécrétion spontanée *ex vivo* de chimiokines a été déterminée.

Enfin, le MCP-1 pouvant être produit, *in vitro*, par de nombreuses cellules sous l'effet d'un stimulus adéquate (Revue par ), nous avons cherché à préciser, pour cette pathologie interstitielle, quelles cellules étaient responsables de sa production au niveau pulmonaire. Dans ce but, la protéine MCP-1 a été localisée, par immunohistochimie, sur des coupes de poumon.

## ***Matériel et Méthodes***

### ***Patients inclus dans l'étude.***

Dans cette étude ont été inclus vingt-sept patients, ayant travaillé comme mineurs dans l'industrie minière du "bassin houiller du Nord et du Pas-de-Calais", et étant atteints de pneumoconiose du mineur de charbon. Le diagnostic de pneumoconiose et la séparation en deux groupes, pneumoconiose simple (PS) et fibrose massive progressive (FMP), ont été réalisés selon les critères radiologiques définis précédemment (Soutar et Collins, 1984), c'est à dire, en fonction de la taille et de l'étendue des opacités radiologiques. Les patients atteints de PS étaient au nombre de seize, leur âge était compris entre 55 et 73 ans (avec une moyenne de  $63,1 \pm 1,7$  ans) et la durée moyenne de leur exposition à la poussière de charbon était de  $26 \pm 2$  ans (entre 15 et 32 ans). Les onze autres patients, atteints de FMP, étaient âgés de 60 à 80 ans ( $69,4 \pm 2,0$  ans en moyenne) et avaient été exposés à la poussière de charbon pendant  $26 \pm 4$  années en moyenne (entre 20 et 34 ans). Le groupe témoin était constitué de seize personnes en bonne santé, n'ayant jamais été exposées à la poussière de charbon et étant âgées de 24 à 72 ans ( $51,7 \pm 4,0$  ans en moyenne). Aucune de ces 43 personnes n'était sous corticothérapie au moment du lavage, et elles n'avaient jamais fumé ou avaient arrêté depuis plus de cinq ans.

### ***Lavage bronchoalvéolaire et macrophages alvéolaires humains.***

#### ***\* Lavage bronchoalvéolaire.***

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est effectué lors d'une fibroscopie bronchique (Département de pneumologie, Hôpital Calmette, Lille). Le LBA est réalisé par injection et aspiration successives de cinq fois 50 ml de liquide physiologique au niveau d'une bronche sous-segmentaire. Le liquide de lavage (mis à part la première fraction de 50 ml, considérée comme représentative de l'étage bronchiolaire) est collecté dans des tubes stériles, filtré sur des gazes chirurgicales stériles puis centrifugé à 400 g, 7 min à 4°C.

*\* Liquide du LBA.*

Un aliquote (20 ml) du liquide de LBA est lyophilisé et conservé à 4° C. Pour le dosage des cytokines, il est repris dans 1/10 du volume initial, en eau pour préparation injectable, puis conservé à -20° C. Le reste du liquide du LBA est conservé à -20° C.

*\* Cellules du LBA.*

Le culot cellulaire est rincé deux fois en RPMI 1640, puis resuspendu dans du RPMI 1640 contenant 5% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Gibco BRL, Paisly, Ecosse) (milieu de culture appelé RPMI 5%). La viabilité cellulaire est contrôlée par la méthode d'exclusion au bleu Trypan et tout échantillon cellulaire ayant une viabilité inférieure à 85 % est exclu du protocole. La numération cellulaire est réalisée à l'aide d'une cellule de thoma. La formule cellulaire est obtenue après cyto centrifugation sur lames de verre, fixation en éthanol et coloration par de l'éosine puis du bleu de méthylène (RAL, Paris, France), d'un aliquote de la préparation. Tout échantillon contenant moins de 80 % de MA est exclu du protocole.

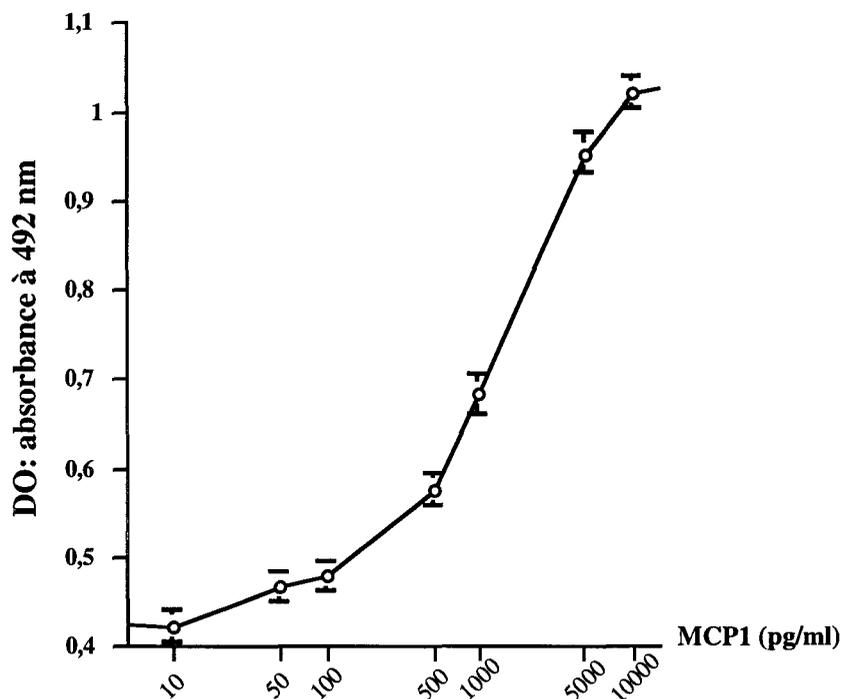
*\* Purification des macrophages alvéolaires humains.*

Les cellules du LBA sont mises en adhérence en boîte de pétri (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 2 h à 37° C en atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, à raison de 2 x 10<sup>6</sup> MA par puits de 35 mm de diamètre, dans 2 ml de RPMI 5 %. Les cellules non-adhérentes sont éliminées par trois rinçages successifs avec du milieu RPMI 5 %. Les cellules adhérentes, composées pour plus de 95 % de macrophages alvéolaires, sont incubées 3 h dans 2 ml de milieu RPMI 5 %. Le surnageant de culture est alors filtré à travers un filtre de porosité 0,22 µm (Millipore, Mosheim, France), puis conservé à -20° C sous forme d'aliquotes, jusqu'au dosage des cytokines.

## Dosage des cytokines

### \* Dosage protéique de MCP-1.

Nous avons développé un ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) permettant de détecter des concentrations de MCP-1 comprises entre 50 et 10000 pg/ml (Figure 3). Il présente l'avantage d'être conçu à l'aide de deux anticorps polyclonaux commercialisés et de nécessiter de faibles volumes d'échantillon pour obtenir des mesures reproductibles. La réactivité croisée éventuelle vis à vis de cytokines potentiellement contenues dans les liquides biologiques a été évaluée: aucune des cytokines testées (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , RANTES et TNF $\alpha$ ) n'a été détectée.



**Figure 3: Courbe standard de l'ELISA MCP-1.**

Moyenne  $\pm$  SEM de treize dosages réalisés en duplicata.

Les puits d'une plaque de microtitration (Microwell module, NUNC, Danemark) sont recouverts par un anticorps polyclonal de lapin anti-MCP-1 humain (Genzyme, Cambridge, MA) (50 µl par puits d'une solution d'anticorps à 4 µg / ml dans du NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mM, pH 8,2). La fixation se fait pendant une nuit à 4° C, puis la plaque est rincée deux fois avec du PBS contenant 0,05 % de Tween-20 (tampon identique pour tous les lavages). Les puits sont incubés 30 min avec 200 µl de PBS contenant 3 % d'albumine bovine (), de façon à bloquer les sites de fixation non spécifiques, puis pendant 90 min avec 50 µl d'échantillons ou de différentes concentrations de MCP-1 humain recombinant (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ) correspondant à la gamme. Chaque dosage est réalisé en duplicata. Toutes les dilutions (des échantillons, du MCP-1 et ensuite, des anticorps) se font dans de PBS contenant 1 % d'albumine bovine. Les incubations sont réalisées, sauf indication contraire, à 37° C. La plaque est rincée quatre fois, et de l'anticorps de chèvre anti-MCP-1 (RD System, Abingdom, UK) à 3 µg / ml est ajouté, à raison de 50 µl par puits. Après 90 min, la plaque est rincée quatre fois et chaque puits est incubé 90 min avec 50 µl d'anticorps de lapin biotinylé dirigé contre les IgG de chèvre (au I/500; Sigma, St Louis, MO). La plaque est rincée quatre fois et 50 µl d'une solution d'avidine peroxydase (CLB, Amsterdam), diluée au 1/10000<sup>ème</sup> dans du TBS / Tween, sont déposés dans chaque puits. Après 30 min à température ambiante, la plaque est rincée cinq fois en PBS / Tween et deux fois en TBS avant de répartir la solution substrat (solution de citrate 0,1 M à pH 5 contenant 0,4 mg / ml O-phenylènediamine et 0,03 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajoutée extemporanément), à raison de 50 µl par puits. La révélation est arrêtée par l'addition de 50 µl d'HCl 4N et la densité optique est lue à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en MCP-1 est calculée à partir de la courbe obtenue avec la gamme de dilution du MCP-1 standard. La valeur de 1 pg / ml est attribuée aux échantillons dont la concentration est inférieure à la limite de sensibilité.

*\* Dosage immunoenzymatique de MIP-1 $\alpha$  et de RANTES..*

Les dosages de MIP-1 $\alpha$  et de RANTES sont réalisés à l'aide d'ELISA commerciaux (RD Systems, Oxon, Angleterre) permettant de détecter des concentrations minimales de 2 et 2,5 pg / ml respectivement. Tous les dosages sont réalisés en duplicata. La valeur de 1 pg / ml a été attribuée aux échantillons dont la concentration est inférieure à la limite de sensibilité et celle de 2500 pg / ml à ceux (3 sur 41) contenant des taux de MIP-1 $\alpha$  supérieurs au seuil de détection de l'ELISA (2000 pg / ml) et pour lesquels le dosage n'a pas pu être fait à nouveau pour des raisons de quantité de matériel.

*Immunohistochimie sur coupe de tissu pulmonaire*

Les fragments de tissu pulmonaire sont obtenus à partir de lobectomies réalisées sur des patients présentant un cancer pulmonaire et (1) n'ayant jamais été exposés à la poussière de mine de charbon (n = 2) ou (2) atteints d'une pneumoconiose du mineur de charbon (n = 3). La biopsie est réalisée dans la région sous-pleurale, à distance de la zone néoplasique. Les échantillons sont fixés en paraformaldéhyde (4 % dans du tampon phosphate physiologique (PBS)), déshydratés, et inclus dans de la paraffine. Des coupes sériées de 6-7  $\mu$ m sont alors réalisées à l'aide d'un microtome. Les sections réhydratées sont perméabilisées par digestion pendant 10 min avec de la trypsine de type II (Sigma), lavées en PBS et saturées 1 h en PBS contenant 4 % de sérum humain (PBS - 4% SH). Les sections sont alors incubées une nuit à 4° C en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-MCP-1 humain (6  $\mu$ g / ml) (Genzyme, Cambridge, MA) préalablement immuno-adsorbé sur du sérum humain normal fixé sur de la sépharose. Après plusieurs lavages en PBS, les coupes sont incubées 90 min avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la biotine (Sigma, 1/300), lavées, incubées 30 min avec de l'extravidine phosphatase alcaline (Sigma, 1/200) et lavées à nouveau. Toutes les dilutions sont réalisées en PBS - 4% SH. La coloration est obtenue par incubation avec une solution Fast-Red (Sigma). La contre coloration est réalisée avec de l'hématoxyline de Gill. L'immunomarquage est complètement inhibé lorsque l'anticorps anti-MCP-1 est préincubé avec du MCP-1 humain recombinant, ce qui démontre la spécificité de cet anticorps.

### ***Analyses statistiques.***

Les données ayant une répartition Gaussienne sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (écart standart à la moyenne). La significativité des différences intergroupes est évaluée par une analyse de variance. La significativité d'une différence entre deux groupes est estimée par l'utilisation du test T.  $p < 0,05$  est considéré comme significatif.

Pour les valeurs ayant une distribution non paramétrique, la médiane et l'écart interquartile (EIQ, différence entre le 75<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> percentile) sont indiqués. La significativité des différences intergroupes est évaluée par le test de Kruskal-Wallis. La significativité d'une différence entre deux groupes est estimée par le test U de Mann-Withney.  $p < 0,05$  est considéré comme significatif. Les coefficients de corrélation sont obtenus par l'utilisation du test de Spearman.

## Résultats

### Analyse cellulaire du lavage bronchoalvéolaire.

Le volume de liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) récolté était similaire pour les patients pneumoconiotiques et les sujets sains (Tableau 1). Le nombre total de cellules par millilitre de LBA était significativement supérieur chez les patients pneumoconiotiques, qu'ils soient atteints de PS ou de FMP. L'analyse cytologique indiquait que le nombre de lymphocytes et de neutrophiles était statistiquement analogue chez les patients pneumoconiotiques et les sujets sains; seul le nombre de MA était augmenté de façon significative chez les patients pneumoconiotiques. Il n'apparaissait pas, dans cette étude, de différence significative en ce qui concerne la cellularité des LBA, entre les patients atteints de SP et ceux ayant développé une FMP.

### Caractéristique du lavage bronchoalvéolaire des populations étudiées

Groupe / n	Volume (ml)	Cellularité (10 <sup>4</sup> /ml)	Macrophages		Lymphocytes		Neutrophiles	
			(%)	(10 <sup>4</sup> /ml)	(%)	(10 <sup>4</sup> /ml)	(%)	(10 <sup>4</sup> /ml)
Témoins 16	127±7,4	11,9±1,4	82,8±2,1	9,9±1,3	13,8±1,8	1,7±0,3	2,7±0,8	0,3±0,1
PS <sup>§</sup>	16 105,4±11,0	24,7±6,4 *	85,6±1,9	21,8±5,8 *	10,6±1,9	1,8±0,3	1,9±0,8	0,9±0,7
FMP <sup>§</sup>	11 114,1±11,0	33,8±6,1 **	87,3±2,3	30,2±5,9 **	8,6±1,7	2,6±0,4	2,3±1,2	1,0±0,3

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± ECM.

\* et \*\* : significativement différent du groupe témoin avec p<0,05 et p<0,001 respectivement.

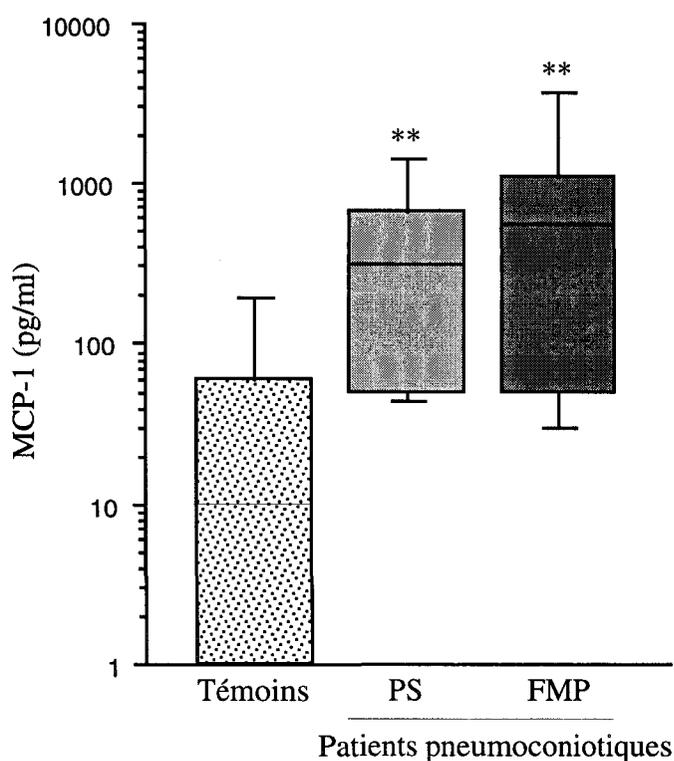
§ PS: Pneumoconiose Simple.

§ FMP: Fibrose Massive Progressive.

## Concentration des chimiokines dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire.

Afin de mesurer les concentration de chimiokines, le liquide du LBA a été concentré dix fois par lyophilisation. Les valeurs indiquées dans le texte (médiane; écart interquartile (EIQ)) et sur les figures sont celles mesurées dans les liquides concentrés.

**MCP-1.** Les liquides de lavage bronchoalvéolaire provenant des sujets témoins contiennent des taux de MCP-1 très faibles et parfois même inférieurs au seuil de détection de l'ELISA (médiane = 11 pg/ml; EIQ = 50 pg/ml; n = 14) (Figure 4). Les taux de MCP-1 sont significativement plus importants dans les liquides de LBA des patients atteints de pneumoconiose (médiane = 405 pg/ml; EIQ = 1030 pg/ml; n = 20) que dans ceux des sujets témoins. La différence de taux observée entre les groupes PS (médiane = 370 pg/ml; EIQ = 610 pg/ml; n =10) et FMP (médiane = 555 pg/ml; EIQ = 1060 pg/ml; n =10) n'est pas statistiquement significative. D'autre part, il n'existe pas de corrélation entre le nombre de macrophages alvéolaires et le taux de MCP-1 dans les liquides de LBA.



**Figure 4: MCP-1 dans les lavages bronchoalvéolaires concentrés dix fois.**

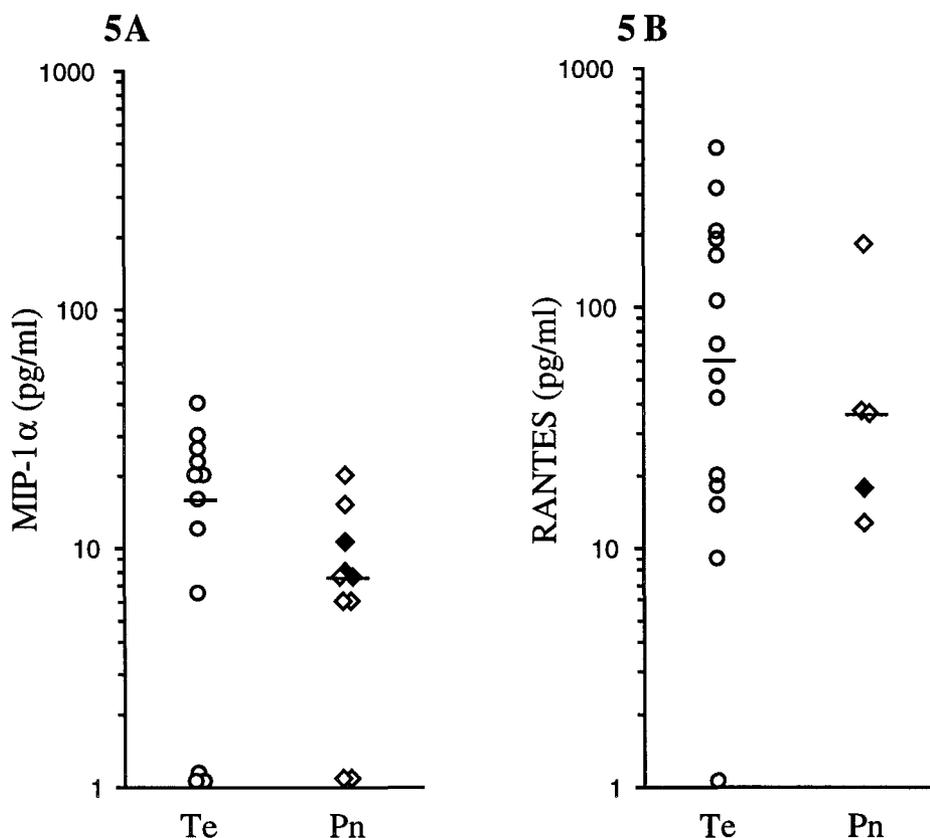
\*\* : significativement différent du groupe témoin avec  $p < 0,01$ .

Ligne horizontale: médiane; boîte: 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentile; barre: 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentile.

PS: Pneumoconiose simple (n=10). FMP: Fibrose massive progressive (n=10). Témoins (n=14).

**MIP-1 $\alpha$ .** Les liquides de LBA provenant de sujets témoins contiennent des taux faibles de MIP-1 $\alpha$  (médiane = 16,0 pg/ml; EIQ = 18,5 pg/ml; n = 13) (Figure 5A). Les liquides de LBA provenant de patients pneumoconiotiques contiennent des taux de MIP-1 $\alpha$  (médiane = 7,5 pg/ml; EIQ = 4,6 pg/ml; n = 10) statistiquement similaires aux taux des sujets contrôles. Il n'existe pas de corrélation entre le nombre de macrophages et le taux de MIP-1 $\alpha$  dans les liquides de LBA.

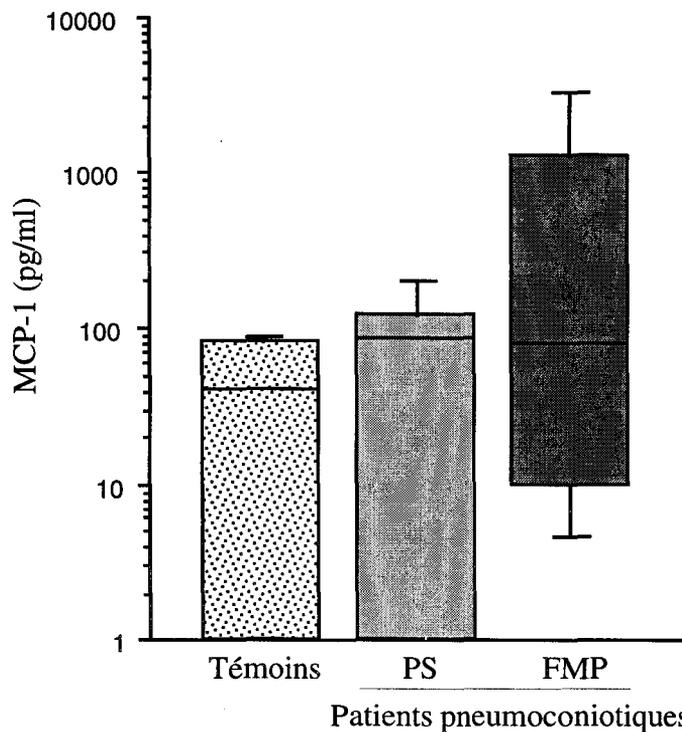
**RANTES.** Les taux de RANTES mesurés dans les liquides de LBA de témoins sont variables d'un sujet à l'autre (compris entre 1 et 460 pg/ml) (Figure 5B). Aucune différence statistique n'est mise en évidence entre les taux contenus dans les liquides de LBA de patients pneumoconiotiques (médiane = 36,0 pg/ml; EIQ = 57,0 pg/ml; n = 5) et dans ceux des sujets témoins (médiane = 61,0 pg/ml; EIQ = 172,0 pg/ml; n = 14). Il n'existe pas de corrélation entre le nombre de macrophages et le taux de RANTES dans les liquide de LBA.



**Figure 5:** MIP-1 $\alpha$  et RANTES dans les lavages bronchoalvéolaires concentrés dix fois. Te : Sujets témoins; Pn : Patients pneumoconiotiques; ○ : Sujets Témoins; ◇ : Patteints atteints de pneumoconiose simple; ◆ : Patients atteints de fibrose massive progressive; — : médiane.

## Sécrétion de chimiokines par les macrophages alvéolaires mis en culture durant trois heures.

**MCP-1.** Les taux de MCP-1 mesurés dans les surnageants de macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques (Figure 6) sont, pour des patients ayant le même statut, très différents les uns des autres: Ils varient de 1 à 1350 pg/ml pour les patients atteints de SP (médiane = 85 pg/ml; n = 15) et de 1 à 4150 pg/ml pour ceux ayant développé une FMP (médiane = 78 pg/ml; n = 9). Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, les macrophages alvéolaires de patients atteints de pneumoconiose (médiane = 83 pg/ml; EIQ = 192 pg/ml; n =24) ont tendance à sécréter spontanément plus de MCP-1 que ceux de sujets sains (médiane = 41 pg/ml; EIQ = 81 pg/ml; n =11). Ainsi, le taux de MCP-1 détecté dans les surnageants de macrophages alvéolaires de patients atteints de pneumoconiose est au dessus de la limite supérieure de l'intervalle de normalité (définie comme l'ensemble des valeurs comprises entre le 5<sup>ème</sup> et le 95<sup>ème</sup> percentile du groupe contrôle, soit 0 et 91 pg/ml respectivement), dans 7 cas sur 15 pour les patients atteints de SP (47 %) et, de façon similaire, dans 4 cas sur 9 pour ceux ayant développé une FMP (44 %).



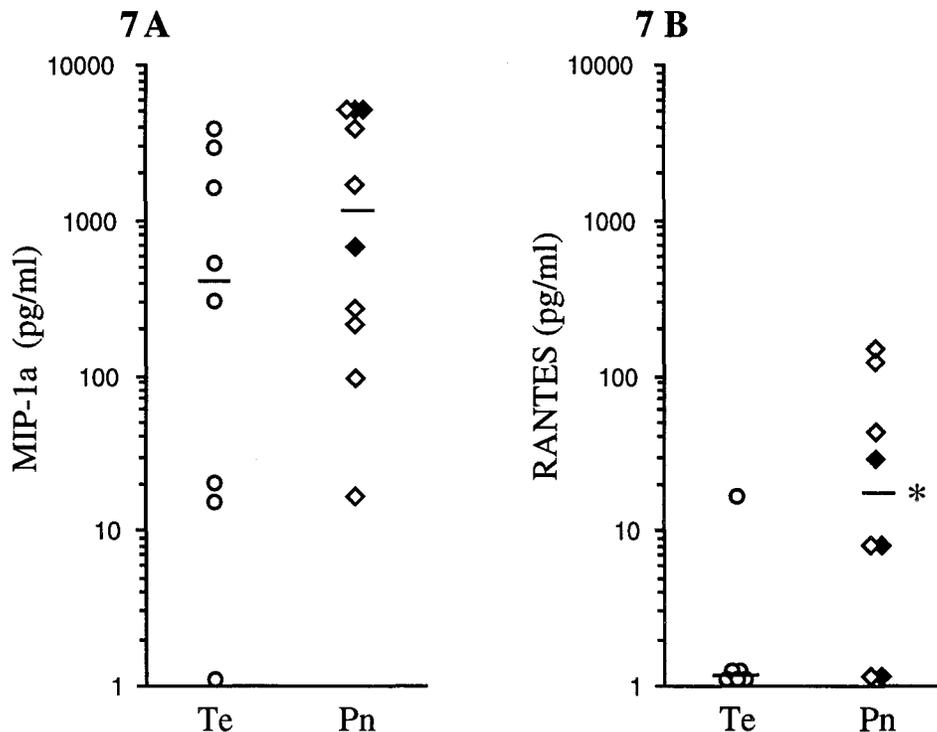
**Figure 6: MCP-1 dans les surnageants de culture de macrophages alvéolaires.**

Ligne horizontale: médiane; boîte: 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentile; barre: 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentile.

PS: Pneumoconiose simple (n=15). FMP: Fibrose massive progressive (n=9). Témoins (n=11).

**MIP-1 $\alpha$ .** Les taux de MIP-1 $\alpha$  dans les surnageants de macrophages alvéolaires sont hétérogènes, que ce soit au sein du groupe de sujets sains où ils varient de 1 à 3912 pg/ml (médiane = 417,5 pg/ml; n = 8), ou dans celui des patients pneumoconiotiques où ils sont compris entre 16 et 5000 pg/ml (médiane = 1175,5 pg/ml; n = 10) (Figure 7A). Les taux de MIP-1 $\alpha$  sécrétés par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques ne sont pas significativement différents de ceux relargués par les macrophages alvéolaires de sujets sains.

**RANTES.** A l'inverse, les taux de RANTES dans les surnageants de macrophages alvéolaires sont relativement homogènes au sein de chacun des deux groupes (Figure 7B). Les macrophages de sujets sains sécrètent des taux de RANTES très faibles (médiane = 1,0 pg/ml; EIQ = 0,0 pg/ml; n = 6). Les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques sécrètent statistiquement plus de RANTES (médiane = 18,0 pg/ml; EIQ = 76,5 pg/ml; n = 8) que ceux de sujets sains ( $p < 0,5$ ).



**Figure 7:**

**MIP-1 $\alpha$  et RANTES dans les lavages bronchoalvéolaires concentrés dix fois.**

Te : Sujets témoins; Pn : Patients pneumoconiotiques; ○ : Sujets Témoins; ◇ : Patteints atteints de pneumoconiose simple; ◆ : Patients atteints de fibrose massive progressive; — : médiane.

\* : Significativement différent du groupe témoin avec  $p < 0,05$ .

### **Corrélation entre les taux de chimiokines sécrétés par les macrophages alvéolaires en culture et ceux mesurés dans les liquides de LBA.**

Les taux de MCP-1 mesurés dans les surnageants de macrophages alvéolaires et ceux dosés dans les liquides de LBA sont étroitement corrélés ( $\rho = 0,47$ ;  $p < 0,02$ ).

Au contraire, il n'apparaît pas de corrélation, pour le MIP-1 $\alpha$  ou le RANTES, entre les taux déterminés dans les surnageants de macrophages alvéolaires et ceux appréciés dans les liquides de LBA.

### **Corrélation entre le nombre de macrophages recueillis par lavage bronchoalvéolaire et les taux de chimiokines sécrétés par ceux-ci.**

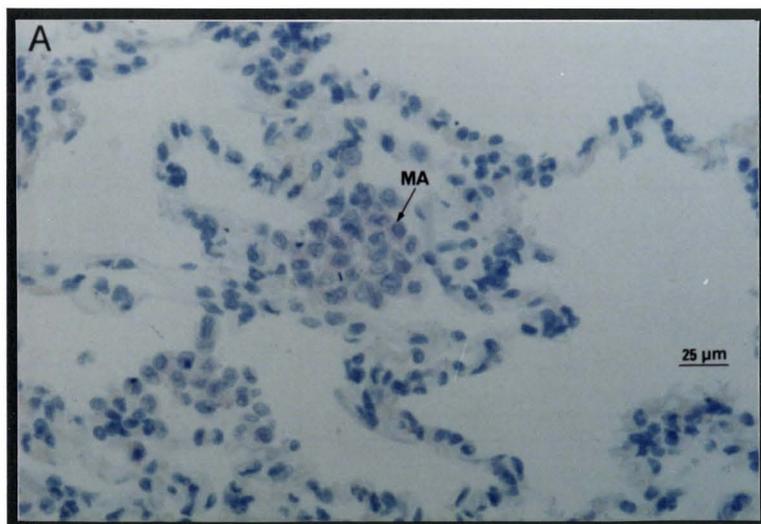
Il n'existe pas de corrélation entre le nombre de macrophages recueillis par lavage bronchoalvéolaire et les taux de MCP-1, de MIP-1 $\alpha$ , ou de RANTES dosés dans les surnageants de ces mêmes macrophages alvéolaires.

### **Localisation de la protéine MCP-1 sur les coupes de tissu pulmonaire.**

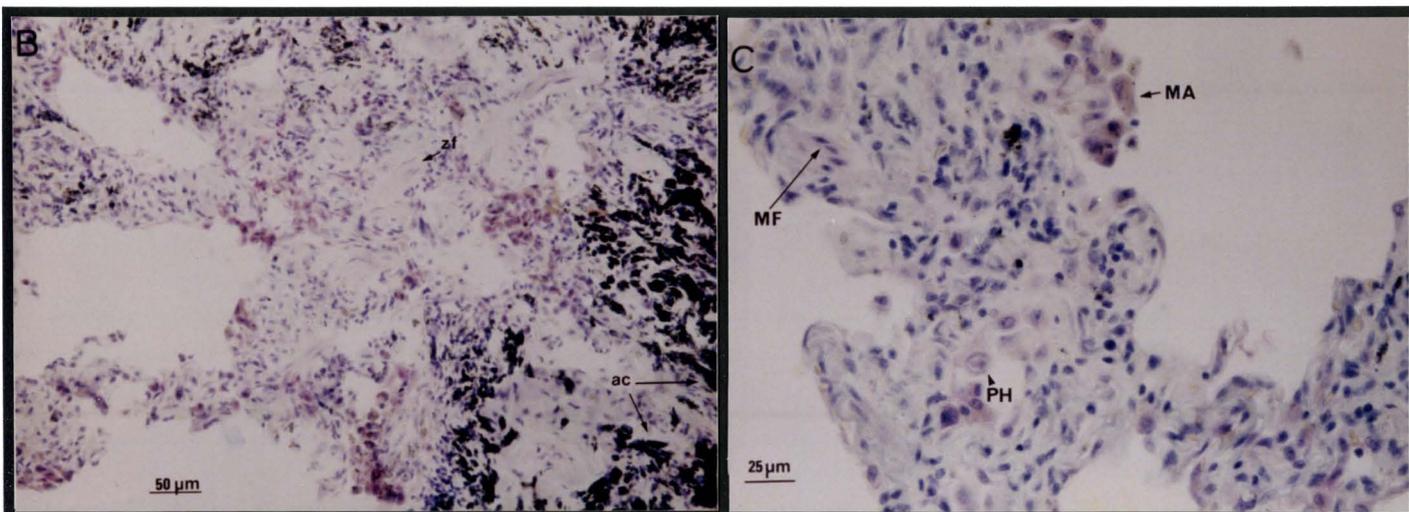
Les sections pulmonaires de patients atteints de pneumoconiose sont caractérisés par la présence d'amas coniotiques et de masses fibrotiques. Elles présentent, sous la surface pleurale, dans les espaces alvéolaires et au sein des tissus fibrotiques, des agrégats de macrophages chargés de poussière de charbon, ayant l'aspect de micronodules de forme stellaire. L'observation en microscopie sous lumière polarisée révèle l'existence de particules biréfringentes disséminées sur toute la surface des nodules. Les micronodules contiennent des cellules myofibroblastiques qui ne sont pas associées aux vaisseaux ni aux bronches. Ces sections sont aussi caractérisées par un nombre de macrophages alvéolaires supérieur à celui des sections contrôles et l'hyperplasie de nombreux pneumocytes de type II.

Dans les sections pulmonaires de sujets contrôles, un quart des macrophages alvéolaires est marqué par l'anticorps anti-MCP-1 (Figure 8A). De plus, dans certaines zones, des pneumocytes de type II et des cellules musculaires lisses périvasculaires sont positives pour l'expression du MCP-1.

*Figure 8: Localisation par immunohistochimie de la protéine MCP-1, sur des coupes de tissus pulmonaires.*



**8A:** Coupe représentative de tissu pulmonaire provenant d'un sujet contrôlé, marquée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le MCP-1. Des macrophages alvéolaires (MA) sont positifs pour l'expression de MCP-1.



**8B:** Coupe représentative de tissu pulmonaire provenant d'un patient atteint de pneumoconiose du mineur de charbon. Ces sections sont caractérisées par la présence d'amas coniotiques (ac) et des zones fibrotiques (zf).

**8C:** Coupe représentative de tissu pulmonaire provenant d'un patient atteint de pneumoconiose du mineur de charbon. Des macrophages alvéolaires (MA), des pneumocytes hyperplasiques de type II (PH) et des myofibroblastes (MF) sont marqués par l'anticorps anti-MCP-1.

Dans les sections pulmonaires des patients pneumoconiotiques, les cellules musculaires lisses périvasculaires sont positives pour le MCP-1 de la même façon que dans les coupes contrôles (figure 8B, 8C). Pour deux des trois patients pneumoconiotiques étudiés, la proportion de macrophages alvéolaires marqués par l'anticorps anti-MCP-1 (24 et 26 %) est identique à celle observée sur les coupes pulmonaires des sujets contrôles (21 et 28 %). Le troisième présente une proportion de macrophages alvéolaires positifs supérieure (47 %). Les macrophages interstitiels sont positifs, ainsi que les fibroblastes des zones fibrotiques. L'aspect de ces fibroblastes, ainsi que leur localisation, suggèrent que ce sont des myofibroblastes. Les pneumocytes de type II hyperplasiques expriment fortement le MCP-1.

## ***Discussion***

Dans cette étude, nous avons évalué le taux de MCP-1, de MIP-1 $\alpha$  et de RANTES dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires, car ceux-ci donnent une bonne image des caractéristiques du fluide de l'espace aérien, et donc de l'activité *in vivo* des cellules de l'alvéole.

### **Chimiokines dans les lavages bronchoalvéolaires.**

Les taux de MCP-1 et de RANTES dans les liquides de lavage des sujets témoins étaient relativement hétérogènes, variant respectivement de 1 à 330 pg/ml et de 1 à 460 pg/ml. Cette observation suggère que:

- la production de MCP-1 et de RANTES au niveau pulmonaire est potentiellement induite par l'exposition quotidienne à la pollution urbaine (poussières, gaz...);
- il pourrait exister une différence inter-individuelle dans la régulation des gènes codant pour le MCP-1 et le RANTES (ou d'un troisième médiateur contrôlant l'expression des deux premiers), liée soit à une disparité, déterminée génétiquement, du niveau de la sécrétion basale, soit à une inégalité de susceptibilité vis-à-vis de stimuli divers,

ces deux propositions n'étant pas nécessairement exclusives l'une de l'autre.

Néanmoins, les taux de MCP-1 dans les liquides de LBA étaient significativement supérieurs pour les patients atteints de pneumoconiose, par rapport aux sujets témoins. Tous les lavages de sujets sains contenaient des taux de MCP-1 inférieurs à la médiane des taux mesurés dans les lavages des patients pneumoconiotiques. Ainsi, il semble que la chimiokine MCP-1 soit impliquée dans le développement et la pérennisation de l'alvéolite macrophagique associée à la pneumoconiose du mineur de charbon.

A l'inverse, notre étude indique que les taux de MIP-1 $\alpha$  et de RANTES ne sont pas augmentés dans les liquides de LBA de patients pneumoconiotiques, par rapport à ceux de sujets sains. Ces deux chimiokines ne doivent donc pas avoir un rôle majeur dans l'alvéolite macrophagique qui caractérise cette pathologie. Il est intéressant de noter que, contrairement à ce que nous avons montré dans la pneumoconiose, le taux de MIP-1 $\alpha$  est augmenté de façon

significative dans les liquides de LBA provenant de patients atteints de sarcoïdose ou de fibrose interstitielle diffuse (FID) (Standiford *et al.*, 1993). Cette chimiokine a donc un rôle plus important dans d'autres pathologies interstitielles associées à une accumulation, au niveau de l'alvéole, d'un type cellulaire différent (alvéolite lymphocytaire et neutrophilique, respectivement).

### **Absence de corrélation entre le nombre de macrophages et le taux de MCP-1 dans les LBA.**

Dans la mesure où aucune corrélation n'a pu être établie entre le nombre de macrophages et le taux de MCP-1 dans les lavages, il est vraisemblable que le MCP-1 ne soit pas le seul facteur responsable de l'accumulation des macrophages dans l'espace alvéolaire. De façon similaire, une étude sur des patients atteints de sarcoïdose ou de FID a montré que, dans chacune de ces deux pneumopathies interstitielles, le taux de MCP-1 ainsi que l'activité chimiotactique vis-à-vis des monocytes étaient augmentés dans les LBA, sans qu'il existe une corrélation entre ces deux paramètres (Car *et al.*, 1994).

Le MIP-1 $\alpha$  et de RANTES ne semblent pas intervenir, mais d'autres chimiokines (MCP-2, MCP-3), les anaphylatoxines C3a et C5a, et plus récemment l'IL-13 et le MCP-4, sont connues pour avoir une activité chimioattractrice vis-à-vis des monocytes (Oppenheim *et al.*, 1991; Magazin *et al.*, 1994). Bien que des études récentes aient montré *in vitro* que le MCP-1 était la plus puissante des chimiokines actives sur les monocytes (Ugucioni *et al.*, 1995; Garcia-Zepeda *et al.*, 1996), il est fortement probable que l'effet combiné de ces chimioattractants soit primordial dans les processus inflammatoires pulmonaires, et masque l'action individuelle de chacun d'eux.

De plus, outre l'implication probable d'autres chimioattractants, l'absence de corrélation entre le nombre de macrophages et le taux de MCP-1 dans les lavages reflète aussi le fait que le recrutement des monocytes ne résulte pas uniquement d'un gradient de chimioattractants, mais implique différentes étapes successives, incluant le roulement ("rolling"), l'adhérence aux cellules endothéliales, et l'extravasation, régulées par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (revue par Lukacs et Ward, 1996).

## **Effets potentiels de la surexpression de MCP-1 dans la pneumoconiose du mineur de charbon.**

Nous avons récemment mis en évidence que la molécule d'adhérence ICAM-1, qui joue un rôle majeur dans la migration des monocytes, était exprimée de façon plus importante dans les poumons de patients pneumoconiotiques que dans ceux de sujets sains, notamment au niveau des cellules endothéliales, des cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques, et des macrophages alvéolaires (Vanhée *et al.*, 1996). Le MCP-1 ayant la capacité d'induire, *in vitro*, une expression accrue des molécules d'adhérence MAC1 et p150,95 (ligands naturels de l'ICAM-1) par les monocytes (Jiang *et al.*, 1992), il est probable que cette chimiokine soit impliquée dans les étapes d'adhérence durant le recrutement des monocytes.

D'autre part, il a été montré que le MCP-1 induisait, *in vitro*, une augmentation du flux calcique, du métabolisme oxydatif et de l'expression d'IL-6 et d'IL-1 par les monocytes (Rollins *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1992). Le MCP-1 pourrait donc être, *in vivo*, un des médiateurs responsables de l'état d'activation (ou de préactivation) des phagocytes mononucléés, observé dans la pneumoconiose. Il apparaît, en effet, que les monocytes sanguins d'anciens mineurs pneumoconiotiques, de même que les macrophages péritonéaux de rats ayant inhalé de la silice, sécrétaient un taux accru de TNF en réponse à de faibles doses de LPS, bien qu'ils n'aient pas été directement en contact avec les particules inhalées, et donc n'aient pas pu être directement activées par celles-ci (Borm *et al.*, 1988; Mohr *et al.*, 1991).

Enfin, outre son rôle dans l'activation et le recrutement des monocytes qui aboutit à une alvéolite macrophagique, l'augmentation du taux de MCP-1 au niveau alvéolaire chez les patients pneumoconiotiques pourrait avoir un effet plus direct sur la survenue des lésions fibrotiques. Une étude récente a en effet démontré que le MCP-1 induisait indirectement une synthèse accrue de collagène par des fibroblastes de rat en culture primaire, via l'augmentation de l'expression endogène de TGF $\beta$  (Gharaee-Kermani *et al.*; 1996).

## **Rôle des macrophages alvéolaires dans la production de ces chimiokines.**

Le nombre de macrophages alvéolaires positifs pour l'expression de MCP-1 sur les coupes de tissu pulmonaire provenant de patients pneumoconiotiques était supérieur à celui observé sur les sections contrôles, mais cette différence n'était due qu'à l'augmentation du nombre total de macrophages dans l'espace alvéolaire; la proportion de macrophages marqués était similaire pour les contrôles et les patients pneumoconiotiques dans deux cas sur trois. D'autre part, la sécrétion de MCP-1 par les macrophages alvéolaires, mesurée dans les surnageants après trois heures de culture, bien qu'étant augmentée chez 45% des patients, n'était pas significativement différente entre les patients pneumoconiotiques et les sujets contrôles. Ces deux observations convergentes indiquent que les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques ne sécrètent pas systématiquement plus de MCP-1 que ceux de sujets contrôles. De même, les taux de MIP-1 $\alpha$  sécrétés spontanément par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques ne sont pas significativement différents de ceux relargués par les macrophages alvéolaires de sujets sains.

Ces résultats diffèrent de ceux concernant la production de TNF $\alpha$  et d'IL-6 par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques, puisque ceux-ci produisent des taux significativement accrus de ces deux cytokines pro-inflammatoires par rapport aux contrôles (Vanhée *et al.*, 1995b). Cette observation suggère que (1) la sécrétion de MCP-1 et de MIP-1 $\alpha$  par les macrophages alvéolaires est dépendante de mécanismes de régulation différents de ceux contrôlant la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-6, et que d'autre part, (2) le rôle des macrophages alvéolaires dans le développement des processus inflammatoires, et en particulier dans l'établissement de l'alvéolite macrophagique, dépend visiblement plus de l'activation paracrine d'autres types cellulaires via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, que d'un autorecrutement via la sécrétion de facteurs chimioattractants vis-à-vis des monocytes.

Les taux de RANTES étaient supérieurs dans les surnageants de culture des macrophages alvéolaires provenant de patients pneumoconiotiques par rapport à ceux des sujets contrôles. Ni notre étude, ni les données de la littérature, ne permettent de comprendre pourquoi la sécrétion de cette chimiokine par les macrophages alvéolaires est régulée de manière différente

du MCP-1 et du MIP-1 $\alpha$  (ces trois chimiokines sont classiquement induites par les mêmes médiateurs). Nous pouvons, par contre, observer que les macrophages alvéolaires de sujets sains ne sécrètent pratiquement pas de RANTES et ceux de patients pneumoconiotiques en sécrètent significativement plus, alors que les taux de RANTES contenus dans les liquides de LBA de sujets sains ne sont pas nuls, et ne sont pas significativement différents de ceux des patients pneumoconiotiques. Ce qui implique que (1) d'autres cellules pulmonaires, mis à part les macrophages alvéolaires, sécrètent du RANTES et que (2) dans le cas de la pneumoconiose, l'augmentation de la sécrétion de RANTES par les macrophages alvéolaires n'est pas suffisamment importante pour influencer sur le taux de RANTES au niveau de l'alvéole. Ce dernier point renforce la réflexion évoquée précédemment selon laquelle l'intervention des macrophages alvéolaires dans l'établissement de l'alvéolite macrophagique ne semble pas être médiée par sa propre sécrétion de facteurs chimiotactique vis-à-vis des monocytes.

### **Cellules pulmonaires productrices de MCP-1.**

Un autre aspect de ce travail a consisté à déterminer les types cellulaires responsables *in vivo* de l'expression de MCP-1. *In vitro*, de nombreuses cellules peuvent produire le MCP-1, comme les cellules endothéliales (Rollins *et al.*, 1990), les fibroblastes (Rolfe *et al.*, 1992), les pneumocytes de type II (Standiford *et al.*, 1991), les cellules mésothéliales (Antony *et al.*, 1995) et les leucocytes mononucléés sanguins (Yoshimura *et al.*, 1989). Dans cette étude, nous avons mis en évidence, par marquage immunohistochimique, que (1) sur les coupes de tissu pulmonaire contrôle, seuls quelques macrophages alvéolaires, pneumocytes de type II et cellules musculaires périvasculaires étaient positifs pour l'expression de la protéine MCP-1, (2) sur les sections de tissu pulmonaire provenant de patients pneumoconiotiques, en plus de ces cellules, étaient positifs des fibroblastes présents dans les zones fibrotiques, ainsi que des pneumocytes de type II hyperplasiques, cellules non détectées sur les coupes contrôles. Cette évolution du profil d'expression du MCP-1 dans la pneumoconiose est différente de celle observée dans le cas de la fibrose idiopathique pulmonaire, dans la mesure où il n'a pas été décrit de localisation du MCP-1 dans les fibroblastes pour cette pathologie (Antoniades *et al.*, 1992).

## **Mécanismes conduisant à la surexpression de MCP-1.**

L'étude des mécanismes conduisant à la surproduction de MCP-1 au niveau pulmonaire, chez les patients pneumoconiotiques, n'était pas le but de ce travail. Nous pouvons cependant remarquer qu'elle est associée à une expression plus importante de la protéine par des fibroblastes et les pneumocytes hyperplasiques, non détectés chez les sujets sains. Cette expression est potentiellement la conséquence d'une activation directe par les particules de charbon. Elle peut aussi résulter d'une communication intercellulaire en partie via des médiateurs solubles, dans la mesure où il a été rapporté que les fibroblastes et les pneumocytes de type II sécrètent du MCP-1 sous l'effet de milieu conditionné par des macrophages activés (Rolfe *et al.*, 1992; Standiford *et al.*, 1991). De plus, il est concevable que la cascade d'activation cellulaire soit dépendante d'interactions cellulaires impliquant des récepteurs membranaires spécifiques. Il a en effet été montré que, d'une part, l'interaction des monocytes avec l'ICAM-1 exprimé par des cellules endothéliales activées, conduisait à une production accrue de MIP-1 $\alpha$  par les monocytes (Lukacs *et al.*, 1994) et que, d'autre part, la production d'IL-8 et de MCP-1 était augmentée durant les interactions monocytes - cellules endothéliales, par des mécanismes en partie dépendants de l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire (Lukacs *et al.*, 1995).

## ***Conclusion.***

Cette étude met en évidence une surproduction pulmonaire de la chimiokine MCP-1 chez les patients atteints de la pneumoconiose du mineur de charbon, suggérant l'implication du MCP-1 dans l'alvéolite macrophagique associée à cette pathologie interstitielle. D'autre part, ce travail fait apparaître qu'en coopération avec les macrophages alvéolaires, les fibroblastes (probablement des myofibroblastes) et les pneumocytes de types II hyperplasiques sont responsables de cette augmentation. L'absence de corrélation entre le nombre de macrophages alvéolaires et le taux de MCP-1 dans les lavages bronchoalvéolaires est cohérent avec le concept que le recrutement des monocytes / macrophages au cours de l'alvéolite macrophagique observée chez les patients pneumoconiotiques dépend vraisemblablement de plus d'un médiateur, incluant d'autres facteurs chimiotactiques vis-à-vis des monocytes, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires.

## ***II Etude de la coopération entre les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires pour la production de cytokines.***

### ***Intérêt et but du travail.***

La première partie de ce travail de thèse a consisté à étudier l'implication de certaines chimiokines dans le recrutement des monocytes, au niveau de l'alvéole, dans une pathologie interstitielle associée à une alvéolite macrophagique. Nous avons montré une surproduction pulmonaire de MCP-1 chez les patients pneumoconiotiques. D'autre part, nous avons mis en évidence que, outre les macrophages alvéolaires, les fibroblastes et les pneumocytes de type II hyperplasiques participaient à cette surproduction, contribuant ainsi à l'établissement de la réaction inflammatoire.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié si, en plus de contribuer à l'alvéolite macrophagique via la sécrétion de chimioattractants, les pneumocytes de type II pouvaient moduler l'activité des macrophages alvéolaires résidents. En effet, les macrophages alvéolaires sont en contact étroit avec les pneumocytes de type II au niveau de l'alvéole (Bilyk *et al.*, 1996), et bien que le macrophage alvéolaire ait fait l'objet de nombreuses études, l'influence, sur son activité, de son environnement cellulaire alvéolaire, est très peu documentée.

Les pneumocytes de type II (PII) sont classiquement considérés comme des cellules de structure contribuant, de plus, à l'homéostasie de l'alvéole. Cette cellule au métabolisme actif assure ainsi la synthèse et le renouvellement du surfactant pulmonaire, le transport transépithélial de solutés, et la réépithélisation de l'alvéole suite aux lésions de l'épithélium (Mason *et al.*, 1977; Crestani *et al.*, 1995). Cependant, il a été suggéré plus récemment que le PII participait aussi à la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires au niveau de l'alvéole. Ainsi, les protéines du surfactant (SP)-A et SP-D, que le PII sécrète

physiologiquement, ont des propriétés immunorégulatrices. De plus, sous l'effet de stimuli appropriés, le PII produit des protéines du complément, des prostaglandines et diverses cytokines (Crestani *et al.*, 1995; Maitre *et al.*, 1996).

Des études *in vitro* ont montré que les macrophages alvéolaires pouvaient moduler l'activité des PII. Il a en particulier été rapporté que les monokines IL-1 $\beta$  et TNF, dérivées des macrophages alvéolaires, induisaient la production d'IL-8, de MCP-1 et d'IL-6 par la lignée de cellules épithéliales pulmonaires de type II «A549» (Standiford 1990, 1991; Crestani 1994). Cependant, les interactions PII - macrophages alvéolaires (et en particulier la modulation de l'activation des macrophages alvéolaires par les PII), ainsi que leur répercussion sur la sécrétion de cytokines impliquées dans les mécanismes de défense pulmonaire ont peu été explorées. C'est pourquoi nous avons développé un modèle de culture *in vitro*, de manière à étudier la coopération entre les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires pour la sécrétion de cytokines. Les macrophages alvéolaires ont été obtenus à partir de lavages bronchoalvéolaires de sujets sains. Les pneumocytes de type II humains étant difficiles à obtenir purs (exempts de tout macrophage), nous avons travaillé avec la lignée de cellules épithéliales pulmonaires de type II «A549».

Dans un premier temps, la coopération PII - macrophages alvéolaires pour la sécrétion d'IL-6 et de TNF a été examinée, du fait de l'importance de ces cytokines dans la réaction inflammatoire et de leur production accrue au niveau alvéolaire dans de nombreuses pathologies pulmonaires, infectieuses et interstitielles. De manière à analyser les mécanismes de cette coopération, la part respective des contact cellulaires et de l'échange de médiateurs solubles a été déterminée. Nous avons ensuite élargi cette étude à d'autres cytokines, l'IL-8 et le MCP-1, principales chimiokines ayant une activité chimiotactique vis-à-vis des neutrophiles et des monocytes, respectivement.

## ***Matériel et Méthodes.***

### ***Sujets inclus dans l'étude.***

Dans cette étude ont été inclus 18 sujets sains, ayant pour moyenne d'âge  $43 \pm 3$  ans. Le nombre de femmes et d'hommes était identique. Parmi ces sujets, 13 étaient des fumeurs.

### ***Lavages bronchoalvéolaires et macrophages alvéolaires humains.***

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est effectué comme décrit précédemment. Les cellules sont récupérées par centrifugation du liquide de lavage. Tout échantillon contenant moins de 85% de MA ou dont la vitalité est inférieure à 80 % est exclu du protocole.

### ***Culture de la lignée de cellules épithéliales de type II A549.***

\* *Lignée A549.* La lignée de cellules épithéliales de type II A549 provient d'un carcinome pulmonaire humain et nous a été procurée par l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Nous avons utilisé cette lignée car la purification des pneumocytes de type II (PII) nécessite des biopsies pulmonaires de taille importante et les préparations sont difficilement exemptes de macrophages alvéolaires. Les cellules A549 sont cultivées en milieu Dulbeco supplémenté en SVF (10 %), glutamine (2 mM) et  $\beta$ 2-mercaptoéthanol ( $5 \times 10^{-5}$  M) . Pour les expériences, les cellules A549 sont cultivées dans des plaques 12 puits en RPMI 5% jusqu'à confluence ( $7 \times 10^5$  cellules / puits).

\* *Tapis de cellules A549 fixées.* Les tapis cellulaires sont rincés trois fois en RPMI 1640, fixés 20 mn par 1% de paraformaldéhyde (PFA) à température ambiante et rincées à nouveau trois fois par du RPMI 5%. Les tapis de cellules A549 fixées (A549 fixées) sont conservés dans du RPMI 5%, à 37°C, en atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. De façon à permettre le relargage passif des médiateurs intracytoplasmiques préformés, les A549-fixées sont laissés au repos au moins 4 h, avant utilisation.

\* *Milieu conditionné par les A549.* Les tapis cellulaires de A549 à confluence sont rincés en RPMI 5 % puis incubés 18 h dans 0,7 ml de RPMI 5 %. Le surnageant de culture (milieu conditionné, MC) est alors filtré à travers un filtre de porosité 0,22 µm (Millipore, Molsheim, France) et conservé à -20° C jusqu'à son utilisation. Afin de séparer les médiateurs sécrétés par les A549 selon leur poids moléculaires, des aliquotes de ce MC sont filtrés à travers des membranes présentant la capacité de retenir les molécules de poids moléculaire supérieur à une limite définie par le fabricant (30 et 100 kDa). Pour chaque filtre, deux fractions de MC sont obtenues: celle contenant les molécules de poids moléculaire supérieur à la limite de rétention, et celle contenant les molécules de poids moléculaire inférieur. Du RPMI 5 % est ajouté à chacune de ces fractions de façon à ce que leur volume final soit identique au volume initial de l'aliquote. Les fractions de MC ainsi préparées sont stérilisées par filtration à travers un filtre de porosité 0,22 µm.

#### ***Cocultures A549-MA et monocultures.***

Les cellules du LBA ( $10^6$  cellules / ml) sont cultivées en RPMI 5 %, dans différentes conditions:

- (1) seules (MA),
- (2) sur un tapis de A549 à confluence (A+MA),
- (3) sur des A549 fixées (F+MA),
- (4) en présence de différentes concentrations (50, 10, 2 ou 1 %) de MC (MA+MC),
- (5) dans un insert comportant une membrane en polyester (porosité 0,4 µm, diamètre 12 mm; Costar) les séparant d'un tapis de A549 à confluence (A549//MA),
- (6) en présence de fractions de MC.

Après une incubation de 18 h, les surnageants de culture sont centrifugés (10 mn à 500 g) de façon à éliminer les éventuelles cellules, aliquotés et congelés jusqu'au dosage des cytokines.

## ***Etude des molécules, exprimées par les A549, induisant l'activation des MA.***

\* *Evaluation du rôle de l'ICAM-1.* Pour apprécier l'influence des interactions des MA avec la molécule d'adhérence ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1) exprimée à la surface des A549, deux types de culture sont réalisés. D'une part, les tapis de A549 à confluence sont pré-incubés 1 h à 37° C avec un anticorps monoclonal anti-ICAM-1 bloquant (clone LB 2, Becton Dickinson, Belgique), aux concentrations de 5 et 10 µg / ml, avant l'ajout des MA. D'autre part, les A549 sont stimulés 18 h par 200 U / ml de TNF (Genzyme, Cambridge, MA), de façon à induire une sur-expression d'ICAM-1 (objectivée par ELISA; Vanhée *et al.*, 1996), avant leur fixation par le PFA et l'addition des MA.

\* *Evaluation du rôle de la matrice extracellulaire.* Pour évaluer l'implication des protéines de la matrice extracellulaire, les MA sont incubés 45 mn à 37° C avec 30 µg / ml de collagène de type I ou de type III (Institut Jacques Boy SA, Reins, France), avant d'être déposés sur un tapis de A549 à confluence.

## ***Dosage des cytokines***

\* *Dosage immunoenzymatique de MCP-1.* Le dosage de MCP-1 a été réalisé à l'aide de l'ELISA que nous avons développé, comme décrit précédemment.

\* *Dosage biologique de l'IL-6.* Les taux d'activité biologique en IL-6, contenue dans les échantillons, sont déterminés grâce au test de prolifération de la lignée cellulaire 7TD1 (procurées par le Dr. Van Snick, Institut Ludwig, Bruxelles, Belgique). Les cellules 7TD1 sont cultivées dans une plaque de microtitration, en présence de dilutions successives des échantillons ou d'une concentration connue d'IL-6 recombinant (Boehringer Mannheim, Meylan, France), en duplicata. Après quatre jours d'incubation, la prolifération des cellules est estimée par méthode colorimétrique: une solution de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-

diphéyl-tétrazolium) est ajoutée et, après 4 h d'incubation, les cellules sont lysées par un tampon (composé de 20 % de sodium dodecylsulfate (SDS) et de 40 % de diméthylformamide) permettant la dissolution des cristaux de MTT-Formazan. La densité optique est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (la densité optique à 650 nm est retranchée de façon à diminuer le bruit de fond). Pour chaque échantillon, la dilution correspondant à 50 % du maximum de prolifération est déterminée, et la concentration est calculée par extrapolation à partir de la courbe standard obtenue avec l'IL-6 recombinant. La spécificité de ce dosage a été vérifiée: l'ajout, dans les échantillons, d'un anticorps polyclonal de lapin anti-IL-6 (Genzyme), provoque une inhibition, supérieure à 90 %, de la prolifération des cellules 7TD1.

\* *Dosage biologique du TNF*. Les taux d'activité biologique en TNF, contenu dans les échantillons, sont déterminés grâce au test de cytotoxicité vis-à-vis de la lignée de fibroblastes murins L929. Les cellules L929 sont cultivées 18 h dans une plaque de microtitration, puis de l'actinomycine D est ajoutée à la concentration finale de 1 mg / ml dans du RPMI 1640 contenant 10 % de SVF et 2 mM de Glutamine. Des dilutions successives des échantillons ou d'une concentration connue de TNF recombinant (Genzyme, Boston, MA) sont alors ajoutées en duplicata. Après 24 h, la dilution provoquant la mort de 50 % des cellules est estimée par méthode colorimétrique au MTT, et la concentration correspondante est déterminée à partir de la courbe standard. La spécificité de ce test a été contrôlée: l'ajout d'un anticorps de lapin neutralisant anti-TNF (Genzyme) dans les échantillons résulte en une inhibition de la cytotoxicité supérieure à 90 %.

\* *Dosage immunoenzymatique de TNF et d'IL-8*. Les dosages de TNF et d'IL-8 sont réalisés à l'aide d'ELISA commercialisés (Medgenix, Fleurus, Belgique) permettant de détecter une concentration minimale de respectivement 10 et 5 pg / ml. Tous les dosages sont réalisés en duplicata.

### ***Analyses statistiques.***

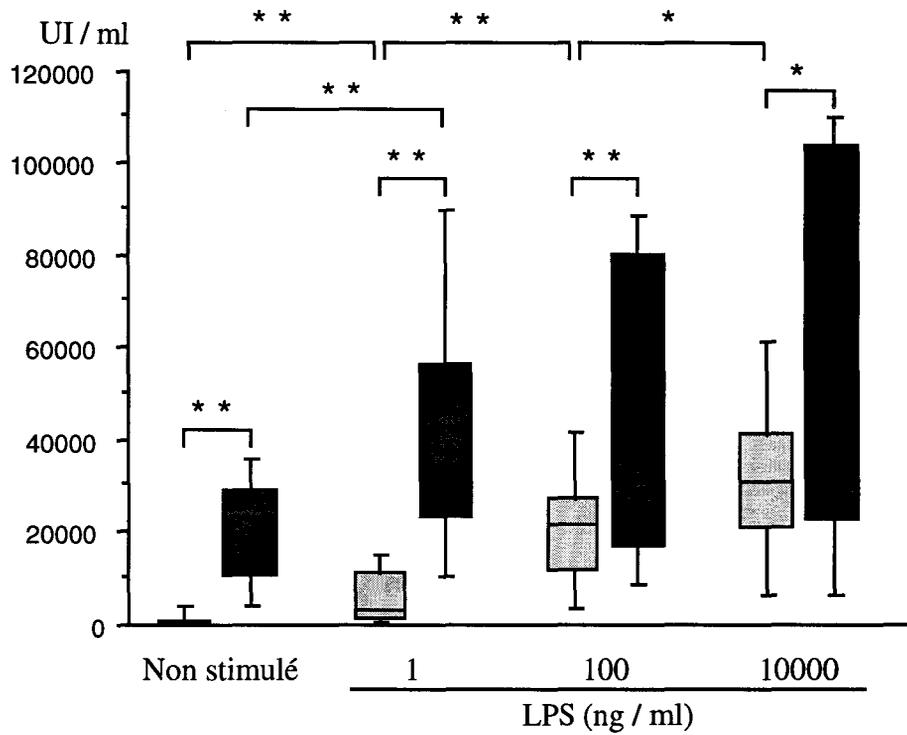
Les analyses statistiques ont été réalisées comme décrit précédemment.

## ***Résultats.***

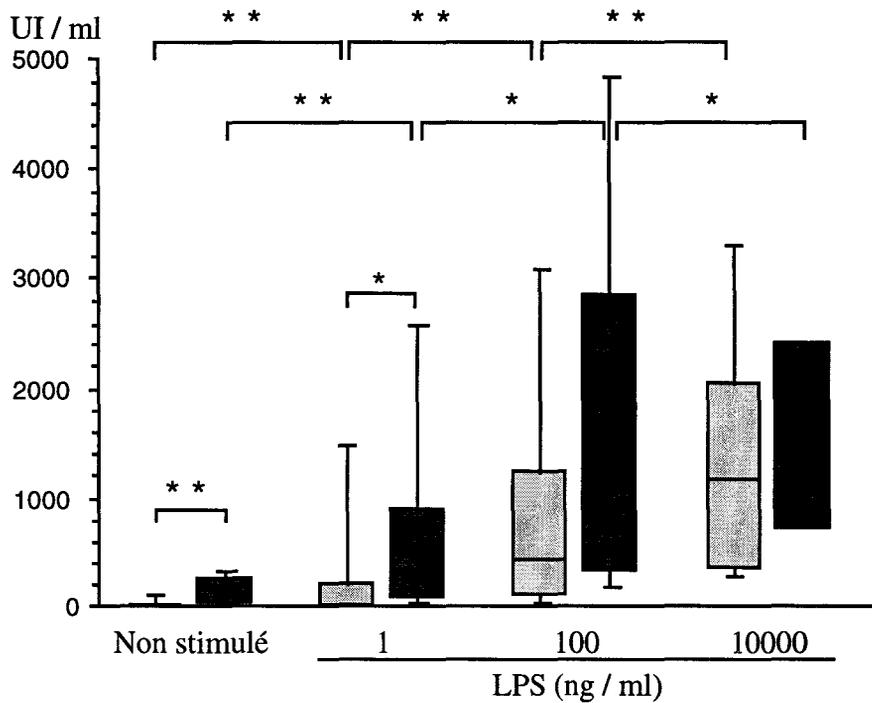
### **Coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires pour la production d'IL-6 et de TNF $\alpha$ .**

**IL-6.** Les monocultures de macrophages alvéolaires (MA) produisent de l'IL-6 en absence de stimulation (Figure 9). Cette sécrétion d'IL-6 par les MA est significativement accrue sous l'effet du LPS, de façon dépendante de la dose ( $p < 0,05$ ). Les monocultures de A549 sécrètent de faibles taux d'IL-6 en absence de et leur sécrétion n'est pas augmentée en présence de LPS (médiane / EIQ = 25 / 8, 18 / 22 et 31 / 4 UI/ml pour 1, 100 et 10000 ng/ml de LPS respectivement). Les surnageants de cocultures A+MA non stimulées contiennent un taux d'IL6 significativement plus élevé que la simple somme des taux observés dans chacune des monocultures non activées ( $p < 0,01$ ). La sécrétion d'IL-6 par les cocultures A+MA est significativement augmentée par le LPS ( $p < 0,02$ ), avec cependant un effet plateau dès la concentration de 100 ng/ml. La production d'IL6 par les cocultures stimulées par le LPS est supérieure à celle des MA activés dans les mêmes conditions, pour chaque concentration de LPS (1, 100 et 10000 ng/ml) ( $p < 0,05$ ).

**TNF $\alpha$ .** Les MA sécrètent de faibles taux de TNF $\alpha$  en absence de stimulation (Figure 10). Cette sécrétion est augmentée par le LPS de façon dépendante de la dose ( $p < 0,005$ ). Les A549 ne sécrètent pas de TNF $\alpha$ , en absence comme en présence de LPS. Les surnageants de cocultures MA/A549 non stimulées contiennent des taux de TNF $\alpha$  significativement supérieurs à ceux des MA non stimulés ( $p < 0,001$ ). La sécrétion de TNF $\alpha$  par les cocultures est augmentée par le LPS de façon dépendante de la dose ( $p < 0,005$ ). Contrairement à ce que l'on observe pour l'IL-6, la sécrétion de TNF $\alpha$  par les cocultures sous l'effet du LPS aux doses de 100 et 10000 ng / ml n'est pas supérieure à celle des MA stimulés par la même dose de LPS.



**Figure 9: Production d'IL-6 par les monocultures MA et les cocultures A+MA.**



**Figure 10: Production de TNFα par les monocultures MA et les cocultures.**

■ : Monoculture MA; ■ : Coculture A+MA. Les monocultures A549 ne sont pas figurées car leurs sécrétions d'IL-6 et de TNFα étaient très faibles et non modulées par le LPS. Ligne horizontale: médiane; boîte: 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentile; barre: 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentile; (n = 8).  
 \* et \*\*: différence significative avec p < 0,05 et p < 0,02 respectivement.

**Part respective des contacts cellulaires et de l'échange de médiateurs solubles dans cette coopération.**

De manière à déterminer l'importance relative des contacts membranaires versus l'échange de médiateurs solubles dans la coopération précédemment mise en évidence, les macrophages alvéolaires ont été cultivés, soit sur un tapis de A549 fixés au PFA (dépourvus, de ce fait, de métabolisme actif) (F+MA), soit dans un insert comportant une membrane les séparant des A549 (empêchant ainsi les contacts entre les deux types cellulaires) (A//MA).

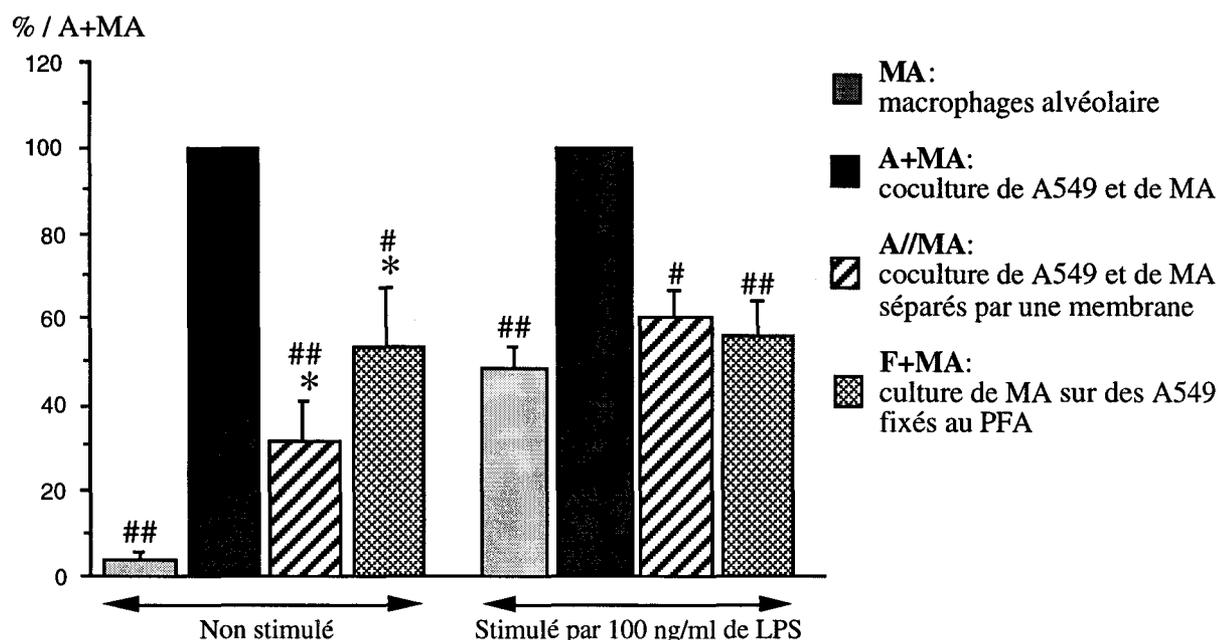
Des expériences contrôles ont permis de vérifier que le fait de cultiver les MA sur des inserts (//MA) ne modifiait pas leur niveau de sécrétion d'IL-6 ni de TNF $\alpha$ , en absence comme en présence de LPS (Tableau ci-dessous).

n = 7	Non stimulé (médiane / EIQ)		Stimulé par du LPS (100 ng/ml)	
	//MA	MA	//MA	MA
IL-6 (UI/ml)	308 / 341	220 / 816	22465 / 20335	22380 / 20495
TNF $\alpha$ (UI/ml)	3,6 / 4,5	5,2 / 5,2	440,0 / 392,5	270,0 / 307,5

D'autre part, les macrophages alvéolaires ont été cultivés sur un insert au dessus d'un tapis de A549 fixées (F//MA), afin de contrôler si ces A549 fixées étaient encore susceptibles de moduler l'activité des macrophages via le relargage de médiateurs solubles. Les F//MA en absence de stimulation, sécrétaient significativement plus d'IL-6 que les MA (x 5 $\pm$ 1 en moyenne), alors que la production de TNF n'était pas modifiée (médiane / EIQ = 18 / 16 contre 13 / 34 UI/ml). L'activation de la sécrétion d'IL-6 était cependant négligeable par rapport à celle observée lorsque les A549 n'étaient pas fixées (A//MA) (x 39 $\pm$ 18) ou lorsque les MA étaient en contact avec les A549 fixées (F+MA) (x 72 $\pm$ 3).

Afin de faciliter leur interprétation, les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion par rapport aux cocultures A+MA dans les figures 11 et 12, où sont aussi rappelés les codes correspondant aux différentes conditions de culture.

**IL-6.** En absence de stimulation, les taux d'IL-6 dans les surnageants de A//MA ou de F+MA sont significativement supérieurs à ceux des MA ( $p < 0,02$ ) (Figure 11). Cependant, dans ces cultures où sont empêchés soit les contacts entre les deux types cellulaires (A//MA), soit la synthèse de métabolites par les A549 (F+MA), la production d'IL-6 est significativement moins importante que dans les cocultures où les deux sont autorisés (A+MA) ( $p < 0,03$ ). Ces résultats démontrent que les contacts cellulaires et l'échange de médiateurs interviennent tous deux dans cet effet coopératif, de façon additive. En présence de 100 ng/ml de LPS, les A//MA et les F+MA produisent des taux d'IL-6 équivalents à ceux sécrétés par les MA stimulés par une dose identique de LPS. Cette production est significativement inférieure à celle des cocultures ( $p < 0,03$ ). l'action simultanée des contacts entre les A549 et les MA et de l'échange de médiateurs solubles a donc un effet coopératif sur la sécrétion d'IL-6, mais individuellement, chacune de ces deux composantes de l'effet coopératif est inefficace pour potentialiser la réponse au LPS.



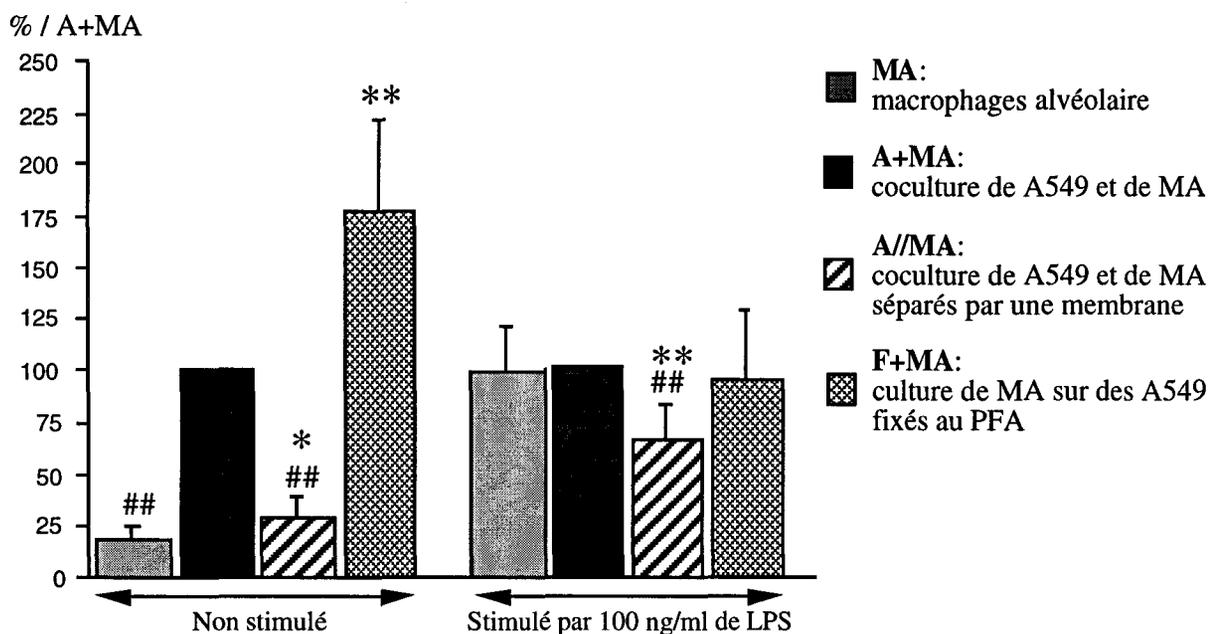
**Figure 11: Part respective des contacts cellulaires et de l'échange de médiateurs solubles, dans la coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires, pour la sécrétion d'IL-6.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM du pourcentage de sécrétion par rapport aux cocultures A+MA ( $n = 7$ ) selon la formule  $\% / A+MA = 100 \times (\text{condition de culture}) / A+MA$ .

\* et \*\*: significativement différent de MA avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,02$  respectivement.

# et ##: significativement différent de A+MA avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,02$  respectivement.

**TNF $\alpha$ .** En absence de stimulation, les surnageants de F+MA et de façon moins importante ceux de A//MA, contiennent des taux de TNF $\alpha$  significativement supérieurs à ceux des MA ( $p < 0,05$ ) (figure 12). Les A//MA non stimulés sécrètent significativement moins de TNF $\alpha$  que les A+MA non stimulés ( $p < 0,01$ ), à l'inverse des F+MA non stimulés qui ont tendance à en produire plus, même si la différence n'est pas statistiquement significative. Lorsque les cultures sont réalisées en présence de 100 ng/ml de LPS, les taux de TNF $\alpha$  mesurés dans les surnageants de cultures MA, A+MA et F+MA sont statistiquement similaires, alors que les surnageants de A//MA contiennent significativement moins de TNF $\alpha$  ( $p < 0,02$ ). Ces résultats suggèrent qu'en plus d'un effet coopératif globalement positif sur la production de TNF, des médiateurs ayant une activité inhibitrice de la production de TNF sont libérés lorsque les deux types cellulaires sont en présence.



**Figure 12: Part respective des contacts cellulaires et de l'échange de médiateurs solubles, dans la coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires, pour la sécrétion de TNF $\alpha$ .**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM du pourcentage de sécrétion par rapport aux cocultures A+MA ( $n = 7$ ) selon la formule  $\% / A+MA = 100 \times (\text{condition de culture}) / A+MA$ .

\* et \*\*: significativement différent de MA avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,02$  respectivement.

# et ##: significativement différent de A+MA avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,02$  respectivement.

## **Interactions cellulaires dépendantes de l'ICAM-1 et sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$ par les cocultures.**

Les macrophages alvéolaires expriment les molécules d'adhérence de la famille des  $\beta$ 2-intégrines (LFA1, Mac1 et p150,95) ligands naturels des ICAM-1 exprimés par les A549. Nous avons cherché à déterminer si l'induction de la sécrétion d'IL-6 ou de TNF $\alpha$  étaient dépendante de l'interaction entre ces molécules d'adhérence.

Pour empêcher les interactions cellulaires médiées par l'ICAM-1, les A549 ont été incubés une heure en présence d'un anticorps anti-ICAM-1 bloquant, avant l'ajout des macrophages. Cette procédure n'entraîne aucune inhibition de la sécrétion d'IL-6 ni de TNF $\alpha$  par les cocultures (n = 3; Résultats non présentés).

Dans des expériences complémentaires (n = 5), les A549 ont été incubés 18h en présence de TNF $\alpha$ , de manière à induire une d'ICAM-1, avant d'être fixés en PFA. Les MA cultivés sur des A549 fixés surexprimant l'ICAM-1 ne secrètent pas significativement plus d'IL-6 (médiane / EIQ = 8344 / 6534 UI/ml) ni de TNF $\alpha$  (médiane / EIQ = 89 / 262 UI/ml) que les MA cultivés sur des A549 fixés non préactivés (médiane / EIQ = 8990 / 10176 UI/ml pour l'IL-6, médiane / EIQ = 92 / 331 UI/ml pour le TNF $\alpha$ ).

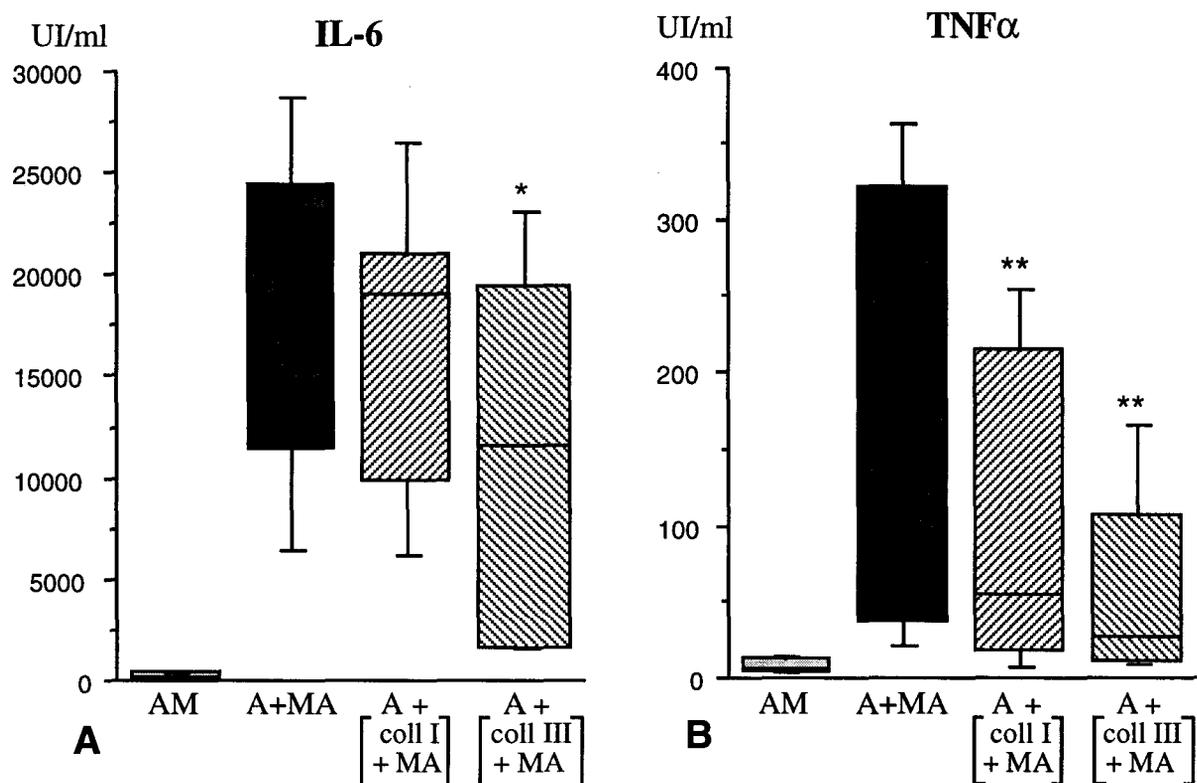
## **Interactions des macrophages alvéolaires avec la matrice extracellulaire et sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$ par les cocultures.**

De manière à bloquer l'interaction des macrophages alvéolaires avec les composants de la matrice extracellulaire synthétisés par les A549, les macrophages alvéolaires ont été incubés 45 minutes avec du collagène de type I ou de type III, avant d'être cultivés sur un tapis cellulaire de A549 à confluence. Des expériences contrôles nous ont permis de vérifier que la sécrétion l'IL-6, de même que celle de TNF $\alpha$ , par les monocultures de macrophages n'étaient pas modifiées par le fait de préincuber les macrophages avec du collagène de type I ou de type II (Tableau ci-dessous).

n = 7	MA	+ collagène de type I	+ collagène de type III
IL-6 (médiane/EIQ)	191 / 300	155 / 196	156 / 214
TNF $\alpha$ (médiane/EIQ)	5,6 / 7,5	4,9 / 2,8	6,0 / 3,5

**IL-6.** La sécrétion d'IL-6 par les est significativement inhibée lorsque les macrophages sont préincubés avec du collagène de type III (inhibition moyenne de  $60 \pm 10 \%$ ) ( $p < 0,05$ ), alors que la préincubation avec du collagène type I n'entraîne aucune différence significative (inhibition moyenne de  $18 \pm 5 \%$ ) (Figure 13A).

**TNF $\alpha$ .** La sécrétion de TNF $\alpha$  par les cocultures A+MA est significativement inhibée lorsque les macrophages alvéolaires sont préincubés avec du collagène de type I (inhibition moyenne de  $53 \pm 17 \%$ ) ou de type III (inhibition moyenne de  $70 \pm 13 \%$ ) ( $p < 0,02$ ) (Figure 13B).

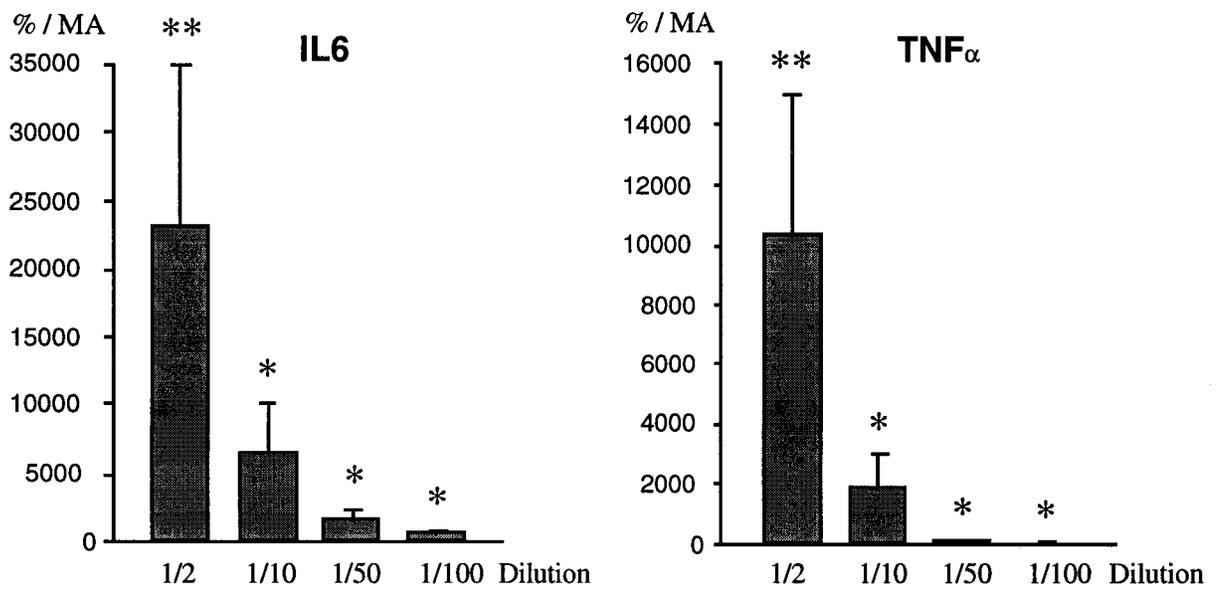


**Figure 13: Inhibition, par du collagène soluble, de la sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les cocultures.**

■ : Monoculture de macrophages alvéolaires (MA); ■ : coculture A+MA; les MA sont incubés avec du collagène de type I (▨) ou de type III (▩) avant d'être cultivés sur un tapis cellulaire de A549 à confluence. . Ligne horizontale: médiane; boîte: 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentile; barre: 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentile; (n = 7). \* et \*\* : significativement différent de A+MA avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,02$  respectivement.

**Effet du milieu conditionné de A549 sur la sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les macrophages alvéolaires.**

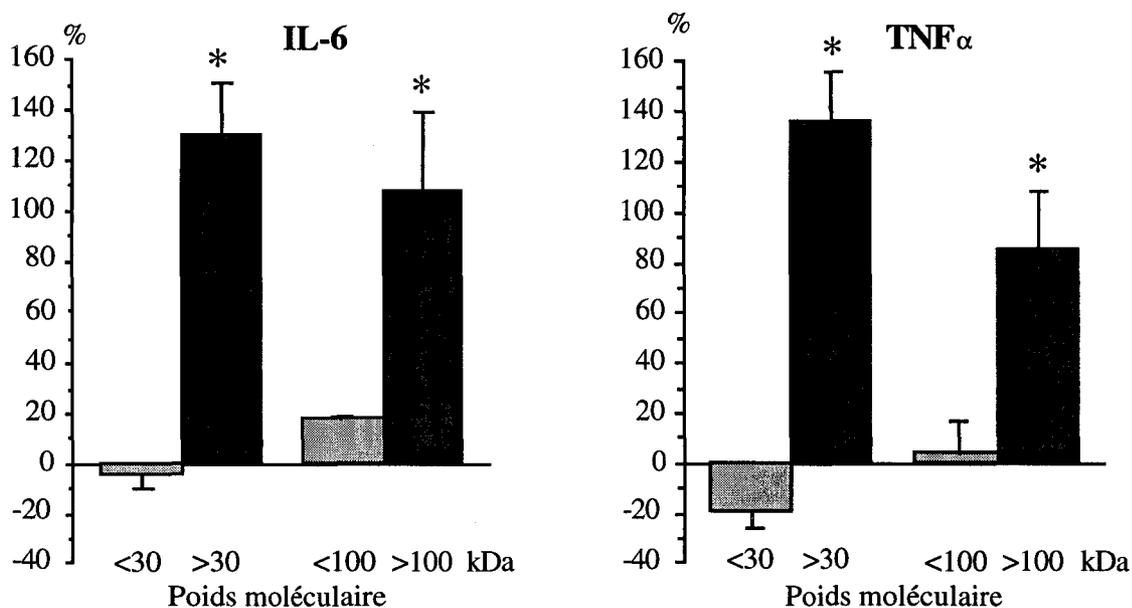
Le milieu conditionné 18 h de A549 (MC) induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les macrophages alvéolaires, de façon dépendante de la dose, et qui reste significative lorsque le CM est dilué au centième (p < 0,05) (Figure 14).



**Figure 14: Effet du milieu conditionné de A549 sur la sécrétion d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les macrophages alvéolaires.**

Les macrophages alvéolaires sont incubés avec des dilutions successives de milieu conditionné de A549 (MA+MC). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 6) du pourcentage d'activation par rapport aux monocultures de macrophages alvéolaires cultivés dans du RPMI 5% (MA) selon la formule:  $\% \text{ MA} = 100 \times ((\text{MA}+\text{MC}) - \text{MA}) / \text{MA}$ . \* et \*\* : significativement différent de MA avec p < 0,05 et p < 0,003 respectivement.

De façon à évaluer le poids moléculaires des médiateurs sécrétés par les A549, responsables de l'activation des macrophages, le milieu conditionné de A549 a été filtré à travers des membranes présentant différentes capacités de rétention (30 et 100 kDa), et les macrophages alvéolaires ont été incubés en présence des fractions moléculaires résultantes. Les fractions correspondant au filtrat, pour les deux filtres utilisés, ne modulent pas la sécrétion d'IL-6 ni de TNF $\alpha$  par les macrophages alvéolaires (Figure 15). Les fractions retenues activent les macrophages alvéolaires de façon analogue au milieu conditionné total, ce qui démontre que les facteurs activateurs solubles sécrétés par les A549 en absence de stimulation ont un poids moléculaire supérieur à 100 kDa ou se présentent sous la forme d'un complexe de poids moléculaire supérieur à cette valeur.

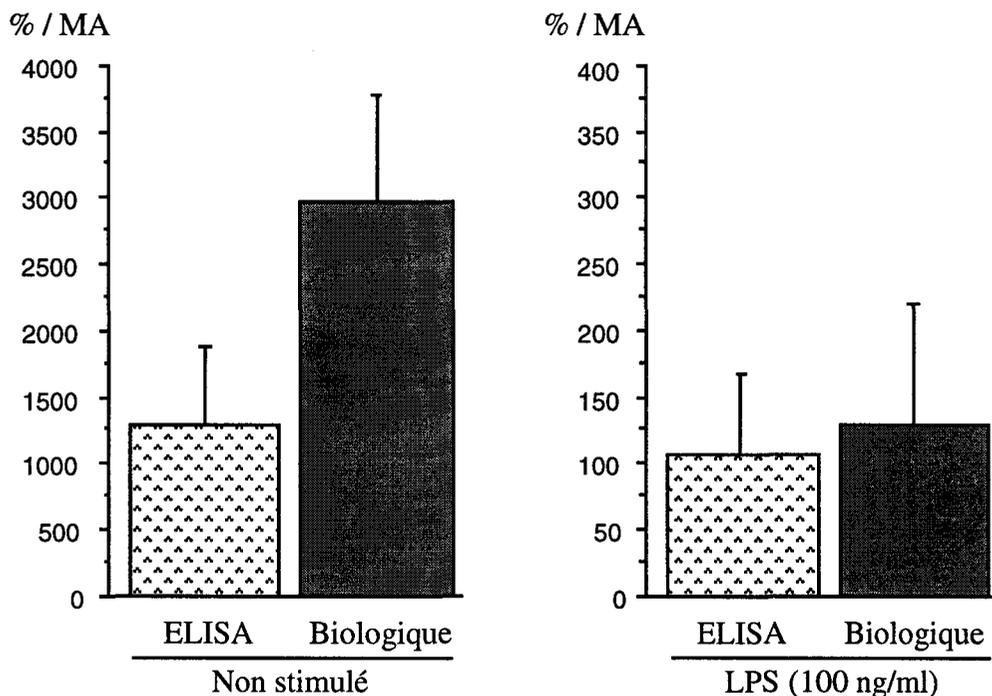


**Figure 15: Poids moléculaire des médiateurs sécrétés par les A549, responsables de l'activation des macrophages alvéolaires.**

Le milieu conditionné 18 h de A549 (MC) est filtré à travers une membrane retenant les molécules de poids moléculaire supérieur à 30 ou 100 kDa. Les macrophages alvéolaires sont incubés 18 h en présence de RPMI 5% (MA), avec le MC total (MA+MC), ou avec chacune des fractions moléculaires (FM) résultantes (MA+FM) (filtrat (■) ou fraction retenue (■)). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 6) du pourcentage d'activation (% act.) induit par la FM par rapport à celle observée avec le MC total selon la formule: % act. =  $100 \times (MA+FM - MA) / (MA+MC - MA)$ . \* : significativement différent de MA avec  $p < 0,05$ .

## Dosage par ELISA du TNF produit par les macrophages alvéolaires et de cocultures.

De façon à conforter les résultats obtenus par dosage biologique pour le TNF, la concentration de TNF dans les surnageants de macrophages alvéolaires et les cocultures a été déterminée par ELISA. En absence de stimulation comme en présence de 100 ng/ml de LPS, l'effet coopératif de la coculture sur la sécrétion de TNF est du même ordre lorsque l'on évalue la concentration protéique ou l'activité biologique (Figure 16).



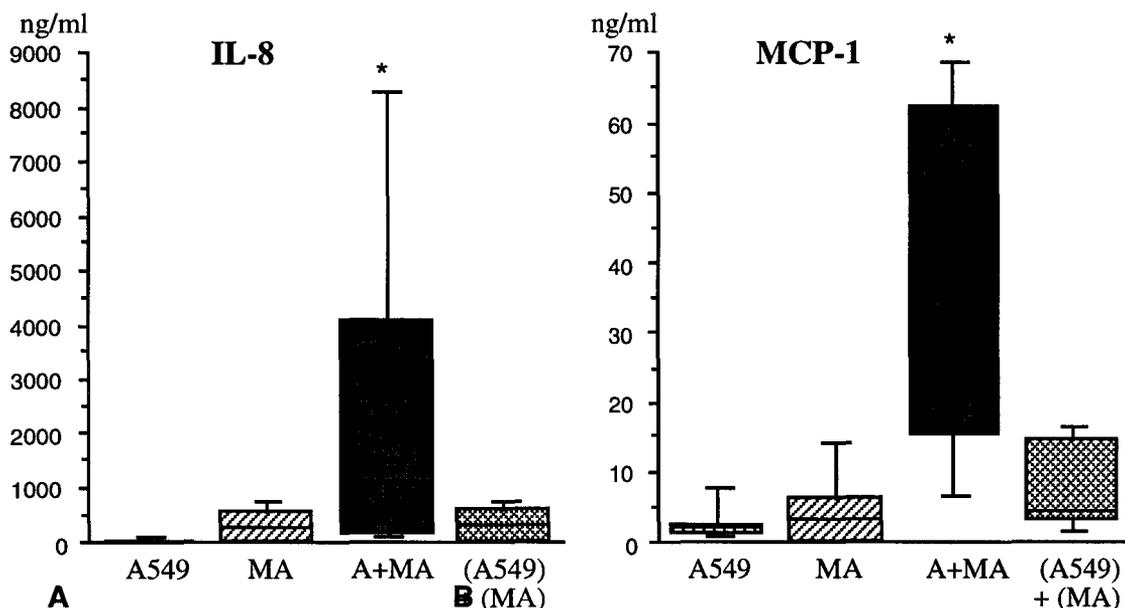
**Figure 16: Activité biologique et concentration de TNF détectée par ELISA dans les surnageants de cocultures par rapport à ceux de macrophages alvéolaires.**

Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM (n = 4) du pourcentage d'activation (% / MA) observé dans les cocultures (A+MA) par rapport aux cultures de macrophages alvéolaires (MA), d'après la formule  $\% / MA = 100 \times ((A+MA) - MA) / MA$ .

## Coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires pour la sécrétion d'IL-8 et de MCP-1.

**IL-8.** Les monocultures de A549 produisent peu d'IL-8 en absence de stimulation (médiane / EIQ = 26 / 20 ng/ml) comparativement aux macrophages alvéolaires non activés (médiane / EIQ = 260 / 538 ng/ml) (Figure 17A). Les surnageants de cocultures A+MA non stimulés contiennent un taux d'IL-8 significativement plus élevé que la simple somme observée dans chacune des monocultures non activées (médiane / EIQ = 1082 / 3912 ng/ml) ( $p < 0,05$ ).

**MCP-1.** Les monocultures de A549, de même que les macrophages alvéolaires, sécrètent des taux équivalents de MCP-1 en absence de stimulation (médiane / EIQ = 2 / 1 ng/ml pour les A549 et 3 / 5 ng/ml pour les MA) (Figure 17B). Les cocultures A+MA non stimulés produisent des taux de MCP-1 significativement supérieurs ceux de monocultures non activées (médiane / EIQ = 34 / 47 ng/ml) ( $p < 0,05$ ).



**Figure 17: Production d'IL-8 et de MCP-1 par les monocultures MA et les cocultures A+MA.**

A549 : monoculture de A549; MA : culture de macrophages alvéolaires; A+MA : coculture. (A549)+(MA) : somme des taux mesurés dans chacune des monocultures. Ligne horizontale: médiane; boîte: 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentile; barre: 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentile; (n = 8).

\* : significativement différent de (A549)+(MA) avec  $p < 0,05$ .

## ***Discussion.***

### ***1, Mécanismes de la coopérations entre les A549 et les macrophages alvéolaires.***

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le fait de cocultiver des MA et des A549 conduisait, en absence de toute activation exogène, à une sécrétion de cytokines (IL-6, TNF, IL-8 et MCP-1) singulièrement supérieure à la somme des taux observés dans chacune des monocultures non activées. Cet effet coopératif accroît, de plus, la réponse à l'activation par de faibles doses de LPS, en terme de production de cytokines. L'utilisation d'un système de culture où étaient empêchés soit les contacts entre les deux types cellulaires, soit la sécrétion de médiateurs par les A549 a permis de révéler que:

- cette coopération dépendaient à la fois de l'échange de médiateurs solubles et de l'interaction physique entre les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires,
- les mécanismes de cette coopération étaient différents pour l'IL-6 et le TNF.

La sécrétion d'IL-6 par les cocultures est toujours supérieure à celle des cultures de macrophages alvéolaires, que ces cultures soit stimulées ou non pas du LPS. En absence de stimulus exogène, l'échange de médiateurs solubles ainsi que le contact des macrophages avec le tapis de A549 induisent, chacun, une augmentation de la sécrétion qui est cependant inférieure à celle observée dans les cocultures. En présence de LPS, la sécrétion d'IL-6 n'est pas augmentée lorsque seul les contacts cellulaires ou l'échange de médiateurs sont autorisés, alors qu'elle l'est lorsque les deux sont simultanément permis. Ainsi, l'échange de médiateurs solubles et les contacts cellulaires sont chacun suffisants, en absence de stimulus exogène, pour induire une augmentation de la sécrétion d'IL-6, mais la concomitance des deux est nécessaire pour aboutir à une coopération maximale entre les cellules pulmonaires et les macrophages alvéolaires, en absence comme en présence de LPS.

Dans le cas du TNF, l'effet coopératif entre les A549 et les macrophages alvéolaires n'apparaît que lorsque les cellules sont incubées avec une dose de LPS inférieure à 100 ng/ml. L'échange de médiateurs solubles ou le contact des macrophages avec un tapis de A549 fixés sont tous deux capables d'induire un accroissement de la production de TNF en absence de stimulation. Cependant, alors que cette surproduction est fortement inférieure à celle des cocultures dans le premier cas, le contact des macrophages alvéolaires avec les A549 fixés entraîne une sécrétion de TNF qui a tendance à être supérieure à celle observée dans les cocultures. En présence de 100 ng/ml de LPS, ni la culture des macrophages sur un tapis de A549 fixés, ni le fait de cocultiver les deux types cellulaires, ne présente d'effet potentialisateur sur la sécrétion de TNF. Au contraire, l'échange de médiateurs solubles entre les A549 et les macrophages alvéolaires, en l'absence de contact, inhibe la production de TNF. La régulation de la production de TNF par les cocultures apparaît donc plus complexe que celle de l'IL-6.

L'ensemble des résultats indique que la coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires est dépendante du contact entre ces deux types cellulaires, nous avons donc recherché quelles molécules pouvaient être impliquées dans les interactions responsables de cette activation. Ni la préincubation des A549 avec de l'anticorps anti-ICAM-1, ni la surexpression de l'ICAM-1 par ces cellules ne modifie la sécrétion de l'IL-6 ou du TNF par les cocultures. Ces expériences suggèrent que les interactions entre pneumocytes et macrophages alvéolaires qui aboutissent à la surproduction d'IL-6 et de TNF ne sont pas dépendantes de l'expression d'ICAM-1 par les pneumocytes. Par contre, la préincubation des macrophages avec du collagène soluble induit une diminution de la sécrétion d'IL-6, et de façon plus importante de TNF, par les cocultures. Ce résultats indiquent que la surexpression de ces cytokines par les cocultures est en partie due à une activation des macrophages alvéolaires au contact de la matrice extracellulaire synthétisée par les A549. Les macrophages alvéolaires expriment spontanément certaines  $\beta$ 1-intégrines à leur surface (VLA-2, VLA-3 et VLA-5) (Kang et al., 1995), molécules d'adhésion impliquées dans les interactions cellules - matrice extracellulaire. Il a été montré que l'engagement des  $\beta$ 1-intégrines induisait une augmentation de la sécrétion de cytokines de l'inflammation (IL-1 $\beta$  et TNF) par les monocytes (Yurocho et al.,

1992, Fan et al., 1995). Dans le cas du TNF, il a de plus été démontré que cette activation était dépendante de l'agrégation des  $\beta 1$ -intégrines (Fan et al., 1995). Nous avons nous même observé que l'incubation des macrophages alvéolaires avec des anticorps dirigés contre la chaîne  $\beta$  des  $\beta 1$ -intégrines entraînait une surproduction de l'IL-6 et de TNF par ces cellules (résultats non montrés). Il est donc probable que l'effet coopératif entre les A549 et les macrophages alvéolaires soit la conséquence du contact des macrophages alvéolaires avec la matrice extracellulaire médié par les  $\beta 1$ -intégrines. Le collagène soluble, en occupant les récepteurs sans provoquer leur agrégation, n'induit aucune activation tout en entrant en compétition avec la matrice extracellulaire réticulée. Il a également été rapporté que le LPS induisait une diminution de l'expression par les macrophages alvéolaires du VLA-5 et, plus tardivement, du VLA-2 et du VLA-3. Cette observation pourrait fournir une explication cohérente au fait que l'effet coopératif est moindre en présence de LPS qu'en son absence, en particulier pour le TNF. On peut en effet penser que le LPS induisant une diminution de l'expression des  $\beta 1$ -intégrines, les contacts médiés par ceux-ci ne sont plus suffisants pour induire une surexpression de cytokines par les macrophages. Mais il est aussi possible que l'activation induite par le LPS et celle induite par les contacts n'aient pas d'effet additif.

Afin de mieux appréhender les mécanismes de cette coopération, nous avons étudié l'effet du milieu conditionné de A549 sur les macrophages alvéolaires, et observé qu'il avait un effet activateur très important à la fois sur la sécrétion d'IL-6 et de TNF. Ces résultats suggèrent que l'effet coopératif des cocultures est du, au moins partiellement, à un effet activateur des A549 sur les macrophages alvéolaires. Elles indiquent en effet que les A549 sécrètent, en absence de stimulation, des médiateurs qui stimulent la sécrétion d'IL-6 et de TNF par les macrophages alvéolaires. Vu l'importance de leur poids moléculaire apparent (supérieur à 100 kDa), il est peu probable que ces facteurs soient des cytokines. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'hypothèse que ces médiateurs soient multimérisés ou complexés à d'autres molécules, et soient, de ce fait, retenues par le filtre.

Dans le cas de l'IL-6, indépendamment de l'activation des macrophages par des médiateurs sécrétés par le A549, l'effet coopératif des cocultures reflète aussi probablement la production d'IL-6 par les A549, sous l'effet de médiateurs relargués par le macrophage. Il a en effet été rapporté que le milieu conditionné de macrophages alvéolaires activés induisait la sécrétion d'IL-6 par les A549, de par la présence d'IL-1 $\beta$  et de TNF (Crestani et al., 1994).

En ce qui concerne le TNF, l'effet activateur de la coculture est moindre que celui du milieu conditionné de A549, et la différence est particulièrement nette lorsque l'on compare les résultats à ceux des cocultures séparées par un filtre. D'autre part, en présence de LPS, la sécrétion de TNF évaluée par dosage de l'activité biologique est inférieure dans le système de cocultures séparées par un filtre à celle des macrophages alvéolaires. Nous avons écarté l'hypothèse d'une sécrétion de récepteur soluble du TNF (TNF-Rs), qui masquerait l'effet biologique de TNF, par le dosage de celui-ci à l'aide d'un ELISA: Le rapport entre les taux de TNF mesurés dans les surnageants des macrophages alvéolaires et ceux des cocultures est du même ordre pour les deux méthodes de dosage, alors qu'il devrait être inférieur dans le cas du dosage biologique si les A549 sécrétaient du TNF-Rs en présence de macrophages alvéolaires. Ces résultats démontrent donc que lorsqu'elles sont en présence de macrophages alvéolaires, et donc potentiellement activés par ceux-ci, les A549 libèrent un (ou des) facteur(s) inhibiteur(s) de la sécrétion de TNF par les macrophages. Soit ce médiateur est labile, et son activité dans le milieu conditionné est devenue nulle suite à la congélation-conservation-décongélation, soit il n'est sécrété que lorsque les A549 sont activés par des médiateurs relargués par le macrophage, ce qui constituerait une boucle de rétrocontrôle négatif de l'activation des macrophages alvéolaires par les A549.

L'ensemble de cette analyse montre que la régulation de la sécrétion de TNF dans les cocultures est plus complexe que pour l'IL-6. Le surnageant de A549 non activés de même que le contact des macrophages alvéolaires avec la matrice extracellulaire synthétisée par les A549 a un effet positif sur la sécrétion de TNF par les macrophages, qui se traduit par une augmentation de la production par les cocultures non activées. Mais le fait de cocultiver les

macrophages alvéolaires et les A549 a aussi un effet inhibiteur sur la sécrétion de TNF par les macrophages. Celui-ci est masqué dans le cas des cocultures non activés, car la somme des effets activateurs prévaut sur l'inhibiteur. Par contre, lorsque le système est activé par du LPS, les deux influences (positives et négatives) s'équilibrent. Notre étude met en évidence une diminution de l'activation par les contacts, mais nous pouvons aussi supposer une augmentation de l'effet inhibiteur.

Ainsi, ces résultats posent la question de savoir (1) dans quelle mesure les pneumocytes de types II stimulent ou inhibent la sécrétion de cytokines par les macrophages, notamment en ce qui concerne le TNF, et (2) dans quelle proportion ces pneumocytes participent directement à la production d'IL-6 et de TNF lorsqu'ils sont en présence de macrophages. De manière à répondre à ces interrogations, nous avons purifié les ARN des A549 et des macrophages alvéolaires après 3 et 6 heures de cultures dans les système de coculture séparée par un filtre, afin d'analyser par RT-PCR semi-quantitative la présence et la variation du taux d'ARNm codant pour l'IL-6 et le TNF, pour chacun des deux types cellulaires. Nous envisageons d'autre part définir les cellules productrices de ces ARN dans le système de culture où les cellules sont en contact par une hybridation *in situ*, et de conforter cette expérience par une localisation des protéine par immunohistochimie.

D'autre part, comme nous l'avons discuté précédemment, nous ne pouvons pas totalement exclure hypothèse que les médiateurs sécrétés par les A549 qui ont la capacité d'activer les macrophages soient des cytokines. Nous envisageons donc de doser par ELISA différentes cytokines (potentiellement contenues dans les surnageants de A549 et susceptibles d'activer les macrophages, comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-3 le GM-CSF, et l'IFN $\gamma$ ) après filtration de ces surnageants, dans les deux fractions résultantes. Dans le cas où la fraction retenue (la seule capable d'activer les macrophages) contiendrait l'une ou l'autre de ces cytokines, nous évaluerions leur implication dans l'activation du macrophage alvéolaire, en les éliminant du surnageant à l'aide d'une colonne d'affinité.

En conclusion, notre travail met en évidence un l'effet coopératif entre les A549 et les macrophages alvéolaires pour la sécrétion de protéines proinflammatoires, mais aussi pour la production des chimiokines IL-8 et MCP-1, suggérant que cette coopération influe sur la régulation d'autres métabolites. Ce travail démontre que la coopération entre les A549 et les macrophages alvéolaires dépend à la fois de l'échange de médiateurs solubles et du contact entre les deux types cellulaires, et ceci de façon différente pour l'IL-6 et le TNF. Cette étude soulève également de nombreuses questions.

## ***2, Intérêt et limite du modèle, perspectives.***

En mettant en évidence une coopération pour la sécrétion de cytokines proinflammatoires entre une lignée de cellule épithéliale pulmonaire de type II et des macrophages alvéolaires, notre étude conforte le concept selon lequel les pneumocytes de type II participent à la régulation des réponse immunes et inflammatoires. Le pneumocyte de type II pourrait ainsi moduler la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages alvéolaires, en absence de stimulation et lors d'une activation par des endotoxines bactériennes (LPS). Cette observation est d'autant plus importante que *in vivo*, les macrophages alvéolaires et les pneumocytes de type II sont colocalisés au niveau des septa alvéolaires, rendant possible (et probable) une communication effective entre ces deux types cellulaires.

Cependant, ces observation ont été faites à l'aide d'une lignée cellulaire, les A549, dérivées de cellules épithéliales humaines Cette lignée a été utilisée dans plusieurs travaux comme modèle de cellule épithéliale pulmonaire de type II (Rothman et al., 1989 ; Standiford et al., 1990, 1991; Paine et al, 1992; Crestani et al., 1994), elle n'en reste pas moins un modèle d'étude comportant certaines limites. Ces cellules ont notamment perdue le caractère polarisé des pneumocytes de type II, et leur production de protéines du surfactant ne doit pas refléter celle des pneumocytes de type II normaux.

Ainsi, notre étude indique que la matrice extracellulaire synthétisée par les pneumocytes de types II a un effet activateur important sur le macrophage alvéolaire lorsque celui-ci est en contact avec elle. Or, *In vivo*, les pneumocytes de types II présentent une sécrétion basale de composants de la matrice extracellulaire qui s'intègre à la membrane basale et les macrophages ne sont donc pas en contact avec celle-ci. Ce fait n'est pas en contradiction avec nos observations puisque de fait, les macrophages alvéolaires provenant de sujet sains ne sécrètent pas spontanément d'IL-6, de TNF, d'IL-8 ou de MCP-1. Par contre, lorsque l'épithélium est lésé lors d'une agression, la membrane basale est dénudée et les contacts macrophages alvéolaires - matrice extracellulaire sont augmentés. Une telle situation conduit effectivement à l'activation du macrophage alvéolaire qui s'accompagne d'une réaction inflammatoire *in vivo*, caractérisée par l'afflux de neutrophiles et de monocytes / macrophages.

Bien que nos résultats soient cohérents avec les observations faites *in vivo*, cet exemple démontre que notre système, s'il permet d'appréhender les mécanismes de modulation de l'activité du macrophage alvéolaire par son environnement alvéolaire, ne reflète pas les conditions du poumon en situation physiologique. La poursuite de ce travail peut donc s'envisager selon deux axes, d'une part, l'amélioration du système de culture existant, d'autre part et dans un second temps, l'utilisation de macrophages alvéolaires et de pneumocytes de types II d'origine animale ou humaine.

(1) Les cellules en lignée présentent l'avantage de constituer un matériel facilement disponible et de manipulation aisée, contrairement aux cultures primaires de pneumocytes humains qui nécessitent une purification difficile, à partir de pièces anatomiques importantes. De plus, les préparations de pneumocytes de type II ne sont jamais totalement dépourvues de macrophages alvéolaires, contrairement au A549, ce qui pose un problème lorsque l'on veut analyser l'effet respectif d'un type cellulaire et de l'autre. Nous envisageons donc l'amélioration du système de coculture existant, en cultivant les A549 sur un support (composant de la matrice extracellulaire) leur permettant de retrouver en partie le caractère polarisé des cellules épithéliales. Un tel système de culture permettra d'analyser les réponses à des cytokines, des

agressions ou des substances pharmacologiques, en évaluant l'effet de la coopération macrophage - pneumocyte ainsi que l'implication des pneumocytes de type II. Le fait que les A549 soient des cellules calibrées donnant des résultats reproductibles permettra de plus d'étudier si les macrophages alvéolaires se comportent de façon identique vis-à-vis de la modulation par les pneumocytes, qu'ils proviennent de sujets sains ou de patients atteints de pathologies pulmonaires.

(2) L'utilisation de macrophages et de pneumocytes d'origine animale présenterait l'avantage d'être un système autologue. D'autre part, en prenant la précaution de les cultiver à forte concentration sur une matrice extracellulaire adéquate, les pneumocytes de type II auraient probablement un métabolisme plus proche de la réalité que les cellules en lignée. Les cellules animales et humaines n'ayant pas toujours les mêmes caractéristiques, tant au niveau des médiateurs sécrétés qu'en ce qui concerne les molécules exprimées à leur surface, il serait intéressant, malgré les difficultés que cela suppose, d'étendre cette étude à l'homme.

*Références bibliographiques.*

## *Conclusion générale.*

Le travail de cette thèse a consisté en l'analyse des mécanismes de recrutement et de régulation de l'activité des macrophages alvéolaires, cellules clés de la réaction inflammatoire, dans un contexte de pathologie interstitielle pulmonaire.

L'étude de la production pulmonaire de chimiokines chez des patients atteints de pneumoconiose a permis de mettre en évidence que:

- les patients pneumoconiotiques présentent une importante production de MCP-1, sans que ce facteur puisse seul rendre compte de l'alvéolite macrophagique associée à cette pathologie interstitielle.

- Les fibroblastes et le pneumocytes de type II, en plus des macrophages alvéolaires, ont probablement un rôle actif dans l'augmentation du taux de MCP-1 pulmonaire observée dans cette pathologie.

- Le rôle des macrophages alvéolaires dans l'établissement de l'alvéolite macrophagique dépend visiblement plus de l'activation paracrine d'autres types cellulaires, potentiellement via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, que d'un autorecruement via la sécrétion de facteurs chimioattractants vis-à-vis des monocytes.

La mise en évidence d'un effet coopératif des macrophages alvéolaires et des pneumocytes de type II pour la sécrétion de cytokines, et l'analyse des mécanismes impliqués, ont permis d'établir que, outre sa capacité à synthétiser des cytokines sous l'influence de facteurs sécrétés par le macrophage alvéolaire, le pneumocyte de type II module l'activité du macrophage. La somme des effets activateurs et inhibiteurs aboutit à l'état physiologique au maintien de l'homéostasie alvéolaire, et favorise en situation pathologique une réponse inflammatoire.

Ainsi, en plus de préciser certains mécanismes impliqués dans le recrutement et la régulation de l'activité du macrophage alvéolaire, l'ensemble de ce travail met en évidence la participation des pneumocytes de types II, classiquement considérés comme des cellules de structure, dans le développement de la réaction inflammatoire: ces cellules interviennent de façon directe dans le recrutement des monocytes, via la sécrétion de facteurs chimiotactiques et ont, d'autre part, la capacité de moduler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages alvéolaires.

Il apparaît donc important de poursuivre l'analyse des mécanismes de coopération entre les pneumocytes de types II et les macrophages alvéolaires. Une telle étude ouvrira de nouvelles perspectives pour comprendre pourquoi des sujets soumis à une même exposition à un agresseur pulmonaire répondent de façon polymorphe, comme cela est le cas pour la pneumoconiose du mineur de charbon.

REPRINTED FROM

---

THE

---

EUROPEAN

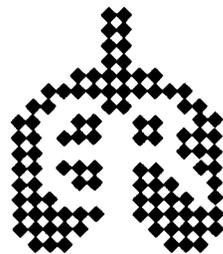
---

RESPIRATORY

---

JOURNAL

---



OFFICIAL JOURNAL OF THE  
EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY

## MCP-1 secretion in lung from nonsmoking patients with coal worker's pneumoconiosis

A. Boitelle\*, P. Gosset\*, M.C. Copin\*\*, D. Vanhee\*, C.H. Marquette+, B. Wallaert\*, B. Gosselin\*\*, A.B. Tonnel\*

*MCP-1 secretion in lung from nonsmoking patients with coal worker's pneumoconiosis. A. Boitelle, P. Gosset, M.C. Copin, D. Vanhee, C.H. Marquette, B. Wallaert, B. Gosselin, A.B. Tonnel. ©ERS Journals Ltd 1997.*

**ABSTRACT:** Exposure to coal dust leads to the development of coal worker's pneumoconiosis (CWP), a disease associated with an accumulation of macrophages in the lower respiratory tract. Mechanisms controlling monocyte recruitment are still poorly understood. Since monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is recognized as a potent chemotactic factor for blood monocytes, we analysed the presence of MCP-1 in the pulmonary compartment of patients with CWP.

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from 16 nonsmoking control subjects and 27 nonsmoking CWP patients (16 with simple pneumoconiosis (SP) and 11 with progressive massive fibrosis (PMF)) was analysed. Alveolar macrophages (AMs) were purified by adherence and BALF was concentrated tenfold by lyophilization. MCP-1 was measured in BALF and in 3 h AM supernatants using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The localization of MCP-1 in lung tissue was determined by immunohistochemistry on tissue sections from three patients with CWP and two control subjects.

MCP-1 levels were significantly higher in concentrated BALF from patients with SP or PMF (median 370 and 555 pg·mL<sup>-1</sup>, respectively) than in those from control subjects (median 11 pg·mL<sup>-1</sup>) ( $p < 0.001$ ). Released MCP-1 in AM supernatants was enhanced in patients with CWP (median 83 pg·mL<sup>-1</sup>) but compared to controls (median 41 pg·mL<sup>-1</sup>) this level did not reach significance. Although significantly increased, AM counts in BALF from patients with CWP did not correlate with MCP-1 levels. MCP-1 levels in BALF correlated with MCP-1 levels in AM supernatants ( $\rho = 0.47$ ;  $p < 0.02$ ). In control lung specimens, MCP-1 was expressed by a few AMs, type II pneumocytes and perivascular smooth muscle cells. CWP sections were characterized by an increased number of AMs and mainly by the presence of fibroblasts (in the myogenic area of fibrotic lesions) and hyperplastic type II pneumocytes, which were strongly immunostained for MCP-1.

Our data demonstrate that: 1) patients with coal worker's pneumoconiosis have a marked pulmonary overproduction of monocyte chemoattractant protein-1; and 2) in addition to alveolar macrophages, fibroblasts (probably myofibroblasts) and hyperplastic type II pneumocytes may also be responsible for this increased level of monocyte chemoattractant protein-1 in coal worker's pneumoconiosis.

*Eur Respir J 1997; 10: 557-562.*

Exposure to coal dust leads to the development of coal worker's pneumoconiosis (CWP) [1, 2]. CWP is defined by the presence of coal dust-induced lesions distributed throughout the lung, and is usually divided into two categories according to abnormalities on chest radiography: simple pneumoconiosis (SP), in which opacities are smaller than 1 cm, and progressive massive fibrosis (PMF), in which opacities are more extensive [3]. CWP is characterized by pulmonary fibrosis, emphysema and macrophage infiltrates [4, 5]. Although the pathophysiological mechanisms of CWP remain incompletely understood, current concepts suggest that alveolar macrophages (AMs) play a central role in the pathophysiology of this disease: AMs from pneumoconiotic patients are known to spontaneously produce several mediators, including cytokines, such as tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), potentially implicated in the induction of the inflamma-

tory response and in the development of a subsequent extensive fibrosis [6]. AMs are predominantly derived from differentiated peripheral blood monocytes and, to a limited extent, from the local replication of these cells [7, 8].

Recruitment of blood monocytes occurs in response to a gradient of chemotactic factor(s) produced by the resident cells. However, the mediators involved in this process have not been evaluated in CWP. One of the most potent chemotactic factors for blood monocytes is the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a 76 amino acid peptide that belongs to the chemokine family (which includes the factor regulated upon activation in normal T-cells, expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein (MIP), interleukin (IL)-8 and others) [9]. MCP-1 is produced by a variety of immune and inflammatory cells, upon activation by

\*INSERM U416, Institut Pasteur, Lille, France. +Clinique des maladies respiratoires, Hôpital A. Calmette, Lille, France. \*\*Service d'anatomie et de cytologie pathologique, CHRU, Lille, France.

Correspondence: A.B. Tonnel  
INSERM U416  
Institut Pasteur  
1 rue du Pr Calmette - BP 245  
59 019 Lille cedex  
France

Keywords: Alveolar macrophages  
chemokine  
coal worker's pneumoconiosis  
lung  
monocyte chemoattractant protein-1

Received: May 8 1996  
Accepted after revision November 8 1996

This work was supported by the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, the Caisse Autonome Nationale de la Sécurité dans les mines and the Ministère de la Santé, PHRC 94.

mediators such as TNF- $\alpha$  [10–15]. MCP-1 can also activate monocytes, increasing their cytostatic activity against several tumour cell lines, the generation of respiratory burst, the release of lysosomal enzymes and proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6), and the expression of monocyte adhesion molecules (CD11c/CD18 and CD11b/CD18), which play a key role in migration [16, 17]. Taken together, these observations suggest that MCP-1 may be involved in the development of the chronic macrophagic inflammation observed in CWP.

In the present study, we analysed the presence of MCP-1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from patients with SP or PMF and from control subjects. We also determined MCP-1 concentration in 3 h AM supernatants and the localization of this chemokine in lung tissue by immunohistochemistry (IHC).

### Material and methods

#### Patients

Twenty seven nonsmoking coal workers from the "Bassin Houillier du Nord et du Pas-de-Calais" (France) were studied. The diagnosis of CWP and the separation into two groups (SP and PMF) were made in accordance with criteria described previously [3]. Sixteen patients had SP, their ages ranged 55–73 yrs (mean $\pm$ SEM 63 $\pm$ 2 yrs) and their mean duration of underground dust exposure was 25.9 $\pm$ 2.4 yrs (range 15–32 yrs). Eleven patients had PMF, their ages ranged 60–80 years (mean 69 $\pm$ 2 yrs) and their mean duration of underground dust exposure was 26.0 $\pm$ 1.7 yrs (range 20–34 yrs). Healthy subjects (n=16), never exposed to coal mine dust, were selected as controls; their ages ranged 24–72 yrs (mean 52 $\pm$ 4 yrs). All subjects were lifelong nonsmokers or they had quit smoking for more than 5 yrs. None of the patients or controls were treated with corticosteroids at the time of bronchoalveolar lavage (BAL).

#### Bronchoalveolar lavage

Oral informed consent was obtained for BAL from both pneumoconiotic patients and healthy subjects. The study protocol was approved by the hospital's Ethics Committee. BAL was performed, as described previously, by instillation of saline buffer into the bronchoalveolar tree under fiberoptic bronchoscopy [4]. Cells were obtained by centrifugation, as described below. BALF was concentrated tenfold by lyophilization. Cellular characteristics of the BAL are summarized in table 1.

#### Cell isolation and alveolar macrophage culture

Macrophages were purified from BAL: the lavage fluid was filtered through sterile surgical gauze and centrifug-

ed at 400 $\times$ g for 10 min at 4°C. After two washings, the pellet was resuspended at a cell concentration of 1.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup> in RPMI 1640, containing 5% heat inactivated foetal calf serum (FCS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) and 200  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> of sodic mezlocilline (Bayer, Germany). Cell viability was assessed by trypan blue exclusion and was at least 95% in all cases. Differential cell counts were performed using eosin/methylene blue (RAL, Paris, France) stained cyto-centrifuge preparations of recovered cells. Cells were allowed to adhere to plastic Petri dishes (2 mL in 35 mm diameter well; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) for 2 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The nonadherent cells were removed by three washings with RPMI medium. Adherent cells contained more than 95% AMs. AM supernatants were collected after 3 h culture, filtered through 0.22  $\mu$ m Millipore filters (Molsheim, France), and frozen in aliquots at -20°C until quantification of MCP-1.

#### Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for MCP-1

A sandwich ELISA for MCP-1 was developed with two polyclonal antibodies. This ELISA could quantitatively detect MCP-1 ranging 50–10,000 pg·mL<sup>-1</sup>. To assess specificity, several structurally related cytokines, which may be contained in the biological sources, were tested for cross-reactivity. None of these control cytokines (IL- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), MIP-1 $\alpha$ , RANTES and TNF- $\alpha$ ) was detected. This ELISA showed the advantage of using commercial antibodies and of needing very small volumes of biological sample to obtain reproducible measures. Microtitre plates (Nunc, Denmark) were coated with 50  $\mu$ L·well<sup>-1</sup> of rabbit polyclonal anti-MCP-1 antibody (Genzyme, Cambridge, MA, USA) (4  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2) overnight at 4°C. The plates were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS)/0.5% Tween (wash-buffer) and nonspecific binding sites were blocked with PBS, 3% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 37°C. Plates were rinsed once with wash-buffer. Duplicates either of MCP-1 standards (Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ) or various dilutions of test samples (50  $\mu$ L·well<sup>-1</sup>) were then added.

After 90 min at 37°C, plates were washed four times and 50  $\mu$ L·well<sup>-1</sup> of 3  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> goat polyclonal anti-MCP-1 antibody (RD System, Abingdon, UK) in PBS with 1% BSA was added. After 90 min at 37°C, plates were washed four times and each well received 50  $\mu$ L of rabbit biotinylated anti-goat immunoglobulin G (IgG) antibody (Sigma, St Louis, MO, USA; 1/500 in PBS/1% BSA) for 90 min at 37°C. After four washings, 50  $\mu$ L·well<sup>-1</sup> of avidin-peroxidase (CLB, Amsterdam; 1/10,000 in Tris buffered saline (TBS)/Tween) was added for 30

Table 1. – Characteristics of bronchoalveolar lavage from the study population

Group	n	BAL volume mL	Total cell count $\times 10^4$ cells·mL <sup>-1</sup>	Alveolar macrophages		Lymphocytes		Neutrophils	
				%	$\times 10^4$ cells·mL <sup>-1</sup>	%	$\times 10^4$ cells·mL <sup>-1</sup>	%	$\times 10^4$ cells·mL <sup>-1</sup>
Controls	16	127.9 $\pm$ 7.4	11.9 $\pm$ 1.4	83 $\pm$ 2	9.9 $\pm$ 1.3	14 $\pm$ 2	1.7 $\pm$ 0.3	3 $\pm$ 1	0.3 $\pm$ 0.1
SP	16	105.4 $\pm$ 11.0	24.7 $\pm$ 6.4*	86 $\pm$ 2	21.8 $\pm$ 5.8*	11 $\pm$ 2	1.8 $\pm$ 0.3	2 $\pm$ 1	0.9 $\pm$ 0.7
PMF	11	114.1 $\pm$ 11.0	33.8 $\pm$ 6.1***	87 $\pm$ 2	30.2 $\pm$ 5.9***	9 $\pm$ 2	2.6 $\pm$ 0.4	2 $\pm$ 1	1.0 $\pm$ 0.3

All values are expressed as mean $\pm$ SEM. SP: simple pneumoconiosis; PMF: progressive massive fibrosis; BAL: bronchoalveolar lavage. \*: p<0.05; \*\*\*: p<0.001, significantly different from controls.

min at room temperature. The plates were washed five times with PBS/Tween and twice in TBS before the addition of 50  $\mu\text{L}\cdot\text{well}^{-1}$  of substrate solution. The reaction was stopped by addition of 50  $\mu\text{L}\cdot\text{well}^{-1}$  HCl 4 N and the absorbance was read at 492 nm on an ELISA reader. MCP-1 concentrations were calculated by interpolation from the standard curve. A value of 1  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  was given to samples below the sensitivity threshold. A compilation of 13 separate standard curves is presented in figure 1.

#### Immunohistochemistry on lung tissue

Lung tissue fragments were obtained by lobectomy performed either on patients presenting a lung cancer but never exposed to coal mine dust ( $n=2$ ), or on pneumoconiotic patients with lung cancer ( $n=3$ ; with SP and with PMF). Lung specimens were taken in the subpleural region, as far as possible from the neoplastic area, fixed with PBS/4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for serial sectioning (6–7  $\mu\text{m}$ ). Rehydrated lung sections were permeabilized by digestion for 10 min at 37°C with type II trypsin (Sigma), washed in PBS and saturated for 1 h with PBS/4% human serum (HS). Sections were then overlaid over night at 4°C with antihuman MCP-1 polyclonal antibody (Genzyme, 6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) previously immunoadsorbed with sepharose-coated with normal human serum. Dilutions were performed in PBS/4% HS. After several washes with PBS, sections marked with the antihuman MCP-1 polyclonal antibody were incubated for 90 min with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma; 1/300), washed, incubated for 30 min with extravidin-alkaline phosphatase (Sigma; 1/200) and washed again. Colour development was obtained with a fast-red solution (Sigma). Gill's haematoxylin was used as counterstain. Immunostaining was completely inhibited by the addition of anti-MCP-1 antibody preincubated with recombinant human MCP-1, which demonstrated antibody specificity.

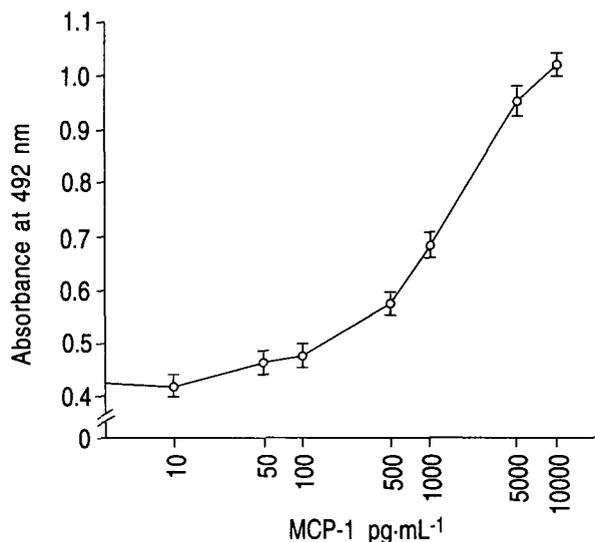


Fig. 1. — Standard curve of the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for MCP-1. Each point represents the mean of 13 separate determinations carried out in duplicate and vertical bars indicate standard error. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1.

#### Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile range (IQR). Differences between groups were tested for statistical significance by using the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney U-test. A p-value less than 0.05 was considered significant. Correlation coefficient was computed by using the Spearman test.

## Results

#### Cellular analysis of BAL

The volume of lavage fluid recovered was similar for pneumoconiotic patients and control subjects. The total cell count in BAL from patients with SP or PMF was significantly higher than that from control subjects (table 1). The percentage of AMs, lymphocytes and neutrophils did not differ between pneumoconiotic patients and control subjects. The total number of lymphocytes and neutrophils per millilitre of recovered fluid was similar in BAL from patients with CWP and from control subjects. In contrast, the total number of AMs per millilitre of recovered fluid was significantly increased in BAL from patients with SP or PMF as compared with control subjects. There was no significant difference between SP and PMF.

#### MCP-1 in lavage fluids

MCP-1 was undetectable or at a very low level in concentrated BALF from control subjects (median 11  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; IQR 50  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=14$ ). The MCP-1 level was significantly higher in concentrated BALF from patients with CWP (405  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; IQR 1,030  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=20$ ) than in those from controls ( $p<0.001$ ) (fig. 2). The difference between SP (370  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; IQR 610  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=10$ ) and PMF (555  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; IQR 1,060  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=10$ ) was not significant. There was no correlation between the number of AM and the MCP-1 level in BALF.

#### MCP-1 in AM supernatants

There was a trend towards an increased level of MCP-1 in AM supernatants from patients with CWP (83  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; IQR 192  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=24$ ) compared with control subjects (41  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; IQR 81  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=11$ ), but the difference was not significant (fig. 3). Indeed, there was a large overlap of MCP-1 levels in AM supernatants from SP (85  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; range 1–1,350  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=15$ ) and PMF (78  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; range 1–4,150  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $n=9$ ). The normal range was defined as the 95th percentile value of the control data (91  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The MCP-1 level in AM supernatants was higher than the upper limit in 7 out of 15 cases of SP (47%) and in 4 out of 9 cases of PMF (44%). The number of AMs in BAL did not correlate with the MCP-1 level in AM supernatants. However, there was a correlation between MCP-1 levels in AM supernatants and MCP-1 levels in BALF ( $\rho=0.47$ ;  $p<0.02$ ).

#### Immunohistochemical localization of MCP-1 protein in lung tissue section

Lung sections from patients with CWP showed aggregations of coal dust-laden macrophages beneath the

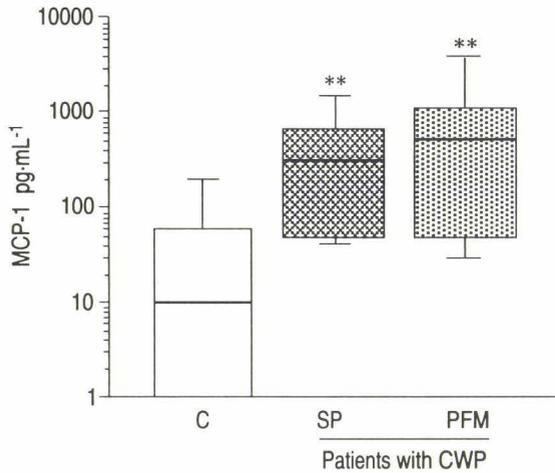


Fig. 2. – Profile of MCP-1 secretion in BALF concentrated, tenfold, from control subjects (C; n=14) and from patients with simple pneumoconiosis (SP; n=10) or progressive massive fibrosis (PMF; n=9). Data are presented as box plots. Horizontal lines represent the median, squares the 25th and 75th percentiles, and bars the 10th and 90th percentiles. \*\*:  $p < 0.01$ , significantly different from the control. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; CWP: coal worker's pneumoconiosis.

pleural surface, in alveolar spaces and in fibrous tissues, presenting as spider-shaped micronodules. Polarized light microscopy revealed birefringent particles scattered throughout the nodules. Myofibroblastic cells in the micronodules were not associated with vessels or bronchi. The lung sections from patients with CWP were also characterized by the hyperplasia of many type II pneumocytes.

In tissue sections from control subjects, a few AMs were positive for MCP-1 expression by immunostaining with anti-MCP-1 antibodies (fig. 4A). In addition, in some areas, some type II pneumocytes and perivascular smooth muscle cells were positive for MCP-1.

In lung sections from patients with CWP, perivascular smooth muscle cells were found to express MCP-1

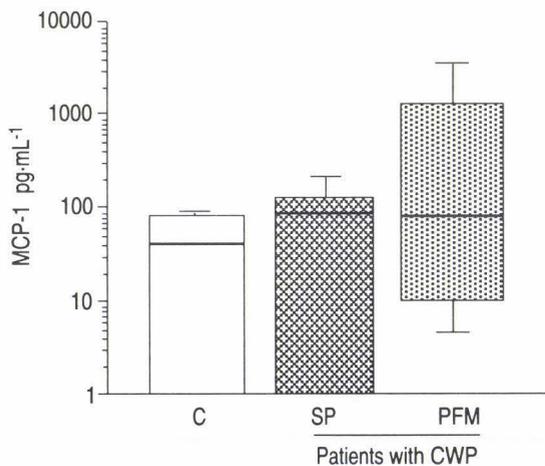


Fig. 3. – Profile of MCP-1 secretion by alveolar macrophages (AMs) from control subjects (C; n=11), and from patients with simple pneumoconiosis (SP; n=15) or progressive massive fibrosis (PMF; n=9). Supernatants were obtained from a 3 h culture of  $1.5 \times 10^6$  AMs·mL<sup>-1</sup>. Data are presented as box plots. Horizontal lines represent the median, squares the 25th and 75th percentiles, and bars the 10th and 90th percentiles. No statistical difference was observed between any groups for this parameter. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; CWP: coal worker's pneumoconiosis.

in the same way as in control sections. The proportion of AMs positive for MCP-1 was similar for the two controls and two patients with CWP (range 21–28% for the four subjects), and higher for one CWP patient (47%). Interstitial macrophages were positive. Fibroblasts in the fibrotic areas were marked; their aspect as well as their location suggested that they were myofibroblasts. The hyperplastic type II pneumocytes strongly expressed MCP-1 (fig. 4B and C). Immunostaining with the control nonimmune serum showed negative results.

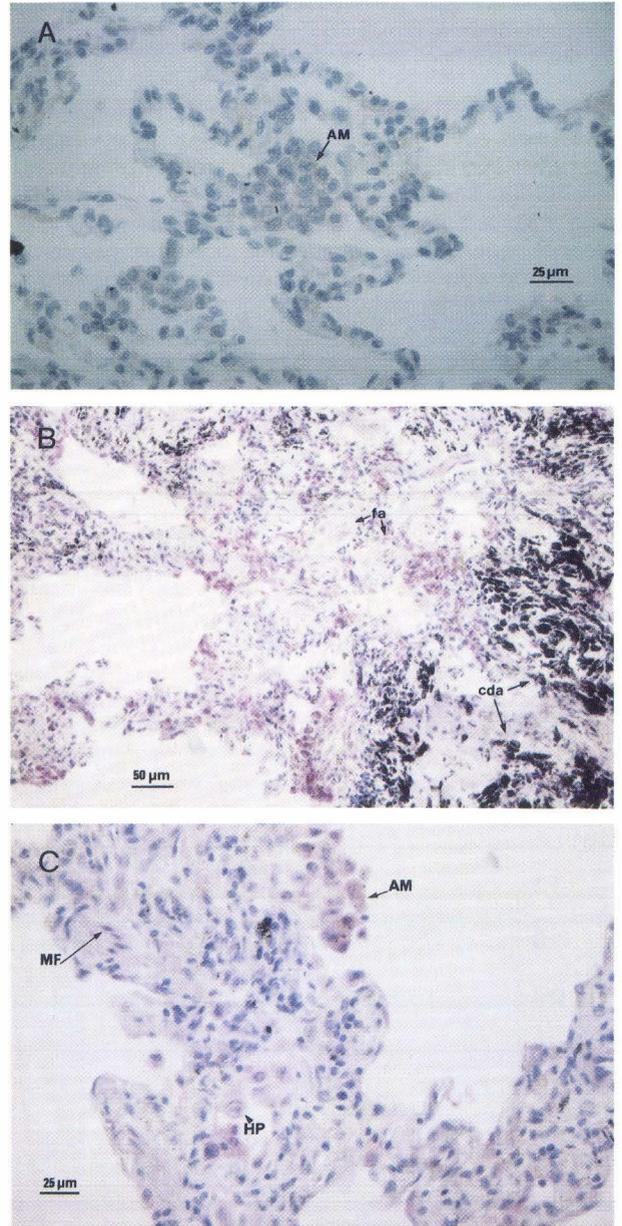


Fig. 4. – Immunohistochemical localization of MCP-1 protein in lung tissue secretions. A) Representative lung section from control subject immunostained with antibody directed against MCP-1. Alveolar macrophages (AMs) were positive for MCP-1 expression. B) Representative section of lung tissue from a patient with CWP, immunostained with antibody directed against MCP-1. Coal dust accumulation (cda) and fibrotic areas (fa) are visible. C) Representative section of lung tissue from patient with CWP, immunostained with antibody directed against MCP-1. AMs, hyperplastic type II pneumocytes (HPs) and myofibroblasts (MFs) were positive for MCP-1 expression. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; CWP: coal worker's pneumoconiosis.

## Discussion

CWP is associated with a dramatic increase in the number of macrophages in alveolar spaces, due mainly to an influx of peripheral blood monocyte influx. This macrophagic accumulation results from a local production of monocyte chemoattractants, but the producing cells and signals that attract the inflammatory cells into the pulmonary tissue are still poorly documented. In this study, it was shown that the MCP-1 level was significantly elevated in BALF from patients with CWP as compared with controls. The MCP-1 concentration in BALF was closely correlated with the MCP-1 level in AM supernatant. Immunohistochemistry of lung sections indicated that other cell types, mainly perivascular smooth muscle cells, type II pneumocytes and fibroblasts also expressed MCP-1.

The MCP-1 levels in BALF from controls were heterogeneous (range 1–330 pg·mL<sup>-1</sup>), suggesting that MCP-1 may be induced by everyday exposure to ambient dust and pollution, or that an interindividual difference in MCP-1 gene regulation could exist. However, the MCP-1 level was significantly higher in BALF from patients with CWP than from controls, suggesting that this chemokine might be implicated in the development and maintenance of the macrophage alveolitis associated with CWP. However, since no correlation was found between the number of AMs in BALF and the MCP-1 level, it is likely that MCP-1 may not be the only factor responsible for the recruitment of AMs towards alveolar spaces. Similarly, it has been demonstrated that in BALF from patients with sarcoidosis or idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), both MCP-1 level and monocyte chemotactic activity were increased, but without correlation between these two parameters [18]. Many other chemokines (MCP-2, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , RANTES) and recently IL-13, have been shown to have a chemotactic activity for monocytes [19, 20]. An *in vivo* study in the rat has demonstrated that tracheal instillation of mineral dust (SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>) increased MIP-1 $\alpha$  in the whole lung, indicating that this cytokine may be involved, at least in part, in the recruitment of inflammatory cells after particle deposition [21]. Although a recent study indicated that MCP-1 was the most powerful monocyte chemokine, it is likely that the combined action of these different monocyte chemoattractants might be important in lung inflammatory processes [22]. The lack of correlation between MCP-1 level and the number of AMs in BAL might also indicate that monocyte recruitment depends not only on the gradient of chemokines, but also implicates several successive steps, including adherence, rolling and extravasation, regulated by pro-inflammatory cytokines.

We recently demonstrated that expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), an adhesion molecule that plays a major role in monocyte migration, was higher in lungs from pneumoconiotic patients than in lungs from control subjects [23]. Due to its capacity to increase, *in vitro*, monocyte expression of CD11b/CD18 and CD11c/CD18 (ligands for ICAM-1) [17], MCP-1 might be involved in the adherence step during monocyte recruitment. MCP-1 also induces calcium flux, respiratory burst activity, and IL-1 and IL-6 expression in monocytes [16, 17]. Therefore MCP-1 is likely

to be a mediator for the priming of mononuclear phagocytes. Indeed, it has been shown that blood monocytes from miners, as well as peritoneal macrophages from rat exposed to aerosols of silica, *i.e.* both cell types removed from direct contact with particles, were primed for increased TNF- $\alpha$  secretion upon provocation with a second stimulus [24, 25].

Another aim of the present study was to determine which cell types express MCP-1. *In vitro* MCP-1 has been shown to be produced by several human cells types, including endothelial cells [11], fibroblasts [12], pulmonary type II pneumocytes [13], mesothelial cells [14] and blood mononuclear leucocytes [15]. We found that, in control pulmonary tissue sections, only a few AMs, type II pneumocytes and perivascular smooth muscle cells were positive for MCP-1 by IHC. In lung sections from patients with CWP, fibroblasts present in fibrotic areas were positive for MCP-1 as well as hyperplastic type II pneumocytes, which were not detected in control tissue sections. This evolution of the pattern of MCP-1 expression in CWP is different from the pattern found in IPF, where macrophages, vascular endothelial and smooth muscle cells and type II pneumocytes have been shown to express MCP-1 [26]. In CWP, we observed also a significant immunolocalization of MCP-1 in fibroblasts.

The number of MCP-1 positively immunostained AMs in CWP sections was increased, but the proportion of AMs positive for MCP-1 expression seemed to be similar in control and CWP sections. In the same way, spontaneous MCP-1 secretion by AMs was evaluated by measuring MCP-1 in AM supernatants after 3 h of culture, and no significant difference was found between patients with CWP and controls. These results are different from those concerning TNF- $\alpha$  and IL-6, since AMs from patients with CWP produced significantly greater amounts of these proinflammatory cytokines than did control AMs [27]. Thus, our results suggest that MCP-1 secretion by AMs depends on other mechanisms than those controlling the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6. In addition, the role of AMs in the development of the inflammatory process in CWP is more likely to be linked to the secretion of proinflammatory cytokines than of monocyte chemoattractant factors.

It was beyond the scope of the present study to determine the mechanisms responsible for MCP-1 overexpression in CWP. This overexpression is potentially the result of a direct activation by coal dust. It might also be the consequence of cell-to-cell communication, in part *via* soluble mediators, since it has been demonstrated that fibroblasts and type II pneumocytes secrete MCP-1 in the presence of activated AM conditioned media [12, 13]. Moreover, we may hypothesize a cell network activation consecutive to interaction *via* specific receptors. Indeed, it has been shown, firstly, that an increased monocyte-derived MIP-1 $\alpha$  production was induced by ICAM-1 interaction with activated endothelial cells, and, secondly that IL-8 and MCP-1 production was increased during monocyte-endothelial cell interactions, in part due to matrix protein-binding mechanisms [28, 29].

In conclusion, our data underline the fact that patients with coal worker's pneumoconiosis have a marked pulmonary overproduction of monocyte chemoattractant

protein-1. However, the lack of correlation between the number of alveolar macrophages and the level of monocyte chemoattractant protein-1 is consistent with the fact that recruitment of alveolar macrophages in coal worker's pneumoconiosis is presumably controlled by more than one mediator, including other chemokines and pro-inflammatory cytokines.

### References

- Davis JMG, Chapman J, Collins P, Douglas AN, Fernie J, Lamb D, Ruckey VA. Variations in the histological patterns of the lesions of coal worker's pneumoconiosis in Britain and their relationship to lung dust content. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 118-124.
- Voisin C, Wallaert B. Empoussiéage professionnel et bronchopneumopathie chronique obstructive, de l'approche étiopathogénique au problème de réparation en milieu minier. *Bull Acad Natl Med* 1992; 176: 243-252.
- Soutar CA, Collins HPR. Classification of progressive massive fibrosis of coal miners by type of radiologic appearance. *Br J Ind Med* 1984; 41: 334-339.
- Voisin C, Gosselin B, Ramon P, Wallaert B, Aerts C, Lenoir L. Le lavage bronchoalvéolaire dans la pneumoconiose des mineurs de charbon: aspects cytologiques. *Rev Fr Mal Respir* 1983; 11: 455-466.
- Rom WN, Bitterman PB, Rennerd SI, Cantin A, Crystal RG. 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* 1987; 136: 1429-1434.
- Vanhee D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal worker's pneumoconiosis. *Eur Respir J* 1995; 8: 834-842.
- Blusse Van Oud Alblas A, Mattie H, Van Furth R. A quantitative evaluation of pulmonary macrophage kinetics. *Cell Tissue Kinet* 1983; 16: 211-219.
- Adamson IYR, Bowden DH. Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages. *Lab Invest* 1980; 42: 518-531.
- Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1: structure and function. *Cytokine* 1992; 4: 131-152.
- Martin CA, Dorf ME. Differential regulation of interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1, and JE/MCP-1 cytokine expression in macrophage cell lines. *Cell Immunol* 1991; 135: 245-258.
- Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990; 136: 1229-1233.
- Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, et al. Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)* 1992; 263: L536-L545.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Streiter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 9912-9918.
- Antony VB, Hott JW, Kunkel SL, Godbey SW, Burdick MD, Streiter RM. Pleural mesothelial cell expression of C-C (monocyte chemotactic peptide) and C-X-C (interleukin-8) chemokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 581-588.
- Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* 1989; 142: 1956-1962.
- Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 1991; 78: 1112-1116.
- Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148: 2423-2428.
- Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 655-659.
- Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 617-648.
- Magazin M, Guillemot J-C, Vita N, Ferrera P. Interleukin-13 is a monocyte chemoattractant. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5: 397-400.
- Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, et al. Macrophage inflammatory proteins-1 and -2: expression by rat epithelial cells and rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 311-318.
- Ugucioni M, Dapuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Action of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur J Immunol* 1995; 25(1): 64-68.
- Vanhée D, Molet S, Tillie-Leblond I, et al. Expression of leukocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 541-548.
- Borm PJA, Palmen N, Engelen JJM, Buurman WA. Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) from blood monocytes of miners with coal worker's pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1589-1594.
- Mohr C, Gemsa D, Graebner C, et al. Systemic macrophage stimulation in rats with silicosis: enhanced release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from alveolar and peritoneal macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 395-402.
- Antoniades HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5371-5375.
- Vanhee D, Gosset P, Marquette CH, et al. Secretion and mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the lung of pneumoconiosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 298-306.
- Lukacs NW, Streiter RM, Elnor VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL. Intercellular adhesion molecule-1 mediates expression of monocyte-derived MIP-1 during monocyte-endothelial cell interaction. *Blood* 1994; 83: 1174-1178.
- Lukacs NW, Streiter RM, Elnor VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood* 1995; 86: 2767-2773.

## *Conclusion générale.*

## Références bibliographiques.

- Acton J.D and Myrvik Q.N. 1966. Production of interferon by alveolar macrophages. *J. Bacteriol.* 91: 2300-2304.
- 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-
- Albelda S.M et Buck C.A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-2880.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson J.D. Adhérence cellulaire, jonctions cellulaires et matrice extracellulaire. Dans "*Biologie moléculaire de la cellule*". Deuxième édition. Traduit par Minkowski M. Ed. Médecine-Sciences Flammarion. p791-836.
- Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Vandamme J, Jilek P, Sozzani S and Mantovani A. 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, 2 and 3. *Eur. J. Immunol.* 24: 3233-3236.
- Ambrus C.M, Ambrus J.L, Johnson G.C, Packman E.W, Chernick W.S, Back A.N and Harrison J.W.E. 1954. Role of the lung in the regulation of the white blood levels. *Am. J. Physiol.* 178: 34-
- Ansfield M.J, Benson B.J. 1980. Identification of the immunosuppressive components of canine pulmonary surface active material. *J. Immunol.* 125: 1093-1098.
- Antoniade H.N, Bravo M.A, Avila R.E, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M and Selman M. 1990. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86: 1055-1064.
- Antoniade H.N, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin R.L, Valente A.J and Graves D.T. 1992. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5371-5375.
- Antony VB, Hott JW, Kunkel SL, Godbey SW, Burdick MD, Streiter RM. 1995. Pleural mesothelial cell expression of C-C (monocyte chemotactic peptide) and C-X-C (interleukin 8) chemokines. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12: 581-588.
- Armstrong L.R, Christensen P.J, McDonald R.A, Luchansky M.M, Paine R. and Teows G.B. 1992. The immunostimulatory capacity of pulmonary dendritic cells is enhanced in the presence of alveolar epithelial cells. *clin. Res.* 40: 744A.
- Arnold R, Humbert B, Werchau H, Gallati H and König W. 1994. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunol.* 82: 126-133.
- Arsalane K, Gosset P, Vanhée D, Voisin C, Tonnel A.B and Wallaert B. 1995. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13: 60-68.
- Berman J.S, Beer D.J, Theodore A.C, Kornfeld H, Bernado J and Center D.M. 1990. Lymphocyte recruitment to the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 238-257.

- Bevilacqua M.P, Pober J.S, Majeau G.R, Cotran R.S and Gimbrone M.A. 1984. Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* 76: 2003-2011.
- Bevilacqua M.P, Pober J.S, Mendrick D.L, Cotran R.S and Gimbrone M.A. 1987. Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9238-
- Bice D.E. 1993. Pulmonary response to antigen. *Chest.* 103: 95S-98S.
- Bienkowski R.S and Gotkin M.G. 1995. Control of collagen deposition in mammalian lung. *P.S.E.B.M.* 209: 118-140.
- Bilyck N and Holt P.G. 1993. Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 177: 1773-1777.
- Bilyck N and Holt P.G. 1995. Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations. *Immunol.* 86: 231-237.
- Bilyk N, Upham J.W and Holt P.G. 1996. pulmonary macrophages. In «*Immunopathology of lung disease*» R.L Kradin and B.W.S Robinson. Ed Butterworth, Heiman. USA. 57-72.
- Bissonett E and Rola-Pleszczynski M. 1989. Pulmonary inflammation and fibrosis in a murine model of asbestosis and silicosis. possible role of tumor necrosis factor. *Inflammation.* 13: 329-339.
- Bitterman P.B, Saltzman L.E, Adelberg S, Ferrans V.J and Crystal R.G. 1984. Alveolar replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J. Clin. Invest.* 74: 460-469.
- Blau H, Riklis S, Kravtsov V, and Kalina M. 1994. Secretion of cytokines by rat alveolar epithelial cells: possible regulatory role for SP-A. *Am. J. Physiol.* 266: L148-L155.
- Blusse Van Oud Alblas A and Vanfurth R. 1979. The origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 149:1504-1518.
- Borish L and Rosenwasser L.J. 1996. Update on cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 719-734.
- Borm PJA, Palmen N, Engelen JJM and Buurman WA. 1988. Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor - alpha (TNF) from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 1589-1594.
- Bowden D.H. 1978. The alveolar macrophage. *Curr. Top. Pathol.* 55: 1-9.
- Burkhardt A and Cottier. 1989. Cellular events in alveolitis and the evolution of pulmonary fibrosis. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* 58: 1-13.
- Burkhardt A. 1989. Pulmonary perspective. Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 513-524.
- Butcher E.C. 1990. Cellular and molecular mechanisms that direct leucocyte traffic. *Am. J. Pathol.* 136: 3-
- Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A. 1994. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149: 655-659.
- Carré P et Léophonte P. 1993. Cytokines et fibroses pulmonaires. *Rev. Mal. Resp.* 10: 193-207.
- Carswell EA, Old LJ, Green S, Fiore N and Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3666-3670.

- Cavaillon J.M. 1996. Interleukine-6. Dans «*Cytokines*»183-199.
- Chaucey J.B, Simon R.H and Perters-Golden M. 1988. Rat alveolar macrophages synthesize leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid from alveolar epithelial-cell-derived arachidonic acid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 928-935.
- Chelen C.J, Fang Y, Freeman G.J, Secrist H, Marshall J.D, Hwang P.T, Frankel L.R, DeKruyff R.H and Umetsu D.T. 1995. Human alveolar macrophages present antigen ineffectively due to defective expression of B7 costimulatory cell surface molecules. *J. Clin. Invest.* 95: 1415-1421.
- Christensen P.J, Armstrong L.R, Fak J.J, Chen G.H, McDonald R.A, Toews G.B and Paine R. III. 1995. Regulation of rat pulmonary dendritic cell immunostimulatory activity by alveolar epithelial cell-derived granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 426-433.
- Christensen P.J, Kim S, Simon R.H, Toews G.B and Paine R. III. 1993. Differentiation-related expression of ICAM-1 by rat alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8: 9-15.
- Cochrane A.L. 1973. Relation between radiographic categories of pneumoconiosis and expectation of life. *Br. Med. J.* 2: 532-534.
- Crapo J.D, Barry B.E, Foscue H.A and Selburne J. 1980. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to kethal and adaptatives doses of oxygen. *Am Rev. Respir. Dis.* 122: 123-143.
- Crapo J.D, Barry B.E, Gehr P, Bachofen M and Weibel E.R. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal lung. *Am Rev. Respir. Dis.* 125: 740-745.
- Crestani B and Aubier M. 1995. Fonctions des pneumocytes II. *La Revue du Praticien (Paris)* 45: 2124-2126.
- Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M and Aubier M. 1994. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 *in vitro* and *in vivo*. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J. Clin. Invest.* 94: 731-740.
- Crestani B, Rolland C, Petiet A, Colas-linhart N and Aubier M. 1993. Cell surface carbohydrates modulate neutrophil adherence to alveolar type II cells *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 264 (*Lung celll. Mol. Physiol.* 8): L391-L400.
- Cunningham A.C, Milne D.S, Wilkes J. Dark J.H, Tetley T.D and Kirby J.A. 1994. Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparaison with immunocytochemical findings. *J. Cell. Sci.* 107: 443-449.
- Davies R and Erdogdu G. 1989. Secretion of fibronectin by mineral dust-derived alveolar macrophages and activated peritoneal macrophages. *Exp. Lung Res.* 15: 285-297.
- Dehoux M.S, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret M.C, Crestani B, Deschenes M, Trouillet J.L and Aubier M. 1994. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* 150: 710-716.
- Delneste Y. 1993. Contribution à l'étude du rôle de la cellule endothéliale dans l'asthme. Thèse de doctorat de l'université des sciences et techniques de Lille Flandres-Artois.

- Driscoll K.E, Lindenschmidt R.C, Maurer J.K, Higgins J.M, Ridder G. 1990. Pulmonary response to silica or titanium-dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 2: 381-390.
- Dubois C.M, Bissonette E and Rola-Pleszczynski M. 1989. Asbestos fibers and silica particules stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. Autoregulatory role of leucotriene B<sub>4</sub>. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 1257-1264.
- Dudding L, Haskill S, Clark B.D, Auron P.E, Sporn S and Huang S.E. Cytomegalovirus infection stimulates expression of monocyte-associated mediator genes. *J. Immunol.* 143: 3343-3351.
- Dunsmore S.E, Martinez-Williams C, Goodman R.A and Rannels D.E. 1995. Composition of extracellular matrix of type II pulmonary epithelial cells in primary culture. *Am. J. Physiol.* 269 (*Lung Cell. Mol. Physiol.*) 13: L754-L765.
- Dustin M.L, Stauton D.E and Springer T.A. 1988. Supergene families meet the immune system. *Immun. Today.* 9: 213-
- Edelson J.D, Shannon J.N and Mason R.J. 1989. Effects of two extracellular matrices on morphologic and biochemical properties of human type II cells in vitro. *Am. Rev. respir. Dis.* 140: 1388-1404.
- Elsbach P and Weiss J. 1988. Phagocytic cells: Oxygen independent antimicrobial systems. Dans "*Inflammation: Basic principles and clinical correlates*". Ed. Gallin J.I, Goldstein I.M et Snyderman R. Raven Press. New York.
- Ezeowitz R.A and Stahl P.D. 1988. The structure and fonction of vertebrate mannose lectin-like proteins. *J. Cell. Sci.* 9: 121-126.
- Fan S.T, Mackman N, Cui M.Z et Edginton T.S. 1995. Integrin regulation of an inflammatory effector gene. Direct induction of the tissue factor promoter by engagement of  $\beta$ 1 or  $\alpha$ 4 integrin chains. *J. Immunol.* 154: 3266-3274.
- Federspiel S.J, DiMari S.J, Guerry F.M and Haralson M.A. 1990. Extracellular matrix biosynthesis by cultured foetal rat lung epithelial cells. II. Effect of acute exposure to epidermal growth factor and retinoic acid on collagen biosynthesis. *Lab. Invest.* 63 (4): 455-466.
- Feinmark S.J and Cannon P.J. 1986. Endothelial cell leukotriene C<sub>4</sub> synthesis results from intercellular transfert of LTA<sub>4</sub> synthesized by polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 261. 16466-16472.
- Foldes-Filep E, Sirois P, Filep J.G. 1994. Pulmonary surfactant lipids inhibit prostanoid production of guinea pig alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 56: 475-480.
- Freeman B.A, Mason R.J, Williams M.C and Crapo J.D. 1986. Antioxidant enzyme activity in alveolar type II cells after exposure of rats to hyperoxia. *Exp. Lung Res.* 10: 203-222.
- Fureder W, Agis H, Semper H, Keil F, Maier U, Muller M.R, Czerwenka K, Hofler H, Lechner K and Valent P. 1995. Differential response of human basophils and mast cells to recombinant chemokines. *Ann. Hematol.* 70: 251-258.
- Furie M.B and Randolph G.J. 1995. Review. Chemokines and tissue injury. *Am. J. Pathol.* 146: 1287-1301.
- Gail D.B and Lenfant C.J.M. 1983. Cells of the lung: biology and clinical implications. *Am Rev. Respir. Dis.* 127: 366-387.

- Gamble J.R, Harlan J.M, Klebanoff S.J and Vadas M.A. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.82: 8667-8671.
- Garcia-Zepeda E.A, Combadiere C, Rothenberg M.E, Sarafi M.N, Lavigne F, Hamid Q, Murphy P.M and Luster A.D. 1996. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and non allergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* 1996: 5613-5626.
- Gee J.B.L and Walker Smith G.J. 1983. Cellular mechanisms in occupational disease. dans “*Lung disease*” Ed. Gee J.B.L, Morgan W.K.C et Brooks S.M. Raven Press. New York.
- Gery I, Davies P, Derr J, Krett N, Barranger J.A. 1981. Relationship between production and release of lymphocyte-activating factor (interleukin-1) by murine macrophages. 1 Effects of various agents. *Cell. Immunol.* 64: 293-303.
- Gharaee-Kermani M, Denholm E.M and Phan S.H. 1996. Costimulation of fibroblast collagen and Transforming Growth Factor  $\beta_1$  gene expression by Monocyte Chemoattractant Protein-1 via specific receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 17779-17784.
- Gosset P, Lassalle P, Vanhée D, Wallaert B, Aerts C, Voisin C and Tonnel A.B. 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.
- Grimminger F, Von Kurten I, Walmrath D and Seeger W. 1992. Type II alveolar epithelial eicosanoid metabolism: predominance of cyclooxygenase pathways and transcellular lipoxigenase metabolism in co-culture with neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 9-16.
- Gualde N, De L.J, Serizay B and Malinvaud G. 1977. LHA and silicosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116: 334-336.
- Gundel R.H, Wegner C.D and Torcellini C.A. 1991. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and the late phase airway obstruction in monkeys. *J. Clin. Invest.* 88: 1407-
- Guzman J, Izumi T, Nagai S and Costabel U. 1994. ICAM-1 and integrin expression on isolated human alveolar type II pneumocytes. *Eur. Respir. J.* 7: 736-739.
- Hahon N and Castranova V. 1989. Interferon production in rat type II pneumocyte and alveolar macrophages. *Exp. Lung Res.* 15: 429-445.
- Hascheck W.M and Witschi H. 1979. Pulmonary fibrosis - a possible mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51: 475-487
- Hayakawa H, Myrvik Q.N and St. Clair R.W. 1989. Pulmonary surfactant inhibits priming of rabbit alveolar macrophage. Evidence that surfactant suppresses the oxidative burst of alveolar macrophage in infant rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 1390-1397.
- Heise E.R, Mentnech M.S, Olenchock S.A, Kurz S.A and Morgan W.K.C. 1973. HLA-A1 and coal workers' pneumoconiosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119: 903-908.
- Holt P.G, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin P.G, Kraal G and Thepen T. 1993. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 177: 397-407.

- Holt P.G. 1978. Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118: 791-794.
- Honda K, Hirayama K, Kikuchi I, Nagato H, Tamai H, Sasazuki T. 1988. HLA and silicosis. *N. Engl. J. Med.* 319: 1610-
- Hook G.E. 1982. Extracellular hydrolase in the lung. *J. Biol. Chem.* 17:520-528.
- Housset B. 1994. Radicaux libres et pathologie respiratoire. *C. R. Soc. Biol.* 188: 321-333.
- Huffnagle G.B, Streiter R.M, Standiford T.J, McDonald R.A, Burdick M.D, Kunkel S.L and Toews G.B. 1995. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4(+) T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* 155: 4790-4797.
- Hynes R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69: 11-25.
- Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148: 2423-2428.
- Johnson A.R, Callahan K.S, Tsai S.C and Campbell W.B. 1981. Prostacyclin and prostaglandin biosynthesis in human pulmonary endothelial cells. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 17: 687-701.
- Johnston R.B, Godzik C.A and Cohn C.A. 1978. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.* 148: 115-127.
- Jones K.P, Reynolds S.P, Capper S.J, Kalinka S, Edwards J.H and Davies B.H. 1991. Measurement of interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid by radioimmunoassay: differences between patients with interstitial lung disease and control subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 83: 30-34.
- Kaczmarek B, Calabretta B and Baserga R. 1985. Expression of cell-cycle-dependent genes in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 5375-5379.
- Kang A.D, Liu D.Y, Eierman D and Haskill S. 1992. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9034-9038.
- Kang B.H, Crapo J.D, Wegner C.D, Letts L.G and Chang L.Y. 1993. Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 350-355.
- Kuhn D.C and Demers L.M. 1992. Influence of mineral dust surface chemistry on eicosanoid production by the alveolar macrophage. *J. Toxicol. Environ. Health.* 35: 39-50.
- Karatzas N.B and Lee G.deJ. 1969. Propagation of blood flow pulse in the normal human pulmonary arterial system analysis of the pulsatile capillary flow. *Circ. Res.* 25: 11-
- Katsura H, Kawada H and Konno K. 1993. Rat surfactant apoprotein A (SP-A exhibits antioxidant effects on alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 520-525.
- Kelley J. 1989. Collagen. Dans "*Lung biology in health and disease.*" Ed. Massaro D. Vol 41: Lung cell biology. 821-857.
- Kelley J. 1990. Cytokines of the lung. *Am. Rev. respir. Dis.* 141: 765-788.

- Khalil N, O'Connor R.N, Unruh H.W, Warren P.W, Flanders K.C, Kemp A, Berezney O.H and Greenberg A.H. 1991. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$  in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 155-162.
- Kishimoto T, Akira S, Taga T. 1992. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258: 593-
- Klebanoff S.J, Vadas M.A, Harlan J.M, Sparks L.H, Gamble J.R, Agosti J.M and Waltersdorff A.M. 1986. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 136: 4220-4225.
- Kobzik L, Godleski J.J and Brain J. 1990. Oxidative metabolism in the alveolar macrophage: analysis by flow cytometry. *J. Leuk. Biol.* 47: 295-301.
- Kobzik L, Huang S, Paulauskis J.D and Goldleski J.J. 1993. Particle opsonisation and lung macrophage cytokine response. *J. Immunol.* 151: 2753-2759.
- Kobzik L. 1995. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. *J. Immunol.* 155: 367-376.
- Kovacs E.J and DiPietro L.A. 1994. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 8: 854-861.
- Krieger Mand Herz J. 1994. Structures and fonctions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63: 601-607.
- Kuan S.F., Rust K and Crouch E. 1992. Interaction of surfactant protein D with bacterial liposaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in alveolar lavage. *J. Clin. Invest.* 90: 97-106.
- Kuroki Y, Mason R.J and Voelker D.R. 1988. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5566-5570.
- LaPP N.L and Castranova V. 1993. How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop. A cellular assessment. *Occup. Med.* 8: 35-56.
- Lassale P, Gosset P, Aerts C, Fournier E; Lafitte J.J, Degreef J.M, Wallaert B, Tonnel A.B and Capron A. 1990. Abnormal secretion of interleukin 1 and tumor necrosis factor by alveolar macrophage in coal workers' pneumoconiosis: comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. *Exp. Lung Res.* 16: 73-80.
- Lawrence E.C, Theodore B.J and Martin R.R. 1983. Modulation of pokeweed mitogen-induced immunoglobulin secretion by human bronchoalveolar cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126: 248-252.
- Le Bouffant L, Daniel H et Bruyet B. 1987. Facteurs influençant la nocivité des poussières de mine de charbon. Dans "*Silicose et pneumoconioses à poussières mixtes*". Colloque INSERM. Ed. Le Bouffant. Vol 155: p243-264.
- Leonard E.J and Yoshimura T. 1990. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today.* 11: 97-101.
- Lethup B.P, Federspeil S.J, Guerry-Force M.L, Wetherall N.T, Commers P.A, DiMari S.J and Haralson M.A. 1989. Extracellular matrix biosynthesis by cultured fetal rat lung epithelial cells. I. Characterisation of the clone and the major genetic types of collagen produced. *Lab. Invest.* 60:791-807.

- Lewis M.S, Whatley R.E, Cain P, McIntyre T.M, Prescott S.M and Zimmerman G.A. 1988. Hydrogen peroxyde stimulates the synthesis of paletet activating factor by endothelium and induces endothelial cell dependant adhesion. *J. Clin. Invest.* 94: 1722-1728.
- Lipchik R.J, Chauncey J.B, Paine R III, Simon R.H and Peters-Golden M. 1990. Arachidonate metabolism increases as rat alveolar type II cells differentiate *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 3: L73-L80.
- Lipscomb M.F, Huffnagle G.B, Lovchik J.A, Lyons C.R, Pollard A.M and Yates J.L. 1993. The role of T lymphocytes in pulmonary microbial defense mechanisms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117: 1225-1232.
- Lukacs N.W and Ward P.A. 1996. Inflammatory mediators, cytokines, and adhesion molecules in pulmonary inflammation and injury. *Adv. Immunol.* 62: 257-303.
- Lukacs NW, Streiter RM, Elner VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL. 1994. Intercellular adhesion molecule-1 mediates expression of monocyte-derived MIP-1 during monocyte-endothelial cell interaction. *Blood* 83: 1174-1178.
- Lukacs NW, Streiter RM, Elner VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL. 1995. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood* 86: 2767-2773.
- Mac Lean J.A, Xia W, Pinto C.E, Zhao L, Liu H.W and Kradin R.L. 1995. Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am. J. Pathol.* 148: 657-666.
- Madri JA and Furthmayr H. 1980. Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol.* 11: 353-366.
- Magazin M, Guillemot J-C, Vita N, Ferrera P. 1994. Interleukin-13 is a monocyte chemoattractant. *Eur. Cyt. Netw.* 5: 397-400.
- Maitre B and Housset B. 1996. Fonctions métaboliques. In « *pneumologie* » M. Aubier, M. Founier. R. Pariente. Ed Medecine-Sciences. Flammarion. 34-39.
- Maniscalco W.M, Watkins R.H, Finkelstein J.N and Campbell M.H. 1995. Vascular endothelial growth factor mRNA increases in alveolar epithelial cells during recovery from oxygen injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13: 377-386.
- Martinet Y, Yamauchi K and Crystal R.G. 1988. Differential expression of the tumor necrosis factor / cachectin gene by blood monocytes and lung mononuclear phagocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 659-665.
- Mason R.J, Dobbs L.G, Greenleaf R.D and Williams M.C. 1977. Alveolar type II cells. *Fed Proc.* 36: 2697-2702.
- Mason R.J, Williams M.C, Widdicombe J.H, Sanders D.S and Bery L.C.Jr. 1982. Transepithelial transport by pulmonary epithelial type II cells in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6033-6037.
- Matsushima K, Larsen CG, Dubois GC and Oppenheim JJ. 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* 169: 1485-1490.

- McCombs C.C, Michalsky J.P, Westerfield B.T and Light R.W. 1982. Human alveolar macrophages suppress the proliferative response of peripheral blood lymphocytes. *Chest*. 82: 266-271.
- McEver R.P, Beckstead J.H, Moore K.L, Marshall-Carlson L and Bainton D.F. 1989. GMP-140, a paletet granule membrane protein, is also synthetized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84: 92-99.
- McNeely T.B and Coonrod J.D. 1994. Aggregation and opsonisation of type A but not type B Hemophilus influenzae by surfactant protein A. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11: 114-122.
- Meier B, Radke H.H, Selle S, Younes M, Sies H, Resh K and Habermehl G.G. 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* 263: 539-545.
- Mills C.D. 1991. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J. Immunol.* 146: 2719-
- Ming W.J, Bersani L and Mantoani A. 1987. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 138: 1469-1474.
- Mohr C, Gemsa D, Graebner C, Hemenway DR, Leslie KO, Absher PM and Davis GS. 1991. Systemic macrophage stimulation in rats with silicosis: enhanced release of Tumor necrosis factor- $\alpha$  from alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 395-402.
- Mohr C, Davis G.S, Graebner C, Hemenway D.R and Gemsa D. 1992. Enhanced release of prostaglandin E2 from macrophages of rats silicosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6: 390-396.
- Monick M, Glazier J and Hunnighake G.W. 1987. Human alveolar macrophages suppress interleukin 1 activity via the secretion of prostaglandin E2. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 72-76.
- Moore S.A, Streier R.M, Rolfe M.W and Standiford T.J. 1992. Expression and regulation of human alveolar macrophage-derived interleukin-1 receptor antagonist. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6: 569-575.
- Morgan W.K.C, Handelsman L, Kilbelstis J, Lapp N.L and Reger R.B. 1974. Ventilatory capacity and lung volumes of U.S. coal miners. *Arch. Environ. Health.* 28: 182-189.
- Nain M, Hinder F, Gong J.H, Bender A, Sprenger H and Gemsa D. 1990. TNF production of influenza infected macrophages and potentiating effect of LPS. *J. Immunol.* 145: 1921-1927.
- Nash J.R.G, Mc Laughlin P.J, Butcher D and Corrin B. 1993. Expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Histopathology.* 22: 343-347.
- Ogisho Y and Kubota Y. 1987. Interleukin 1 production and accessory cell fonction of rat alveolar macrophages exposed to mineral dust particules. *Microbiol. Immunol.* 31: 275-287.
- Ogisho Y and Yamada Y. 1993. Cytotoxicity of fibrogenic asbestos and silica on murine pulmonary alveolar colony-forming cells. *Inhalation. Toxicology.* 5: 303-307.
- Oppenheim J.J, Zachariae C.O.C, Mukaida N and Matsushima K. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 617-648.
- Paine R, Chavis A, Gasposchkin D, Christensen P, Mody C.H, Turka L.A and Toews G.B. 1992. A factor secreted by a human pulmonary alveolar epithelial-like cell line blocks T-cell proliferation between G1 and S phase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 658-666.

- Paine R, Mody C.H, Chavis A, Spahr M.A, Turka L.A and Toews G.B. 1991. Alveolar epithelial cells block lymphocyte proliferation in vitro without inhibiting activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 221-229.
- Paine R, Rolfe M.W, Standiford T.J, Burdick M.D, Rollins B.J and Streiter R. 1993. MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J. Immunol.* 150: 4561-4570.
- Parkes W.R. 1982. Occupational lung disorders. 2nd ed. Londre. ed Butterworth.
- Parton L.A, Warbuton D and Laug W.E. 1992. Plasminogen activator inhibitor type I production by rat type II pneumocyte in culture. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 133-139.
- Pendino K.J, Laskin J.D, Shuler R.L, Punjabi C.J and Laskin D.L. 1993. Enhanced production of nitric oxid by rat alveolar macrophages following inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxid synthase. *J. Immunol.* 151: 7196-7205.
- Pendino K.J, Shuler R.L, Laskin J.D and Laskin D.L. 1994. Enhanced production of interleukin-1, tumor necrosis factor-a, and fibronectin by rat lung phagocytes following inhalation of pulmonary irritant. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 11: 279-286.
- Pestel J, Dessaint J.P, Joseph M, Bazin H and Capron A. 1984. Macrophage triggering by aggregated immunoglobulins. II. Comparaison of IgE and IgG aggregates or immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 404-412.
- Pestel J, Joseph M, Dessaint J.P and Capron A. 1981. Macrophage triggering by aggregated immunoglobulins. I. Delayed effect of IgG aggregates or immune complexes. *J. Immunol.* 126: 1887-1891.
- Pforte A, Gerth C, Voss A, Beer B, Häussinger K, Jütting U, Burger G and Ziegler-Heitbrock H.W.L. 1993. Proliferating alveolar macrophages in BAL and lung function changes in nterstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 6: 951-955.
- Phan S.H. 1989. Diffuse interstitial fibrosis. Dans "*Lung biology in health and disease.*" Ed. Massaro D. Vol 41: Lung cell biology. 907-953.
- Rand M.L, Warren J.S, Mansour M.K, Newman W and Ringler D.J. 1996. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am. J. pathol.* 148: 855-864.
- Rannels D.E, Dunsmore S.E and Grove R.N. 1992. Extracellular matrix synthesis and turnover by type II pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 262 (*Lung Cell. Mol. Physiol.*) 6: L582-L589.
- Rannels S.R., Fisher C.S. Heuser L.J and Rannels D.E. 1987 Culture of type II pneumocyte on a type II cell-derived fibronectin-rich matrix. *Am. J. Physiol.* 253 (*Cell. Physiol.*) 22: C759-C765.
- Revillard J.P. 1994. Activation des cellules du système immunitaire. Dans "*Immunologie.*" Ed. DeBoeck Université. p127-128.
- Rich E.A, Cooper C, Toossi Z, Leonard R.L, Stucky R.M, Wiblin R.T and Ellner J.J. 1991. Requirement for cell-to-cell contact for immunosuppressive activity of human alveolar macrophage. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4: 287-294.
- Rich E.A, Twardy D.J, Fijiwara H and Ellner J.J. 1987. Spectrum of immunoregulatory functions and proprieties of human alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1236: 258-265.

- Roberts Jr. L. L, Prill A.H and Mann T.N. 1986. IL-1 and IL-1 inhibitor production by human alveolar macrophages exposed to influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 163: 511-519.
- Roitt I.M, Brostoff J et Male D.K. 1994. Le complément. Dans “*Immunologie*” 3ème édition. Traduit par Revillard J.P et Fridman W.H. Ed. DeBoeck Université. p12.1-12.17.
- Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, Orringer MB, Phan SH, Evanoff HL, Burdick MD, Streiter RM. 1992. Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* . 263: L536-L545.
- Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. 1991. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 78: 1112-1116.
- Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. 1990. Cytokine-activated endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Path.* 136: 1229-1233.
- Rooney S.A, Young S.L and Mendelson C.R. 1994. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* 8: 957-967.
- Roth M.D and Golub S.H. 1993. Human pulmonary macrophages utilize prostaglandins and transforming growth factor beta1 to suppress lymphocyte activation. *J. leuk. Biol.* 53: 366-371.
- Roth S.J, Carr M.W and Springer T.A. 1995. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25: 3482-3488.
- Ruckley V.A, Gauld S.J, Chapman J.S, Davis, J.M.G, Douglas A.N, Fernie J.M, Jacobsen M and Lambl D. 1984. Emphysema and dust exposure in a group of coal workers. *Lancet.* 11: 600-603.
- Ruoslahti E et Pierschbacher M.D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238: 491-497.
- Ruoslahti E. 1988. Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 375-413.
- Ruoslahti E. 1991. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87: 1-5.
- Ryan J.W and Ryan U.S. 1977. Pulmonary endothelial cells. *Fed. Proc.* 36: 2683-2691.
- Sage H, Farin F.M, Striker G.E and Fisher A.B. 1983. Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of extracellular matrix. *Biochemistry.* 22: 2148-2155.
- Samuka T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S and Matthay M.A. 1994. Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Am. J. Respir. Care Med.* 150: 305-310.
- Schleimer R.P, Sterbinsky S.A, Kaiser J, Bickel C.A, Klunk D.A, Tomioka K, Newman W, Luscinkas F.W, Gimbrone Jr. M.A; McIntyre B.W and Bochner B. 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.* 148: 1086-1092.
- Schmidt J.A, Oliver C.N, Lepe-Zuniga J.L, Green I and 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.
- Schmid-Schonbein G.S.W, Usami S, Skalak R and Chein S. 1980. Interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and post-capillary vessels. *Microvasc. Res.* 19: 45-
- Schneeberger E.E. 1981. Segmental differentiation of endothelial intercellular junctions in intracinar arteries and veins of the rat lung. *Circ. Res.* 49: 1102-1111.

- Sibille Y and Reynolds H.Y. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 471-501.
- Simionescu N. 1981. Transcytosis and traffic on membranes in the endothelial cell. In: Schweig H.D, ed, International cell biology 1980-1981. Berlin: Springer-Verlag. 657-672.
- Sitrin R.G, Ansfield M.J, Kaltreider H.B. 1985. The effect of pulmonary surface-active material on the generation and expression of murine B- and T-lymphocyte effector functions *in vitro*. *Exp Lung Res.* 9: 85-97.
- Smith D.R, Kunkel S.L, Standiford T.J, Rolfe M.W, Lynch J.P, Arenberg D.A, Wilke C.A, Burdick M.D, Martinez F.J, Hampton J.N, Whyte R.I, Orringer M.B and Streiter R.M. 1995. Increased interleukin-1 receptor antagonist in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 1965-1973.
- Snider G.L, Kleinerman J, Thurbeck W.M and Bengali Z.H. 1985. The definition of emphysema. Report of the National Lung and Blood institute Division of Lung Disease Workshop. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 182-185.
- Soutar C.A and Collins H.P.R. 1984. Classification of progressive massive fibrosis of coal miners by type of radiologic appearance. *Br. J. Ind. Med.* 41: 334-339.
- Standiford T.J, Kunkel S.L, Basha M.A, Chesue S.W, Lynch III J.P, Toews G.B, Westwick J and Streiter R.M. 1990. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.* 86: 1945-1953.
- Standiford T.J, Kunkel S.L, Phan S.H, Rollins B.J and Streiter R.M. 1991. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266 (15): 9912-9918.
- Standiford T.J, Rolfe M.W, Kunkel S.L, Lynch III J.P, Burdick M.D, Gilbert A.R, Orringer M.B, Whyte R.I and Streiter R.M. 1993. Macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  expression in interstitial lung disease. *J. Immunol.* 151: 2852-2863.
- Stanley M.W, Henry-Standley M.J, Gajl-Peczalska K.J and Bitterman P.B. 1992. Hyperplasia of type II pneumocytes in acute lung injury. Cytologic findings of sequential bronchoalveolar lavage. *Am. J. Clin. Pathol.* 97: 669-677.
- Streiter R.M, Wiggings R, Phan S.H, Wharram B.L, Showell H.J, Remick D.G, Chensue S.W and Kunkel S.L. 1989. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 694-700.
- Strickland D.H, Thepen T, Kees U.R, Kraal G and Holt P.G. 1993. Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. *Immunol.* 80: 266-272.
- Strunck R.C, Eidlen D.M and Mason R.J. 1988. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J. Clin. Invest.* 81: 1419-1426.
- Takizawa T, Nishinarita S, Kitamura N, Hayakawa J, Kang H, Tomita Y, Mitamura K, Yamagami K et Horie T. 1995. Interaction of the cell-binding domain of fibronectin with VLA-5 integrin induces monokine production on cultured human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 101: 376-382.

- Tarling J.D, Lin H.S and Hsu S. 1987. Self renewal of pulmonary alveolar macrophages. *J. Leuc. Biol.* 42: 443-446.
- Taub D.D, Proost P, Murphy W.J, Anver M, Longo D.L, Vandamme J and Oppenheim J.J. 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes - rapid publication. *J. Clin. Invest.* 95: 1370-1376.
- Taub D.D, Sayers T.J, Carter C.R.D, and Ortaldo J.R. 1995. alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 155: 3877-3888.
- Tenner A.J, Robinson S.L, Borchelt J and Wright J.R. 1989. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1- mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 264: 13923-13928.
- Thomas E.D, Ramberg R.E, Sale G.E, Sparks R.S and Golde D.W. 1976. Direct evidence of a bone marrow-origin of the alveolar macrophage in man. *Science (Wash. DC).* 192: 1016-1018.
- Thomassen M.J, Meeker D.P, Antal J.M, Connors M.J and Wiedemann H.P. 1992. Synthetic surfactant (Exosurf) inhibits endotoxin-stimulated cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 7: 257-260.
- Tilg H, Trehu E, Atkins M.B, Dinarello C.A and Mier J.W. 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 83 (1): 113-118.
- Uguccioni M, Dapuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. 1995. Action of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25 (1): 64-68.
- Van Haarst J.M.W, de Wit H.J, Drexhage H.A and Hoogsteden H.C. 1994. Distribution and immunophenotype of mononuclear phagocytes and dendritic cells in the human lung. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 10: 487-492.
- Van Hal P.T, Wijkhuijs J.M, Mulder P.G and Hoogsteden H.C. 1995. Proliferation of mature and immature subpopulations of bronchoalveolar monocytes/macrophages and peripheral blood monocytes. *Cell. Prolif.* 28: 533-543.
- Van Iwaarden F, Van Strijp J, Visser H, Haagsman H.P, Verhoef J and Van Golde L. 1992a. Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. *J. Biol. Chem.* 267: 25039-25043.
- Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman H.P and Van Golde L.M.G. 1990. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 2: 91-98.
- Van Iwaarden J.F, Shimizu H, Van Golde P.H.M, Voelker D.R and Van Golde L.M.G. 1992b. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by alveolar macrophages. *Biochem. J.* 286: 5-8.
- Van Oss C. 1986. Phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol.* 132: 3-11.
- Van Otterden G.M, Streiter R.M, Kunkel S.L, Paine R III, Greenberger M.J, Danforth J.M, Burdick M.D and Standiford T.J. 1995. Compartmentalized expression of RANTES in murine model of endotoxemia. *J. Immunol.* 154: 1900-1908.

- Van Overveld R.J, Jorens P.G, De Backer W.A, Rampaart M, Bossaert L and Vermeire P.A. 1992. Release of arachidonic acid metabolites from isolated human alveolar type II cells. *Prostaglandins*. 44: 101-110.
- Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C and Tonnel A.B. 1994a. Evaluation of proinflammatory cytokine expression in alveolar macrophages and in the lung of pneumoconiotic patients. Dans «*Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dust and fibres.*» NATO ASI Series, Vol. H85. Ed. Davis J.M.D and Jaurand M.C. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 193-204.
- Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C and Tonnel A.B. 1994b. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of Platelet-Derived Growth Factor, Insuline-like Growth Factor type I, and Transforming Growth Factor  $\beta$  and relationship to disease severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 1049-4055.
- Vanhée D, Gosset P, Wallaert B, and Tonnel A.B. 1994c. Role of macrophage-derived cytokines in coal workers' pneumoconiosis. In "Cell and cytokines in lung inflammation". Chignard M, Pretolani M; Renesto P, Vargaftig B.B. Editors. *Ann. NY. Acad. Sci.* 183-192.
- Vanhée D, Gosset P, Boitelle B, Wallaert B and Tonnel A.B. 1995a. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 8: 834-842.
- Vanhée D, Gosset P, Marquette H, Wallaert B, Lafitte J.J, Gosselin B, Voisin C and Tonnel A.B. 1995b. Secretion and mRNA expression of TNF $\alpha$  and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 298-306.
- Vanhée D, Molet S, Tillie-Leblond I, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. 1996. Expression of leukocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). *Clin. Exp. Immunol.* 106: 541-548.
- Venembre P, Boutten A, Seta N, Dehoux M.S, Crestani B, Aubier M and Durand G. 1994. Secretion of  $\alpha$ 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS Letters*. 346: 171-174.
- Voelker D.R and Mason R.J. 1989. Alveolar type II epithelial cells. Dans "Lung biology in health and disease." Ed. Massaro D. Vol 41: Lung cell biology. 487-538.
- Voisin C et Lenoir L. 1985. Notions générales sur les pneumoconioses. *Encycl. Méd.-chir.* Paris, France. 6039 T<sup>60</sup> - 7.
- Voisin C et Wallaert B. 1992. Empoussiérage professionnel et bronchopneumopathie chronique obstructive; de l'approche étiopathogénique au problème de réparation en milieu minier. *Bull. Acad. Natle. Méd.* 176: 243-252.
- Wallaert B, Bart F, Aerts C, Ouassi M.A, Neyrink J.L et Voisin C. 1987. Sécrétion spontanée d'anions superoxydes, de facteurs chimiotactiques des polynucléaires neutrophiles et de fibronectine par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques Dans "*Silicose et pneumoconioses à poussières mixtes*". Colloque INSERM. Ed. Le Bouffant. Vol 155: p115-121.
- Wallaert B, Lassalle P, Fortin F, Aerts C, Bart F, Fournier E and Voisin C. 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.

- Warren J.S, Kunkel S.T, Cunningham T.W, Johnson K.J and Ward P.A. 1988. Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O<sub>2</sub>- responses by rat alveolar macrophages. *Am. J. Pathol.* 130: 489-495.
- Wastiaux A. 1993. Maladies respiratoires professionnelles. Pneumoconioses: généralités. Dans "Maladies respiratoires". Godard Ph, Bousquet J et Michel F.B. Edition Masson. 585-589.
- Wellicome S.M, Thornill M.H, Thomas D.S, et al. 1990. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by TNF, IL-1 or LPS. *J. Immunol.* 144: 2258-
- Williams M.C. 1984. Uptake of lectins by pulmonary alveolar type II cells: Subsequent deposition into lamellar bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6383-6387.
- Yoshimura T and Leonard E.J. 1992. Human monocyte chemoattractant protein-1: Structure and fonction. In "Interleukin 8 (NAP-1) and related chemotactic cytokines. Cytokines". Baggiolini M and Sorg C. Eds. Basel, Karger. Vol4: 131-152.
- Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. 1989. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunol.* 142: 1956-1962.
- Yurochko A.D, Liu D.Y, Eierman D et Haskill S. 1992. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9034-9038.
- Zachariae COC, Anderson AO, Thompson HL, Appella E, Mantovani A, Oppenheim JJ and Matsushima K. 1990. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J. Exp. Med.* 171: 2177-2182.
- Zay K, Devine D and Churg A. 1995. Quartz inactivates alpha-1-antitrypsin: possible role in mineral dust induced emphysema. *J. Appl. Physiol.* 78: 53-58.

