

**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2019 - Thèse n° 128

***MODÈLES CELLULAIRES
EN PATHOLOGIE RESPIRATOIRE COMPARÉE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 17 décembre 2019
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

CHAZOUILLÈRES Sibylle



VetAgro Sup



**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2019 - Thèse n° 128

***MODÈLES CELLULAIRES
EN PATHOLOGIE RESPIRATOIRE COMPARÉE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 17 décembre 2019
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

CHAZOUILLÈRES Sibylle



VetAgro Sup



Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (01-09-2019)

ABITBOL	Marie	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
BONNET - GARIN	Jeanne-Marie	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
CALLAIT - CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
CHALVET - MONFRAY	Karine	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE - MULLER	Marie-Laure	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
GILLOT - FROMONT	Emmanuelle	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
JOSSON - SCHRAMME	Anne	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
JUNOT	Stéphane	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
LEFRANC - POHL	Anne-Cécile	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
MOISSONNIER	Pierre	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
POUZOT - NEVORET	Céline	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT - ELEVAGE - SPV	Maître de conférences
ROGER	Thierry	DEPT - BASIC - SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT - BASIC - SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS - CANCIAN	Aurélie	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Professeur
VIRIEUX - WATRELOT	Dorothee	DEPT - AC - LOISIR - SPORT	Maître de conférences
ZENNER	Lionel	DEPT - ELEVAGE - SPV	Professeur

Remerciements

À Monsieur le professeur Jean-François Mornex

De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon Est

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon Jury de thèse,
Veuillez trouver l'expression de mes hommages respectueux.

À Monsieur le professeur Jean-Luc Cadore

De Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon

Qui a accepté d'encadrer et de corriger ce travail,
Pour votre gentillesse, votre disponibilité et pour m'avoir encouragée,
Veuillez accepter mes sincères remerciements.

À Madame le Docteur Sara Belluco

De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon

Qui a accepté d'être membre de mon jury de thèse,
Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.

À Madame le Docteur Caroline Leroux

De l'Université Lyon 1 Gerland

Qui a accepté de me guider et de corriger ce travail,
Pour votre disponibilité et vos recommandations,
Veuillez accepter mes sincères remerciements.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES.....	13
TABLE DES TABLEAUX.....	15
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	17
INTRODUCTION	19
1. PRÉSENTATION DE L'ARBRE RESPIRATOIRE.....	21
1.1. LA MORPHOGENÈSE PULMONAIRE.....	21
1.1.1. <i>La spécification de l'endoderme pulmonaire.....</i>	<i>21</i>
1.1.2. <i>Morphogenèse des bronches et organisation de l'épithélium pulmonaire.....</i>	<i>22</i>
1.1.3. <i>Les cellules progénitrices dans le développement de l'endoderme pulmonaire.....</i>	<i>23</i>
1.1.4. <i>Les cellules progénitrices dans le développement du mésoderme pulmonaire.....</i>	<i>24</i>
1.1.5. <i>Mécanismes moléculaires sous-jacents au développement pulmonaire.....</i>	<i>24</i>
1.1.6. <i>Mécanismes de régénération du système respiratoire soumis à de multiples agressions.....</i>	<i>25</i>
1.2. ANATOMIE ET HISTOLOGIE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE.....	29
1.2.1. <i>La trachée.....</i>	<i>29</i>
1.2.2. <i>Les bronches.....</i>	<i>32</i>
1.2.3. <i>Les bronchioles et les sacs alvéolaires.....</i>	<i>35</i>
1.3. PHYSIOLOGIE DU POUMON.....	40
1.3.1. <i>La mécanique respiratoire.....</i>	<i>40</i>
1.3.2. <i>Les échanges gazeux.....</i>	<i>43</i>
1.3.3. <i>Défenses de l'arbre aérifère.....</i>	<i>46</i>
2. TECHNIQUE D'ÉLABORATION D'UN MODÈLE D'ÉTUDE DU TISSU PULMONAIRE	49
2.1. LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES DISPONIBLES ET UTILISABLES	49
2.1.1. <i>Cellules souches et progénitrices adultes.....</i>	<i>49</i>
2.1.2. <i>Cellules souches embryonnaires.....</i>	<i>52</i>
2.1.3. <i>Cellules souches mésenchymateuses.....</i>	<i>53</i>
2.1.4. <i>Cellules souches pluripotentes induites.....</i>	<i>54</i>
2.2. DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES EN CELLULES DE L'ÉPITHÉLIUM PULMONAIRE.....	55
2.2.1. <i>Orientation de la différenciation cellulaire à partir des différentes cellules souches disponibles.....</i>	<i>55</i>
2.2.2. <i>Utilisation de bioréacteurs et d'interface air-liquide pour la différenciation cellulaire</i>	<i>58</i>

2.3.	TYPE DE SUPPORT	62
2.3.1.	<i>Supports biologiques</i>	63
2.3.1.1.	Protéines et mélanges de protéines purifiées.....	63
2.3.1.2.	La matrice extracellulaire et les organes décellularisés.....	64
2.3.1.3.	Protocoles de décellularisation détaillés	66
2.3.2.	<i>Supports synthétiques</i>	76
2.4.	RECONSTITUTION EN PRATIQUE	78
2.4.1.	<i>La recellularisation</i>	78
2.4.2.	<i>La bio-impression</i>	81
2.4.3.	<i>Caractéristiques des systèmes de culture</i>	86
2.4.4.	<i>Évaluation et validation des modèles obtenus</i>	87
3.	PERSPECTIVES EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE	89
3.1.	LA BRONCHITE ASTHMATIQUE CHEZ LE CHAT.....	89
3.1.1.	<i>Particularités histologiques de l'appareil respiratoire du chat</i>	89
3.1.2.	<i>Étiologie, pathogénie, physiopathologie, diagnostic et traitements actuels</i>	90
3.1.2.1.	Définition et étiologie	90
3.1.2.2.	Physiopathologie et pathogénie.....	90
3.1.2.3.	Diagnostic	92
3.1.2.4.	Traitements actuels et Pronostic.....	97
3.1.3.	<i>Intérêt d'un modèle tridimensionnel</i>	99
3.2.	L'INFLAMMATION CHRONIQUE DES PETITES VOIES RESPIRATOIRES CHEZ LE CHEVAL.....	102
3.2.1.	<i>Définition, étiologie, physiopathologie, pathogénie, diagnostic, traitements actuels et pronostic</i>	102
3.2.1.1.	Définition et étiologie	102
3.2.1.2.	Physiopathologie et pathogénie.....	104
3.2.1.3.	Diagnostic	107
3.2.1.4.	Traitements actuels et pronostic.....	110
3.2.2.	<i>Intérêt d'un modèle tridimensionnel</i>	112
3.3.	LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE DU WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	114
3.3.1.	<i>Étiologie, pathogénie, physiopathologie, diagnostic, traitements actuels et pronostic</i>	114
3.3.1.1.	Définition et étiologie	114
3.3.1.2.	Pathogénie et physiopathologie.....	115
3.3.1.3.	Diagnostic	116
3.3.1.4.	Traitements actuels et pronostic.....	120
3.3.2.	<i>Intérêt d'un modèle tridimensionnel</i>	121
3.4.	LA MYCOSE DES POCHEs GUTTURALES CHEZ LE CHEVAL.....	122
3.4.1.	<i>Anatomie, histologie et physiologie des poches gutturales</i>	122
3.4.1.1.	Anatomie	122
3.4.1.2.	Histologie et cytologie des poches gutturales saines.....	124
3.4.1.3.	Physiologie	125
3.4.2.	<i>Étiologie, pathogénie, physiopathologie, diagnostic et traitements actuels</i>	125
3.4.2.1.	Étiologie.....	125

3.4.2.2.	Pathogénie et physiopathologie.....	126
3.4.2.3.	Diagnostic	127
3.4.2.4.	Traitements actuels.....	128
3.4.3.	<i>Pronostic</i>	130
3.4.4.	<i>Intérêt d'un modèle tridimensionnel</i>	130
CONCLUSION		133
BIBLIOGRAPHIE.....		135

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Spécification et développement précoce de l'endoderme pulmonaire chez l'homme (d'après (4)).....	22
Figure 2: Les cellules progénitrices régionales participent à la réparation et à la régénération de l'épithélium pulmonaire (d'après (4))	28
Figure 3 : Structure d'une trachée humaine (d'après (36)).....	31
Figure 4 : Organisation de l'arbre bronchique.....	33
Figure 5: Comparaison de l'organisation cellulaire de différents étages de l'appareil respiratoire entre singe et souris (d'après (40)).....	34
Figure 6 : Cellules Club observées au microscope électronique (d'après (42)).....	36
Figure 7: Schéma de l'organisation cellulaire d'une alvéole.....	38
Figure 8: Composition cellulaire et fonctions de l'épithélium des différentes régions du poumon (d'après (44)).....	39
Figure 9: Relation entre la pression intrapulmonaire et la pression intrapleurale.. ..	40
Figure 10: Inspiration et Expiration.	41
Figure 11 : Résumé de la différenciation des cellules souches pluripotentes induites et de la decellularisation-recellularisation de poumons avec des pneumocytes II issus de cellules souches pluripotentes induites (d'après (70)).....	55
Figure 12 : Interface air-liquide (A) et son utilisation pour la différenciation des cellules épithéliales du poumon (B) (d'après (88)).....	59
Figure 13 : Bioréacteur pour la culture cellulaire	60
Figure 14 : Utilisation d'un bioréacteur rotatif pour la différenciation des pneumocytes II en pneumocytes I (d'après (71))	61
Figure 15: Procédure de traitement pour la décellularisation d'une trachée et de poumons d'un porc (d'après (100)).. ..	74
Figure 16 : Différentes techniques de cellularisation d'un support (d'après (85)).....	80
Figure 17: Procédure de bio-impression de tissus en trois dimensions (d'après (115)).	85
Figure 18 : Radiographie thoracique en vue latérale droite chez un chat siamois de 11 ans atteint d'une bronchite asthmatique sévère (d'après (139)).....	94

Figure 19 : Radiographie thoracique en vue ventro-dorsale d'une atélectasie pulmonaire chez un chat souffrant d'asthme (Source: Vetagro Sup).	94
Figure 20 : Anomalies des voies respiratoires retrouvées en cas d'asthme à l'examen bronchoscopique (d'après (143))	96
Figure 21 : observation microscopique des voies respiratoires d'un chat sain (a) et d'un chat asthmatique (b) (d'après (145))......	97
Figure 22 : Comparaison de la vue endoscopique, du lavage bronchoalvéolaire et de l'apparence histologique de biopsies de bronche entre un cheval asthmatique et un cheval non asthmatique dans un environnement poussiéreux (d'après (171))	107
Figure 23 : Lésions histologiques observées chez des chevaux atteints d'ICPVR (d'après (178)).	109
Figure 24 : Radiographies thoraciques d'un WHWT de 12 ans atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (d'après (198)).....	117
Figure 25 : épithélium alvéolaire d'un WHWT atteint de fibrose pulmonaire idiopathique (d'après(198)).....	119
Figure 26 : Morphologie d'une poche gutturale (d'après (211)).....	123
Figure 27 : Vue endoscopique d'une poche gutturale droite (Source : Pôle équin Vetagro-Sup).....	124
Figure 28 : Coupe histologique de la carotide interne montrant l'invasion de la paroi vasculaire par les hyphes fongiques (➔)(d'après (226))	127
Figure 29 : Image endoscopique d'une plaque mycosique sur la paroi d'une poche gutturale droite (➔) (d'après (224)).....	128

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Comparaison de la longueur et du diamètre de la trachée chez différentes espèces. (d'après (34))	29
Tableau II: Pressions partielles de différents gaz composant l'air à plusieurs étages de l'appareil respiratoire chez l'homme	45
Tableau III: Cellules souches et progénitrices du poumon adulte capables de produire un organoïde chez l'homme et chez la souris (56).....	51
Tableau IV: Méthodes de décellularisation communément employées (105).....	72
Tableau V : Critères utilisés pour la gradation de la sévérité des opacifications tomodynamométriques pulmonaires (d'après (205))	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNdb** : Acide Désoxyribonucléique double brin
- AP-1** : Activator Protein-1
- ARN** : Acide Ribonucléique
- ATP** : Adénosine Triphosphate
- BMP** : Bone Morphogenetic Protein
- CCL2** : Chemokine ligand 2
- CELSR** : Cadherin EGF LAG seven pass G-type receptor 1
- CHAPS** : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
- CO₂** : Dioxyde de carbone
- DAPI** : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique
- EGTA** : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
- EGF** : Epithelial Growth Factor
- FGF** : Fibroblast growth factor
- FOX** : Forkhead box
- FOXJ1** : Forkhead box J1
- FPI** : Fibrose Pulmonaire Idiopathique
- GATA6** : GATA binding protein 6
- GM-CSF** : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
- H₂O** : eau
- ICPVR** : Inflammation chronique des petites voies respiratoires
- **ID2** : Inhibitor of DNA binding 2
- IFN- γ** : Interferon γ
- Ig** : Immunoglobulines
- IGF-1** : Insuline like growth factor 1
- IL** : Interleukine
- IRM** : Imagerie par résonance magnétique
- KGF** : Keratinocyte growth factor
- KLF4** : Kruppel like factor 4
- KRT** : cytokératine
- LBA** : Lavage bronchoalvéolaire
- MBP** : Major Basic Protein
- MMP** : Métalloprotéinésases matricielles
- NF- κ B** : Nuclear Factor κ B
- NGF** : Nerve growth factor
- NKX2.1** : NK2 homeobox 1
- N₂** : Diazote
- Oct3** : Octamer 3
- Oct4** : Octamer 4
- O₂** : Dioxygène
- PaO₂** : Pression partielle artérielle en O₂
- PCP** : Planar Cell Polarity
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PDGF** : Platelet-derived growth factor
- PEG** : hydrogels de polyéthylène glycol
- pH** : potentiel hydrogène
- PCO₂** : Pression partielle en dioxyde de carbone
- PO₂** : Pression partielle en dioxygène
- PIIINP** : Amino propeptide terminal du pro-collagène de type III
- RER** : Réticulum endoplasmique granuleux
- SCGB1A1** : Secrétoglobuline 1a1
- SDS** : dodécylsulfate de sodium
- SFTPC** : Surfactant protein C
- SHH** : Sonic hedgehog
- SOX** : SRY-box transcription factor
- TBP** : tri(n-butyl)phospha
- TGF- β 1** : Transforming Growth Factor β 1
- T_H** : Lymphocyte T helper
- TNF- α** : Tumor Necrosis Factor α
- Trp63** : Transformation related protein 63
- VANGL2** : VANGL planar cell polarity protein 2
- VEGF** : Vascular endothelial growth factor
- WHWT** : West Highland white terrier
- WNT** : WNT family
- 3D** : Tridimensionnel

INTRODUCTION

L'appareil respiratoire fait partie des appareils vitaux composant l'organisme, son anatomie, son histologie et sa physiologie sont désormais bien connues. De nombreuses maladies touchent cet appareil et certaines sont responsables de lésions irréversibles. Dans ce cas, notre seule alternative consiste à tenter de limiter les effets et la progression de la maladie. Parfois le seul traitement possible consiste en une transplantation pulmonaire comme dans les cas sévères de bronchopneumopathie chronique obstructive chez l'homme. L'organisation mondiale de la santé prévoit que cette maladie deviendra la troisième cause de mortalité dans le monde en 2030 et la quatrième cause de mortalité en France. Or les donneurs d'organe ne sont pas assez nombreux, la procédure est risquée et nécessite des traitements immunosuppresseurs lourds qui augmentent le risque d'infection et de cancer. Dans les années 1980, Yuan-Cheng Bert Fung introduit le nouveau terme d'« ingénierie tissulaire ». Ce terme regroupe les méthodes visant à produire des tissus vivants pour restaurer, améliorer, maintenir ou étudier leurs fonctions, à partir de cellules en culture (1). Actuellement, les constructions cutanées restent les produits d'ingénierie tissulaire les plus aboutis mais de nombreux travaux sont réalisés sur d'autres organes et en particulier sur le poumon (1). En 2008, la première transplantation de trachée issue de l'ingénierie tissulaire est réalisée et apparaît comme une révolution dans le domaine de la régénération tissulaire (2). Depuis, cette technique se développe énormément et permet de créer des modèles *in vitro* en trois dimensions afin d'étudier la pathogénie de certaines affections. Ces modèles ont l'avantage de recréer l'architecture des tissus à la différence des cultures cellulaires classiques en deux dimensions (3).

Les mammifères domestiques sont eux aussi touchés par des maladies pulmonaires sévères parfois difficiles à diagnostiquer et à traiter, souvent comparées aux affections humaines alors qu'elles s'en distinguent par de petites spécificités. Dans ce contexte, le développement de modèles tridimensionnels de poumon pourrait permettre d'améliorer leur prise en charge ainsi que d'améliorer les méthodes de comparaison entre l'homme et l'animal.

Ce travail a pour objectif d'expliquer les principes de la reproduction tridimensionnelle d'organes et en particulier celle du poumon ainsi que les applications qu'elle pourrait offrir en médecine vétérinaire au travers de plusieurs exemples de maladies fréquemment rencontrées chez les mammifères domestiques. Dans un premier temps, une présentation de l'appareil respiratoire comprenant son développement embryonnaire, son histologie et ses grands principes de fonctionnement sera faite. La méthode d'élaboration d'un modèle tridimensionnel du poumon sera ensuite explicitée. Enfin plusieurs exemples de maladies de mammifères domestiques seront exposés afin de souligner l'intérêt du développement de tels modèles.

1. PRÉSENTATION DE L'ARBRE RESPIRATOIRE

1.1. LA MORPHOGENÈSE PULMONAIRE

Les poumons et la trachée sont issus de l'endoderme. La différenciation des poumons débute autour du 9^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris avec l'évagination de cellules épithéliales qui aboutit à l'apparition de la trachée et de deux bourgeons pulmonaires. Entre le 9^{ème} et le 13^{ème} jour de vie embryonnaire c'est le début du développement embryonnaire des poumons et la trachée se sépare de l'œsophage. Jusqu'au 16^{ème} jour, les bourgeons pulmonaires subissent un processus de ramification poussé qui mène au réseau de division des voies respiratoires avec des milliers de branches terminales. Ensuite des grappes de sacs épithéliaux se développent avant d'évoluer en alvéoles. La maturation des alvéoles a lieu au stade de l'alvéolisation lors des premiers jours de vie (4).

Pendant tout le développement pulmonaire, le mésoderme interagit avec l'endoderme pour favoriser les ramifications évoquées précédemment et générer les différents types cellulaires qui définissent le parenchyme pulmonaire.

1.1.1. La spécification de l'endoderme pulmonaire

De nombreux signaux de différenciation interviennent et interagissent au cours du développement pulmonaire déterminant les premiers stades embryonnaires et délimitant la zone de différenciation de cet organe. L'expression du **facteur de transcription NKX2-1** (NK2 homeobox 1) est essentielle dans les étapes initiales de développement des poumons et débute dans l'endoderme antérieur à partir du 9^{ème} jour de vie embryonnaire chez la souris et dès le 28^{ème} jour de gestation chez l'homme (4). Les facteurs **WNT2 et WNT2B** (Wnt family member 2 et 2B) **dans le mésoderme** adjacent stimulent la production de **β-caténine** qui elle-même promeut l'expression du facteur de transcription NKX2-1. Si les facteurs WNT2 et WNT2B ne sont pas correctement exprimés, le facteur de transcription NKX2-1 est absent et ni la trachée ni les poumons ne se différencient (5). Le facteur **BMP4** (Bone Morphogenetic Protein) réprime l'expression de **SOX2** (SRY-box transcription factor 2) qui est un inhibiteur de l'expression de NKX2-1. L'expression de BMP4 favorise donc l'expression de NKX2-1 (5) (Figure 1). Ainsi dans un premier temps, la différenciation des poumons dépend de l'expression de facteurs de transcription au niveau de l'endoderme.

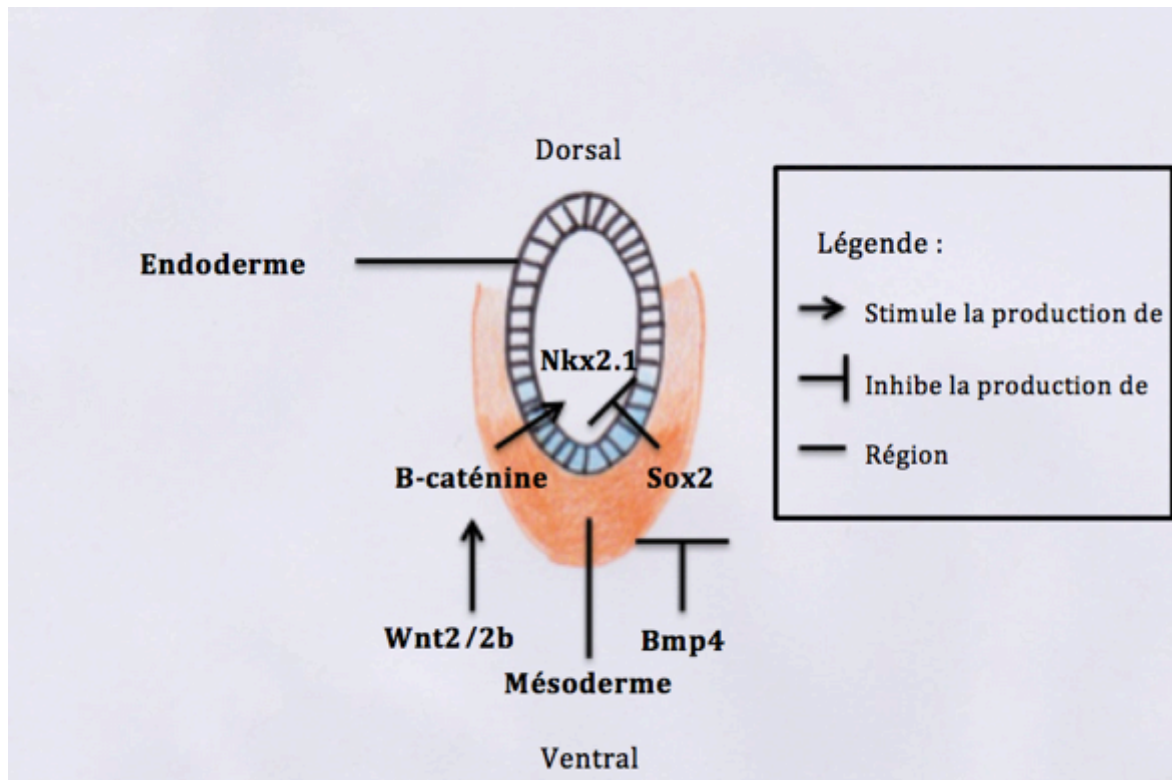


Figure 1: Spécification et développement précoce de l'endoderme pulmonaire chez l'homme (d'après (4))

1.1.2. Morphogénèse des bronches et organisation de l'épithélium pulmonaire

La morphogénèse des bronches fait intervenir la **diffusion paracrine** de molécules issues du mésoderme et l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire. La morphogénèse de ces ramifications est cruciale pour former à la fois les voies de conductions de l'air et les alvéoles terminales. Ce procédé de différenciation est déterminé génétiquement (4). Au cours du développement pulmonaire, la **protéine FGF10** (Fibroblast Growth Factor 10) est essentielle et est considérée comme le morphogène le plus important pour la morphogénèse des ramifications pulmonaires. Elle est exprimée dans le mésenchyme entourant les zones de développement de ces ramifications. Une délétion ciblée du gène codant pour FGF10 résulte en une agénésie complète du poumon. L'expression de FGF10 est réprimée par l'expression des **gènes SHH** (Sonic Hedgehog) et **BMP4** (4). L'expression de **FGF10** apparaît dans des zones spécifiques du **mésenchyme pulmonaire distal** et est **régulée** par **BMP4** et **SHH**. FGF10 est également un **agent mitotique** important. Ce signal mitogénique est nécessaire pour instiguer et initier le développement de nouvelles voies de conduction de l'air. La localisation de l'expression de cette molécule mais également son niveau d'expression interviendraient dans le développement des voies respiratoires (4). FGF10 joue un rôle important dans la régulation de **l'orientation des divisions** cellulaires le long de l'axe proximal-distal de développement des voies respiratoires en régulant l'expression des facteurs Ras et Sprouty (4).

De plus, la voie de signalisation **PCP** (Planar Cell Polarity), une branche de la **voie de signalisation WNT**, est importante pour réguler la **forme des cellules épithéliales** et donc à terme la forme des conduits respiratoires (4). Un défaut d'expression de différents éléments de la voie PCP tels que **Scribbled**, **CELSR 1** (cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1) et **VANGL2** (VANGL planar cell polarity protein 2) mène à une défaillance du développement de l'épithélium pulmonaire (6). La voie PCP est initiée par la liaison d'un ligand de la famille WNT à un récepteur Frizzled à la surface d'une cellule. Les détails précis du mode d'action de cette voie de signalisation ne sont pas encore totalement connus (6).

L'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire est primordiale dans la structuration des voies respiratoires. Certaines protéines de la matrice comme la fibronectine s'accumulent au niveau des points de ramification ce qui suppose que les interactions entre les cellules et la matrice conduisent à la formation de nouvelles ramifications (4). La fibronectine interagit avec les cellules *via* des récepteurs à **intégrines** notamment celles de la famille $\beta 1$ (4). L'épithélium est pseudostratifié dans les premières voies respiratoires alors qu'il est simple dans les alvéoles. Une étude de 2012 montre que la perte de l'intégrine $\beta 1$ dans l'épithélium respiratoire mène au développement d'un épithélium pluristratifié et non pseudostratifié et bloque le déroulement de la morphogenèse pulmonaire (7). Les épithéliums déficients en intégrine $\beta 1$ révèlent une perte de la polarisation de leurs cellules (7). Leur rôle serait donc à la fois d'éviter le développement d'un épithélium pluristratifié et de promouvoir une polarité apicale-basale appropriée aux cellules épithéliales (7).

1.1.3. Les cellules progénitrices dans le développement de l'endoderme pulmonaire.

Au cours de la formation des ramifications, **différentes lignées cellulaires** de l'endoderme se développent le long de son **axe proximal-distal**. L'expression du **gène SOX2** marque la **lignée progénitrice de l'endoderme proximal**, alors que **l'expression combinée du gène SOX9** (SRY-box transcription factor 9) et du **régulateur de transcription ID2** (Inhibitor of DNA binding 2) **marque la lignée progénitrice de l'endoderme distal**. Alors que les cellules **proximales** donnent naissance aux **cellules neuroendocrines**, aux **cellules sécrétrices**, aux **cellules ciliées** et aux **cellules caliciformes**, les cellules **distales** donnent naissance aux **pneumocytes de type 1 et de type 2** (8).

Les cellules de l'endoderme exprimant le facteur de transcription NKX2-1, sous l'influence de WNT2 ou FGF10 exprimés dans le mésenchyme, sont amenées à se différencier en cellules du tissu pulmonaire. Elles donnent alors naissance à la fois à des cellules progénitrices exprimant SOX2 et SOX9/ID2, proximatement et distalement respectivement qui vont se différencier (4). La capacité de différenciation de ces cellules évolue avec le temps. Par exemple les cellules exprimant ID2 sont capables de se

différencier en cellules de l'épithélium alvéolaire ou de l'épithélium des voies de conduction de l'air au début du développement embryonnaire alors qu'en fin de gestation elles ne produisent que des pneumocytes (9). Les mécanismes qui régulent ces modifications de capacité de différenciation au cours du temps sont encore mal connus, mais impliqueraient des changements dans l'expression et l'activité des voies de signalisation et des facteurs de transcription intervenant dans le développement du parenchyme pulmonaire (4).

1.1.4. Les cellules progénitrices dans le développement du mésoderme pulmonaire

Le mésoderme pulmonaire est une source importante de signaux paracrines comme FGF10 et WNT2 déjà évoqués. Ces signaux sont essentiels à la réalisation de multiples processus au cours du développement des poumons, notamment leur action sur les premières cellules progénitrices de l'endoderme, la prolifération des cellules épithéliales ainsi que leur différenciation. Des ramifications pulmonaires, induite par le mésenchyme distal du poumon, au niveau de la trachée peuvent être obtenues par reconstruction (10). **Le mésoderme joue donc un rôle important dans le développement correct de l'endoderme.** Le poumon mature contient de nombreux types cellulaires issus du mésoderme, comme les **cellules musculaires lisses**, les **cellules endothéliales**, les **péricytes** ou encore les **fibroblastes** alvéolaires et les **lipofibroblastes** (4).

1.1.5. Mécanismes moléculaires sous-jacents au développement pulmonaire

De nombreux facteurs de transcription interviennent, dont certains font partie de la famille des homéoboites (séquence d'ADN qu'on retrouve dans certains gènes essentiels au développement embryonnaire) comme NKX2-1. Ce facteur de transcription interagit avec d'autres facteurs de régulation pour affecter l'expression de différents gènes. L'un de ces facteurs de régulation est **GATA6** (Gata binding protein 6), qui fait partie de la famille des GAT (11), des protéines en doigts de zinc. GATA6 est fortement exprimée au cours du développement de l'endoderme et du muscle lisse vasculaire du poumon (11). Les facteurs de transcription de la famille **FOX** (Forkhead boxes) sont également très présents lors du développement pulmonaire. Une perte de leur expression mène à des défauts de différenciation, notamment des **pneumocytes de type 2**, et des cellules **sécrétrices** et **ciliées** des voies de conduction (12). Les facteurs de transcription de la **famille des ETS** interviennent dans la régulation du développement de l'épithélium pulmonaire, en particulier de l'épithélium alvéolaire mais aussi dans la différenciation des cellules caliciformes (13).

Des **mécanismes épigénétiques** tels que **des acétylations**, **des méthylation**s, **des phosphorylations** ou encore **l'ubiquitylation** de certains acides aminés précis des **histones** ont aussi été mis en évidence et seraient des facteurs clefs pour la régulation du développement pulmonaire (4)(14). Une acétylation de la queue de l'histone favorise la transcription du gène alors qu'une désacétylation entraîne un arrêt de la transcription du gène concerné. Par exemple la perte d'activité de certaines désacétylases dans l'épithélium mène à une réduction de l'expression du gène SOX2 et empêche la différenciation de nombreuses lignées cellulaires proximale. (14)

Il a été montré que **l'hyperoxie** au cours de la phase néonatale diminue l'activité de certaines désacétylases, ce qui mène à une **hyperplasie** de l'épithélium alvéolaire et donc à un **défaut de l'alvéolisation** (15). Des **facteurs environnementaux** interviennent donc dans le développement du parenchyme pulmonaire (15).

Les **micros ARN** (Acide ribonucléique), qui sont une classe de courtes séquences d'ARN non codants, inhibent la traduction des gènes en dégradant les ARN messagers ou en empêchant leur transcription. Ces micros ARN (miR17~92, miR106b~25, miR106a~363, miR302~367 par exemple) sont exprimés **dans l'épithélium** pulmonaire et **dans le mésoderme**. Une perte de ces micros ARN lors du développement entraîne un défaut dans l'apparition des ramifications et dans le développement des structures épithéliales qui mènent ensuite à une mort périnatale (16) (17).

Le développement harmonieux des différents types cellulaires résulte ainsi de nombreuses interactions complexes entre différents types de messages, incluant l'expression de facteurs de transcription comme NKX2-1, de facteurs comme WNT, BMP4, FGF10, la β -caténine, des micro-ARN ainsi que des mécanismes épigénétiques et des facteurs environnementaux.

1.1.6. Mécanismes de régénération du système respiratoire soumis à de multiples agressions

Le poumon fait partie des organes avec une **certaine capacité de régénération** en cas de lésion et à l'état physiologique. Il n'est pas comme l'épiderme, l'intestin ou le système hématopoïétique qui disposent de grande capacité de régénération avec un fort taux de renouvellement physiologiquement et une hiérarchie dans les cellules souches bien définie, ni comme le cœur ou l'encéphale qui ont au contraire très peu de cellules souches et qui ne disposent dès lors que d'une capacité de réparation très réduite (4). Les mécanismes et les cellules mis en jeu varient selon le tissu et l'étage du de l'appareil respiratoire qui sont impliqués.

La capacité des tissus à répondre à une lésion peut être divisée en trois catégories (4). La première, s'appuie sur la composition et l'organisation de différentes régions de l'épithélium respiratoire qui comprennent donc des populations de cellules épithéliales distinctes qui fonctionnent comme des **cellules souches adultes**, définies par leur capacité à effectuer leur **auto-renouvellement** et donner **naissance à différents types cellulaires** au cours du renouvellement physiologique ou du remplacement cellulaire après une lésion. La seconde s'appuie sur le fait que les cellules pulmonaires avec **une activité progénitrice** ne sont pas nécessairement indifférenciées. En particulier, les **cellules basales Trp63⁺** (transformation related protein 63) dans l'épithélium pseudostratifié muco-ciliaire ont une structure assez simple mais les **pneumocytes de type 2 et les cellules Club** qui sont hautement différenciées et présentent une activité de synthèse et de sécrétion intenses sont également connues pour être des cellules souches régénératrices du tissu pulmonaire à l'état adulte. La troisième consiste à considérer que lors de dégâts tissulaires, les cellules épithéliales porteuses de marqueurs d'un certain type de cellules différenciées peuvent, dans certaines circonstances, **changer leur phénotype** et exprimer de manière transitoire ou durable les marqueurs caractéristiques d'un autre type cellulaire (18). Dans certains cas, ce changement de phénotype implique un **processus de dédifférenciation** vers une **cellule intermédiaire** moins spécialisée, **pluripotente** et capable de **proliférer**, suivie d'une **nouvelle différenciation**. Dans d'autres cas il serait possible qu'il n'y ait pas d'étape de dédifférenciation et que le changement de phénotype opère directement. On parle de **plasticité phénotypique** et ce processus n'est pas propre à l'épithélium pulmonaire mais est aussi retrouvé dans d'autres tissus (18). Enfin le processus mis en jeu peut être fortement influencé par le type de lésion, si celle-ci est aiguë ou chronique, et si elle implique une réponse inflammatoire ou immunitaire.

La trachée et les bronches principales présentent un épithélium pseudostratifié dont une population de **cellules souches basales** exprime à la fois le **facteur de transcription Trp63** et la **cytokératine KRT5**. Ces cellules sont à la fois capables de **régénérer les cellules ciliées** et les **cellules sécrétrices** de la trachée en cas de lésion. Ce processus est contrôlé **en partie par le signal Notch** qui favorise la différenciation en cellule sécrétrice et inhibe celle en cellule ciliée (19) (20). L'implication des cellules souches basales Trp63⁺/KRT5⁺ est aussi suspectée dans la **régénération de l'épithélium alvéolaire distal** lors de lésions importantes (21). Ces cellules migreraient dans les régions périphériques avant de se différencier en cellules de l'épithélium alvéolaire (21). Cependant, aucune étude ne fait la distinction entre l'activation de cellules souches comme les cellules souches basales et l'activation de l'expression de facteurs qui déclencherait l'expression des gènes Trp63 et KRT5 dans des lignées cellulaires différentes des cellules souches basales. Lors d'une atteinte de l'épithélium, les cellules basales survivantes prolifèrent. Elles donnent naissance à une **population de cellules progénitrice KRT8⁺** qui se différencie ensuite en **cellules sécrétrices** et en **cellules ciliées**. Si les cellules basales sont détruites, ce sont les cellules sécrétrices

qui se différencient en cellules basales qui redonnent alors naissance aux différentes cellules de l'épithélium (22). Cependant, on ne sait pas encore si toutes les cellules basales ont cette capacité de régénération et de différenciation ou s'il existe des sous-groupes de cellules quiescentes.

Dans la région des **bronchioles**, l'épithélium est composé de **cellules cuboïdes ciliées FOXJ1+** (Forkhead box J1) et de **cellules neuroendocrines**, ainsi que des **cellules sécrétrices** dont des **cellules Club** contenant des vésicules avec des **secrétoglobulines SCGB1A1** (Secretoglobin family 1A member 1). Ces cellules Club montrent des capacités d'**auto-renouvellement** ainsi que la capacité de **générer des cellules ciliées**. Elles peuvent donc être considérées comme des cellules souches à long-terme (23). Il existe aussi des **cellules SFTPC+** (Surfactant protein C)/**SCGB1A1+** localisées à la **frontière entre les bronchioles et les alvéoles** appelées **cellules souches bronchioalvéolaires** et qui sont suspectées participer à la régénération des régions bronchiolaires et alvéolaires en cas de lésion.

Dans les **alvéoles**, les **pneumocytes de type 2** sont capables de **s'auto régénérer** mais agissent également comme cellules progénitrices des pneumocytes de type 1, aussi bien au cours du **renouvellement** cellulaire naturel, qu'à la faveur d'une lésion (24). Après la naissance, les pneumocytes de type 1 proviennent d'une rare population de pneumocytes de type 2 matures capables de se régénérer (25). Cette capacité de **régénération des pneumocytes 1 par les pneumocytes 2** est activée lors de lésion des pneumocytes 1 alors que l'auto-régénération des pneumocytes 2 serait induite par des signaux incluant la **protéine EGF** (Epithelial Growth Factor) (25). Seulement 1% des pneumocytes 2 matures aurait cette capacité de régénération et différenciation et se diviserait **uniquement de manière intermittente et locale**, menant à un taux de régénération d'une alvéole d'environ 7% par an (25). Cependant en cas d'atteinte majeure du poumon telle qu'une pneumectomie, la plupart des pneumocytes 2 disposerait de capacité de régénération et aurait donc **une capacité latente de régénération** selon les conditions (25) (Figure 2). Si les pneumocytes 2 sont la cible au cours d'une lésion, les survivants sont capables d'entreprendre une expansion clonale dont les cellules filles se dispersent dans les alvéoles voisines par migration active (24). Il est également supposé, qu'en cas de stress trop important ou lors de leur vieillissement les pneumocytes 2 ne sont plus capables de se renouveler ou de générer des pneumocytes 1 ; Ils génèrent un signal de prolifération fibroblastique (facteurs de croissance et cytokines entre autre) ce qui aboutit à une **fibrose pulmonaire** (26). Enfin, le développement alvéolaire n'est pas terminé à la naissance et leur surface et leur nombre augmentent considérablement pendant des semaines chez la souris voire des mois chez l'homme avec notamment la formation de septum secondaires.

Les **forces mécaniques** et le **stress physique** sont **des régulateurs** clés du **développement**, de la **maintenance** et de la **réparation alvéolaire** (27)(28). Si l'on retire un seul lobe pulmonaire chez une souris, il en résulte une croissance des lobes

restants (29), il n'y a pas de formation de nouveaux lobes mais il y a une augmentation considérable du nombre d'alvéoles dans les lobes présents avec formation de nouveaux septums. La récupération de la capacité respiratoire se fait en 2 à 3 semaines chez les rongeurs. Plusieurs voies de signalisation sont soupçonnées intervenir dans cette croissance alvéolaire, notamment **EGF** et **KGF** (Keratinocyte growth factor) (30) (31). L'EGF module la maturation et la régénération de l'épithélium et KGF induit la prolifération des pneumocytes de type II et des cellules épithéliales bronchiolaires.

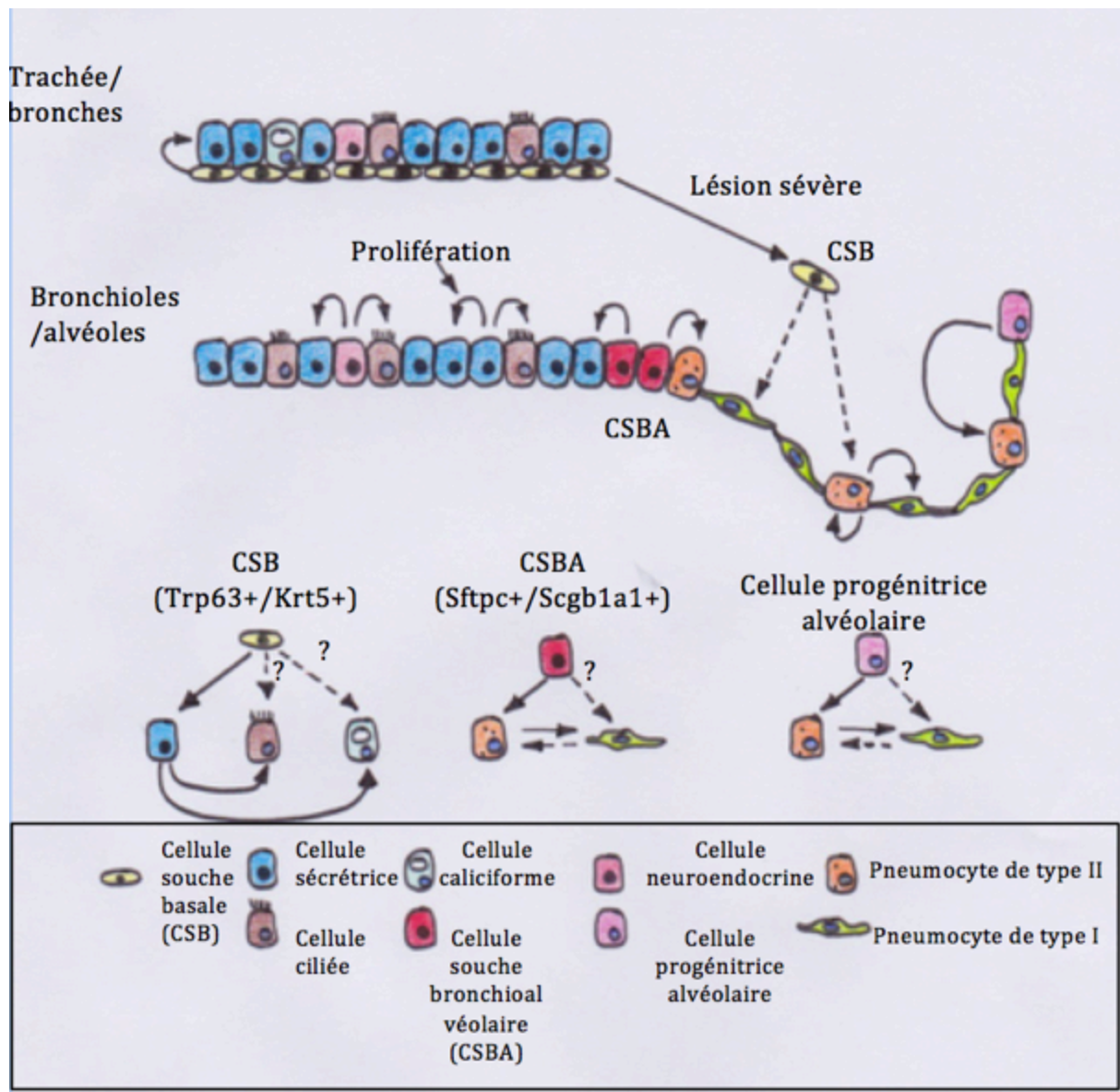


Figure 2: Les cellules progénitrices régionales participent à la réparation et à la régénération de l'épithélium pulmonaire (d'après (4))

Également, **FGF10** produit par les cellules du mésoderme de la partie distale du poumon intervient chez l'adulte et permet le développement de nombreuses structures du mésenchyme, notamment les **cellules musculaires lisses** et les **lipofibroblastes** alvéolaires, en particulier lors de réparation après une lésion (32) (33).

Enfin le poumon dispose d'une certaine capacité de réparation. L'implication des pneumocytes de type II, des cellules souches basales, des cellules Club déjà présentes physiologiquement et montrant des capacités de régénération du parenchyme pulmonaire est une piste à investiguer dans l'élaboration d'un modèle tridimensionnel de poumon mais les conditions environnementales ne doivent pas non plus être négligées lors de l'élaboration de ces modèles.

1.2. ANATOMIE ET HISTOLOGIE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE

1.2.1. La trachée.

La **trachée** est un **tube impair béant flexible** qui fait suite au larynx dans la région de la gorge puis qui chemine dans l'encolure et enfin dans le médiastin crânial puis moyen. Elle se termine au dessus du cœur, par la carène, en **deux bronches principales**, droite et gauche. Les dimensions de la trachée varient en fonction des espèces (Tableau I). Son diamètre augmente lors de l'exercice physique, de la toux ou selon si l'encolure est en flexion ou en extension. Son diamètre est régulier sur toute sa longueur sauf à l'entrée dans la poitrine où il est légèrement diminué. Elle est aplatie dorso-ventralement chez les porcs, les chevaux, les chiens, les chats et les lapins alors qu'elle l'est latéro-latéralement chez les ruminants. Ces différences interspécifiques sont à prendre en compte dans la réalisation de modèles de trachée. En effet, le diamètre, la longueur et la forme varient et sont adaptés à chaque espèce.

Tableau I : Comparaison de la longueur et du diamètre de la trachée chez différentes espèces. (d'après (34))

	Espèces				
	Cheval	Bovin	Chien	Chat	Homme
Longueur (cm)	79-80	55-65	25	8	11-13
Diamètre (cm)	5	5	1,6-1,7	0,5	1-2,5

La trachée est composée de **trois couches** : une **muqueuse**, une **sous muqueuse** et une **adventice**. La plus centrale est une **muqueuse** de type respiratoire avec un **épithélium pseudostratifié cylindrique cilié**, des **cellules caliciformes**, des **cellules souches épithéliales**. Le chorion est riche en **fibres élastiques**, en **glandes muqueuses** et **séreuses**, en **cellules lymphoïdes** et en **nerfs**. La couche intermédiaire est une **sous muqueuse**, tunique **fibro-élastique** dans laquelle se trouvent **des anneaux incomplets de cartilage hyalin en forme de U**, une bande de **muscle lisse**, appelée **muscle trachéal**, complète le U sur la face dorsale de la trachée afin de lui

donner sa forme cylindroïde. La tunique fibro-élastique constitue les **ligaments annulaires** que l'on retrouve entre chaque anneau de cartilage. Elle permet une certaine **dilatation de la trachée** en cas d'effort physique par exemple, alors que la **bande musculaire s'oppose à une dilatation excessive** qui peut avoir lieu lors de la toux. Enfin la tunique la plus externe de la trachée est **l'adventice**, il s'agit d'un tissu **conjonctif lâche péri-trachéal** composé de **collagène** et de **fibres élastiques** (35) (Figure 3).

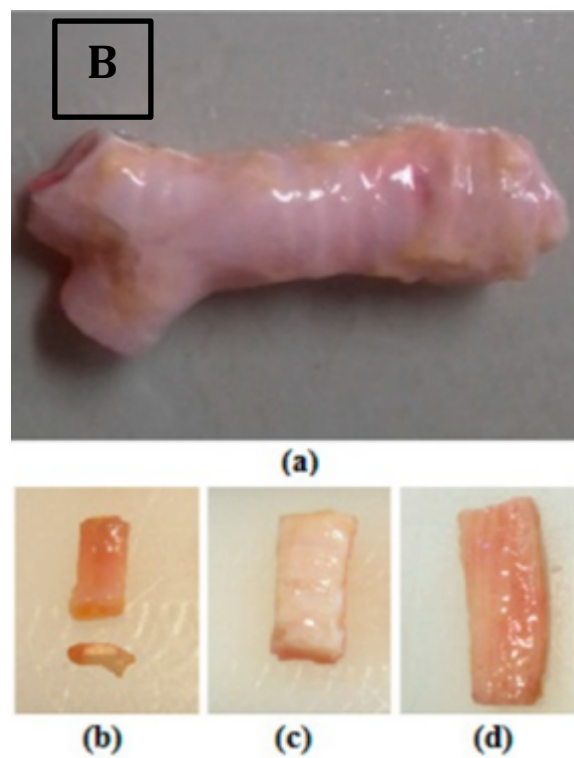
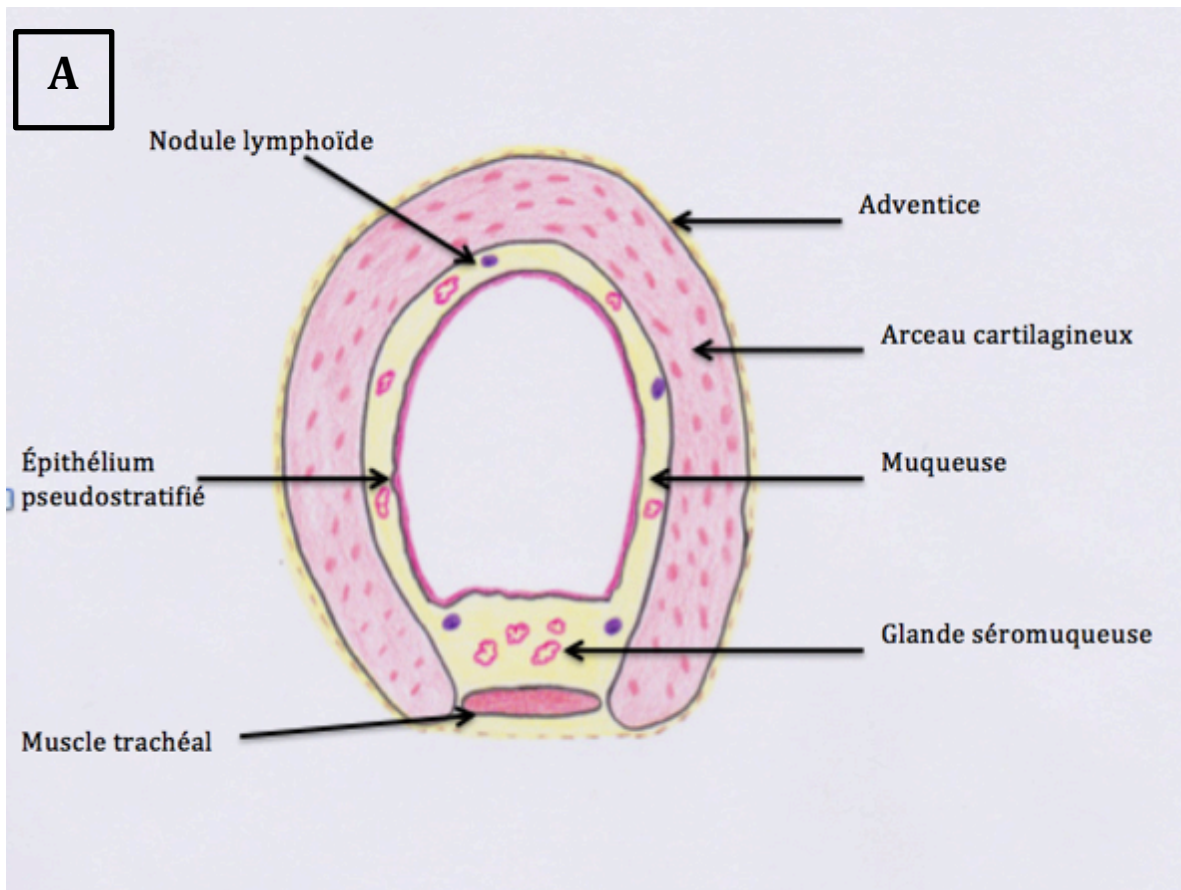


Figure 3 : Structure d'une trachée humaine (d'après (36)) A : Structure de la trachée humaine ; B : différentes parties d'une trachée humaine : (a) échantillon de trachée humaine, (b) échantillon de cartilage, (c) tissu fibro-élastique, (d) muscle trachéal

Le rôle principal de la trachée est de **conduire l'air** depuis l'appareil respiratoire supérieur jusqu'aux bronches. Elle permet également de **réchauffer et d'humidifier** l'air inspiré et a un rôle de **protection** de l'appareil respiratoire inférieur. En effet, les **cellules caliciformes** de la muqueuse produisent du **mucus** contenant des **immunoglobulines A (IgA)**, du **lysozyme**, de la **lactoferrine** et des **peroxydases**. Ce mucus retient les débris de **2 à 10µm** qui remontent dans l'appareil respiratoire supérieur grâce à **l'ascenseur muco-ciliaire** avant d'être expectorés ou déglutis (35).

Le muscle trachéal reçoit une **innervation motrice parasympathique** provenant d'un rameau trachéal du nerf laryngé récurrent et d'un rameau trachéal du nerf vague. Les cellules caliciformes et les glandes muqueuses reçoivent **une innervation excitatrice motrice des nerfs sympathiques et du nerf vague** (37). La trachée est vascularisée par des ramifications issues de **l'artère carotide** (35).

1.2.2. Les bronches.

Les bronches sont des conduits aérifères qui font suite à la trachée. La trachée débouche dans deux bronches principales, gauche et droite, qui pénètrent chacune dans un des poumons. Cette bifurcation se fait à la hauteur du **cinquième espace intercostal** chez toutes les espèces sauf chez le cheval chez qui elle peut atteindre le sixième espace intercostal. La bronche droite est plus large que la gauche. Ces bronches se divisent ensuite en **ramifications primaires et secondaires**. Les ramifications **primaires** correspondent aux **bronches lobaires** chacune débouche dans un **lobe pulmonaire**. Les poumons de tous les mammifères domestiques sont divisés en lobes, séparés par des fissures profondes sauf le cheval dont les lobes ne sont pas distinguables. Chez l'homme, il y a trois bronches lobaires à droite, correspondant aux trois lobes du poumon droit : le lobe crânial, le lobe moyen et le lobe caudal et deux à gauche, pour le lobe crânial et pour le lobe caudal. Le lobe moyen gauche est desservi par une bronche segmentaire. Chez les animaux, le poumon droit présente un lobe supplémentaire appelé lobe accessoire et desservi par une bronche lobaire du même nom et le lobe moyen du poumon gauche est lié à une bronche lobaire moyenne et non à une bronche segmentaire. Chaque bronche principale et lobaire est **accompagnée d'une artère** et d'une **veine pulmonaire**, ainsi que d'une **artère bronchique** (37). Les bronches lobaires se subdivisent en **bronches segmentaires latérales, médiales, ventrales et dorsales** qui approvisionnent chaque territoire broncho-pulmonaires en air (38) (Figure 4).

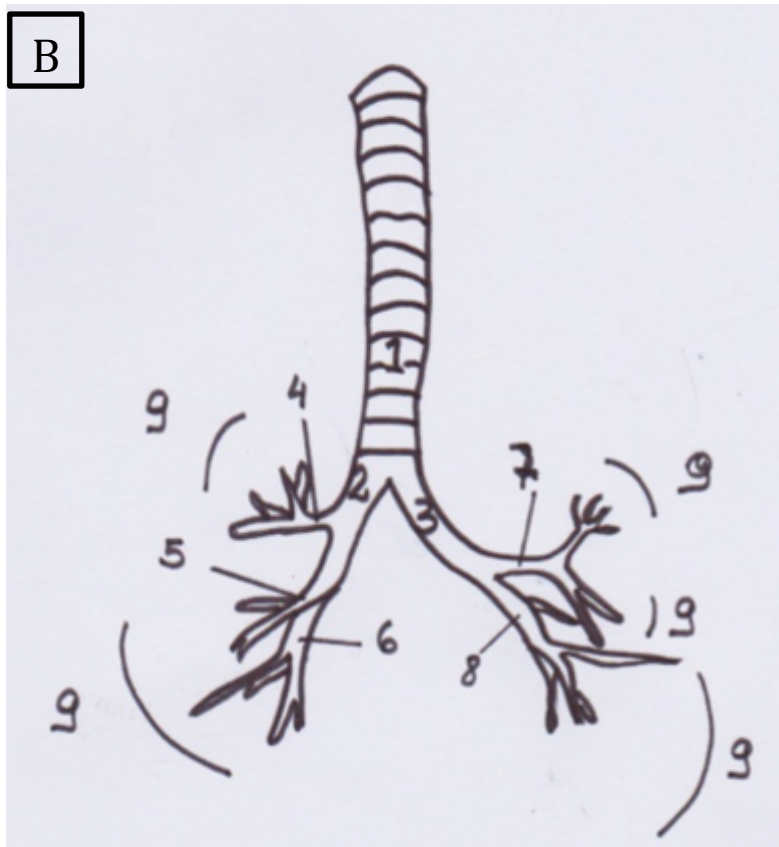
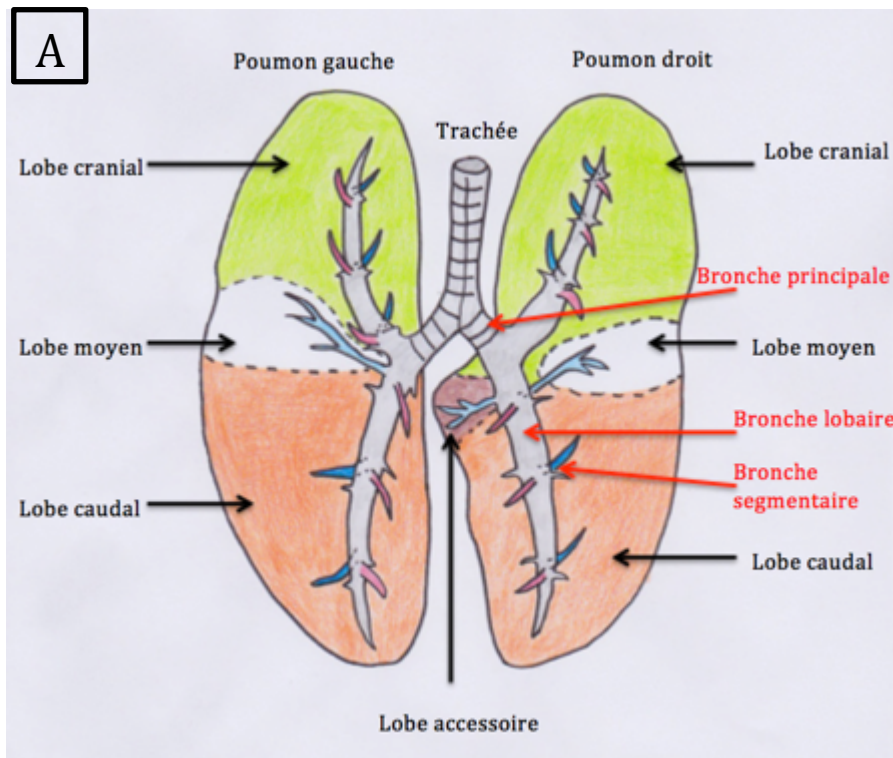


Figure 4 : Organisation de l'arbre bronchique. A : Lobation pulmonaire et organisation de l'arbre bronchique des mammifères excepté l'homme ; B : Organisation de l'arbre bronchique chez l'homme (d'après (39))(1) Trachée ; (2) Bronche principale droite ; (3) Bronche principale gauche ; (4) Bronche lobaire craniale droite ; (5) Bronche lobaire moyenne droite ; (6) Bronche lobaire caudale droite ; (7) Bronche lobaire craniale gauche ; (8) Bronche lobaire caudale gauche ; (9) Bronches segmentaires.

Les bronches **principales** et lobaires ont une **structure similaire** à celle de la **trachée** sauf qu'elles présentent un **anneau complet de cartilage**. Les bronches **segmentaires** ne présentent plus un épithélium pseudostratifié cilié comme celui de la trachée mais un **épithélium cylindrique cilié**. L'épithélium contient de moins en moins de cellules caliciformes avec la diminution du diamètre des bronches. À la **jonction entre la muqueuse et la sous muqueuse**, il existe une couche épaisse de cellules musculaires lisses, appelée **muscle de Reissessen**, qui permet la **contraction** des bronches en cas **d'irritation**. La sous-muqueuse contient de moins en moins de glandes séro-muqueuses avec la diminution du calibre des bronches (Figure 5) (Figure 8). Les dernières subdivisions n'en contiennent plus sauf chez le chat.

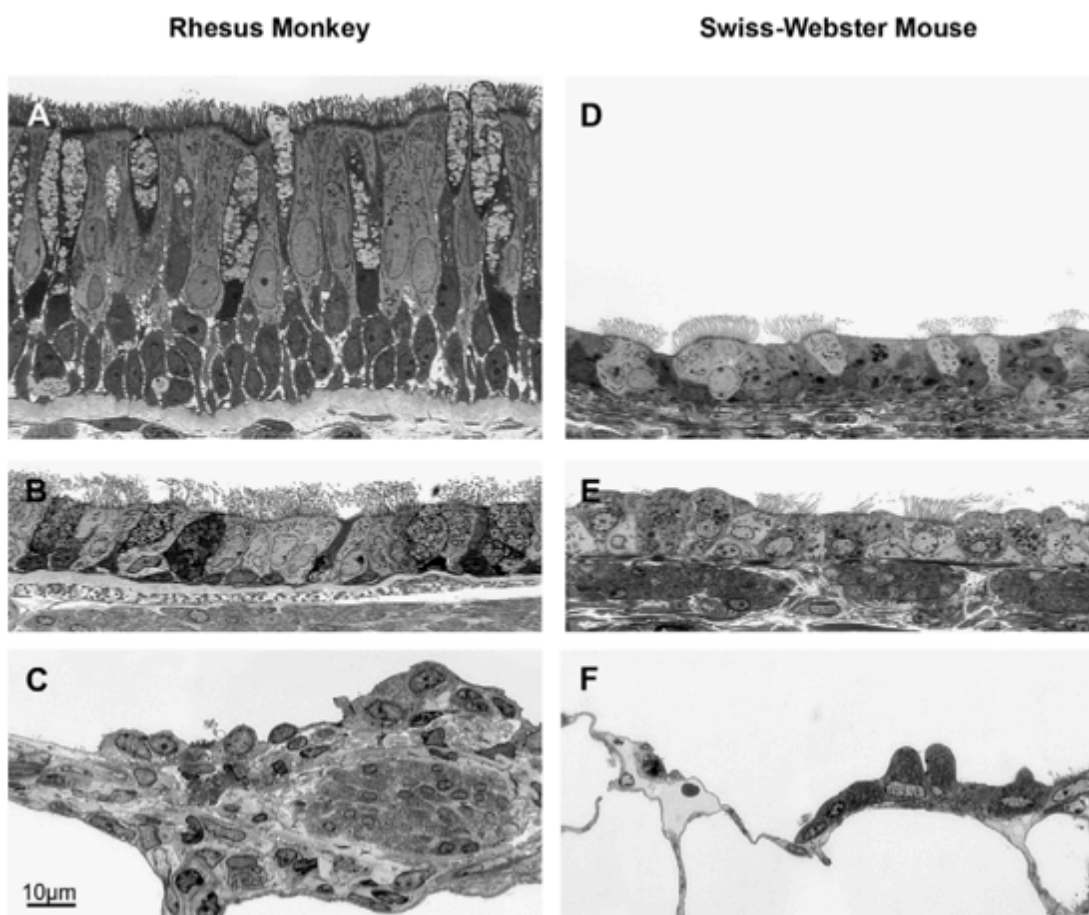


Figure 5: Comparaison de l'organisation cellulaire de différents étages de l'appareil respiratoire entre singe et souris (d'après (40)). (A et D trachée, B et E bronches principales, C et F bronchioles) d'un singe rhésus mâle (A à C) et d'une souris Swiss Webster mâle (D à F) L'épithélium est plus complexe et plus haut dans les premières voies respiratoires chez le singe par rapport à la souris. Le muscle lisse occupe une plus grande partie de l'interstitium chez le singe par rapport à la souris à tous les étages. Coloration bleu de toluidine.

1.2.3. Les bronchioles et les sacs alvéolaires.

Les bronchioles font suite aux bronches et sont les derniers éléments conducteurs de l'air avant qu'il n'arrive dans les canaux alvéolaires qui s'ouvrent sur les sacs alvéolaires où ont lieu les échanges gazeux. On distingue les **bronchioles**, les **bronchioles terminales** puis **respiratoires**. Au fur et à mesure de cette dichotomie, le diamètre des différentes structures diminue, pour atteindre environ 0,5 mm au niveau des bronchioles respiratoires (5). Chaque bronchiole respiratoire engendre **entre deux et dix canaux alvéolaires**. Les sacs alvéolaires sont les **terminaisons aveugles** (cul de sac alvéolaire) dans lesquelles se trouve la **barrière air-sang** permettant les échanges gazeux. Chez l'homme, le nombre d'alvéoles est estimé à 150 millions par poumon et leur diamètre varie de 100 à 300 µm selon les mouvements respiratoires.

Dans les bronchioles, la paroi est plus mince et l'épithélium devient **cubique, simple, cilié**, sans cellule caliciforme, la sous muqueuse ne contient plus ni cartilage ni glande. Le **muscle bronchique** est très développé et sa contraction peut occlure complètement la lumière de la bronchiole. Les **Cellules Club** apparaissent à l'étage bronchiolaire et deviennent de plus en plus nombreuses au fur et à mesure des divisions de l'arbre aérifère. Chez l'homme, elles représentent 11% des cellules de l'épithélium des bronchioles terminales et 22% de celui des bronchioles respiratoires (41) (Figure 5, Figure 8). Les cellules Club contiennent de nombreuses vésicules de sécrétion et interviennent dans la production d'une partie du **surfactant** (notamment les protéines du surfactant -A, -B et -D). Les cellules Club sont des cellules **non ciliées** qui présentent un dôme au pôle apical qui fait protrusion dans la lumière des bronchioles. Leur noyau se trouve au pôle basal. Elles contiennent de **nombreuses vésicules de sécrétion** et mitochondries, ainsi qu'un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi développés. Toutes ces structures sont le signe d'une **intense synthèse protéique** et de leur excrétion à l'extérieur de la cellule, dans la lumière des bronchioles (Figure 6). Les cellules Club expriment la protéine SCGB1A1 : une protéine de 10 kDa qui leur est spécifique et qui permet de les distinguer par immunohistochimie, des protéines à **action pro ou anti-inflammatoire**, des **protéases**, des **peptides anti microbiens**, les **protéines A, B et D du surfactant** qui tapissent l'épithélium des voies respiratoires profondes (42). Elles participent à la **biotransformation** de nombreux composés toxiques et dangereux introduits dans les poumons par l'air inhalé grâce au cytochrome P450 et aux mono-oxygénases ; notamment, le furane, les hydrocarbures, le naphthalène, la fumée du tabac et de nombreuses autres substances (43). Enfin, les cellules Club interviennent dans le **renouvellement** de l'épithélium, aussi bien en cellules Club qu'en cellules épithéliales ciliées, en pneumocytes de type I ou II (42). La contribution de ces cellules à la prolifération cellulaire est de 15 % dans les bronchioles terminales et de 44% dans les bronchioles respiratoires, chez l'homme (41). Le signal qui stimule leur différenciation, lors de la régénération physiologique ou bien d'attaque de l'épithélium bronchiolaire, est la cadhérine E (44).

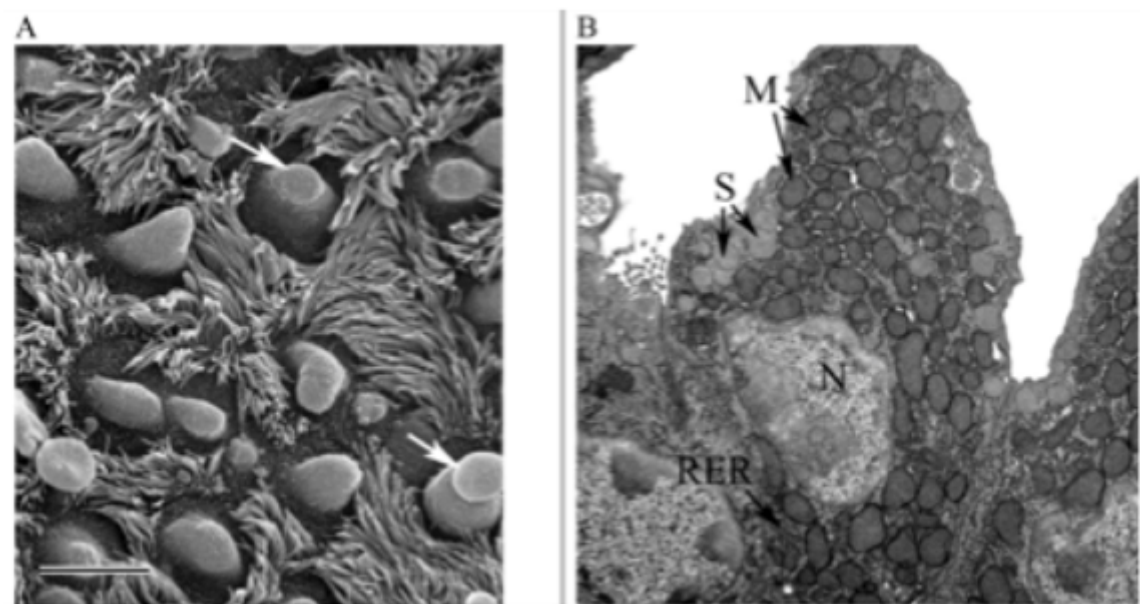


Figure 6 : Cellules Club observées au microscope électronique (d'après (42)). A: Épithélium d'une bronche principal de rat observé au microscope électronique à balayage montrant des cellules Club (flèches blanches) entourées de cellules ciliées. B: Cellule Club d'une bronchiole terminale observée au microscope électronique à transmission révélant de nombreuses mitochondries (M), des granules de sécrétion (S), le réticulum endoplasmique granuleux (RER) et le noyau en position basale (N).

Les canaux alvéolaires sont formés de **tissu conjonctif** constitué de fibres de **collagène** ou **élastiques** et de quelques **cellules musculaires lisses**.

Dans les alvéoles, on trouve un **épithélium spécifique, très fin** dont l'épaisseur ne dépasse pas 250 nm, constitué de **pneumocytes de type I et de type II**. La surface de cet épithélium est recouverte de **surfactant**. La transition entre l'épithélium des bronchioles respiratoires et celui des alvéoles est abrupte. De plus, Il existe une très fine couche aqueuse comprise entre le surfactant et l'épithélium alvéolaire, appelée **hypophase**. Ce sont les pneumocytes II qui sont responsables de la régulation de l'hypophase, notamment sa concentration en Ca^{2+} et son pH. Elle est considérée comme un milieu de réaction pour les processus biochimiques extracellulaires, notamment les modifications extracellulaires du surfactant (45). Les pneumocytes de type I sont de grandes **cellules aplaties** qui constituent la barrière alvéolo-capillaire **très fine** (46). Elles sont liées entre elles par des jonctions serrées, et représentent **95 % de la surface** de l'épithélium alvéolaire mais seulement 40% des cellules de cet épithélium. Elles contiennent très peu voire aucun organite autre que le noyau, ce qui permet de maintenir leur extrême finesse. On considère qu'elles se différencient à partir des pneumocytes II. La membrane basale liant les pneumocytes I de l'épithélium alvéolaire et la cellule endothéliale des capillaires est très fine, ce qui permet de réduire l'épaisseur des septum alvéolaire et favorise ainsi la diffusion rapide de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Les pneumocytes II ont une durée de vie d'environ 120 jours. Il constituent les 60 % de cellules restantes mais ne représentent **que 5 % de la surface de l'épithélium**. Ce sont des cellules **cuboïdes**. Elles synthétisent et sécrètent le **surfactant** qui permet

de diminuer la **tension superficielle** et évite le collapsus des alvéoles lors de l'expiration, ainsi que des molécules permettant la défense de l'épithélium alvéolaire : lysozyme, plasmalogène, cathepsine H (45). Ainsi, contrairement aux pneumocytes de type I, elles contiennent de **nombreux organites** (mitochondries, réticulum endoplasmique granuleux, appareil de golgi, vésicules de sécrétion) en lien avec leur intense **activité métabolique**. Ces cellules ont un potentiel de prolifération, ce sont les **cellules souches de l'épithélium alvéolaire**. En effet, ils peuvent servir de cellule progénitrice pour les pneumocytes I selon les signaux opposés donnés par le Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) et le BMP (47). De plus, ces cellules interviennent dans le transport de Na^+ et jouent ainsi un rôle dans l'homéostasie des fluides alvéolaires. Il existe des pompes Na^+/K^+ ATP dépendantes et des canaux Na^+ , qui permettent de créer un gradient osmotique utile pour la réabsorption des fluides, ce qui contribue à maintenir un environnement relativement sec dans les alvéoles (48).

Entre deux alvéoles, se trouve un **septum inter-alvéolaire** dans lequel se trouvent les **capillaires sanguins** qui permettent les **échanges air-sang**. Il s'agit du réseau capillaire le plus riche de tout le corps. La barrière de diffusion air-sang mesure $0,2 \mu\text{m}$ et est constituée du surfactant, de l'hypophase, de l'épithélium alvéolaire (pneumocytes I), d'une très fine membrane basale et du cytoplasme des cellules endothéliales des capillaires sanguins. Le transport des substances au travers des cellules endothéliales se fait par diffusion simple, par des vésicules ou bien par passage entre les cellules. Ces cellules endothéliales doivent être très fines pour permettre les échanges gazeux entre les alvéoles et le sang mais également suffisamment résistantes pour supporter une augmentation de la pression artérielle pulmonaire durant un exercice physique intense par exemple. Cette résistance est permise par la lame basale qui lie la cellule endothéliale à la cellule de l'épithélium alvéolaire adjacente (Figure 7, Figure 8) (49).

Les capillaires sanguins qui irriguent les alvéoles sont issus des artérioles pulmonaires. Enfin, quelques **macrophages** sont libres dans les alvéoles, ils permettent de lutter contre les bactéries et les particules inhalées. Ils dérivent des monocytes sanguins qui ont passé la barrière alvéolo-capillaires.

Les alvéoles ont une forme polygonale lors de l'inspiration et sont ondulées voire recroquevillées lors de l'expiration (49). L'interstitium alvéolaire représente la partie la plus épaisse de la paroi alvéolaire, il contient des fibroblastes, du collagène et des fibres élastiques. Il contient très peu de fluides interstitiels car la pression oncotique des capillaires alvéolaires est très élevée afin de maintenir ces fluides interstitiels au minimum et conserver une barrière alvéolo-capillaire la plus fine possible (49).

Le surfactant est constitué de 90 % de phospholipides, majoritairement des acides gras saturés et de 10 % de protéines dont les protéines A, B, C et D du surfactant. Le surfactant constitue une fine couche qui recouvre la surface alvéolaire. Il permet la

régulation de la **tension superficielle**, évitant que les surfaces n'adhèrent l'une à l'autre lors d'un **collapsus**, le blocage du passage de fluides au travers de la barrière alvéolo-capillaire contribuant à **éviter les oedèmes** et la **défense** de l'alvéole grâce aux protéines A et D, des collectines, qui peuvent adhérer à la surface de différents pathogènes et agir comme des opsonines, facilitant l'élimination par les macrophages alvéolaires (45). Les composants du surfactant sont synthétisés, puis stockés dans des organites spécifiques dans les pneumocytes II, appelés corps lamellaires, avant d'être exocytés. L'exocytose est régulée par différents stimuli, mécaniques ou chimiques. Ces composants sont recyclés par les pneumocytes II, ainsi chaque composant est réutilisé plusieurs fois pour synthétiser du surfactant avant d'être éliminé par les macrophages alvéolaires (45).

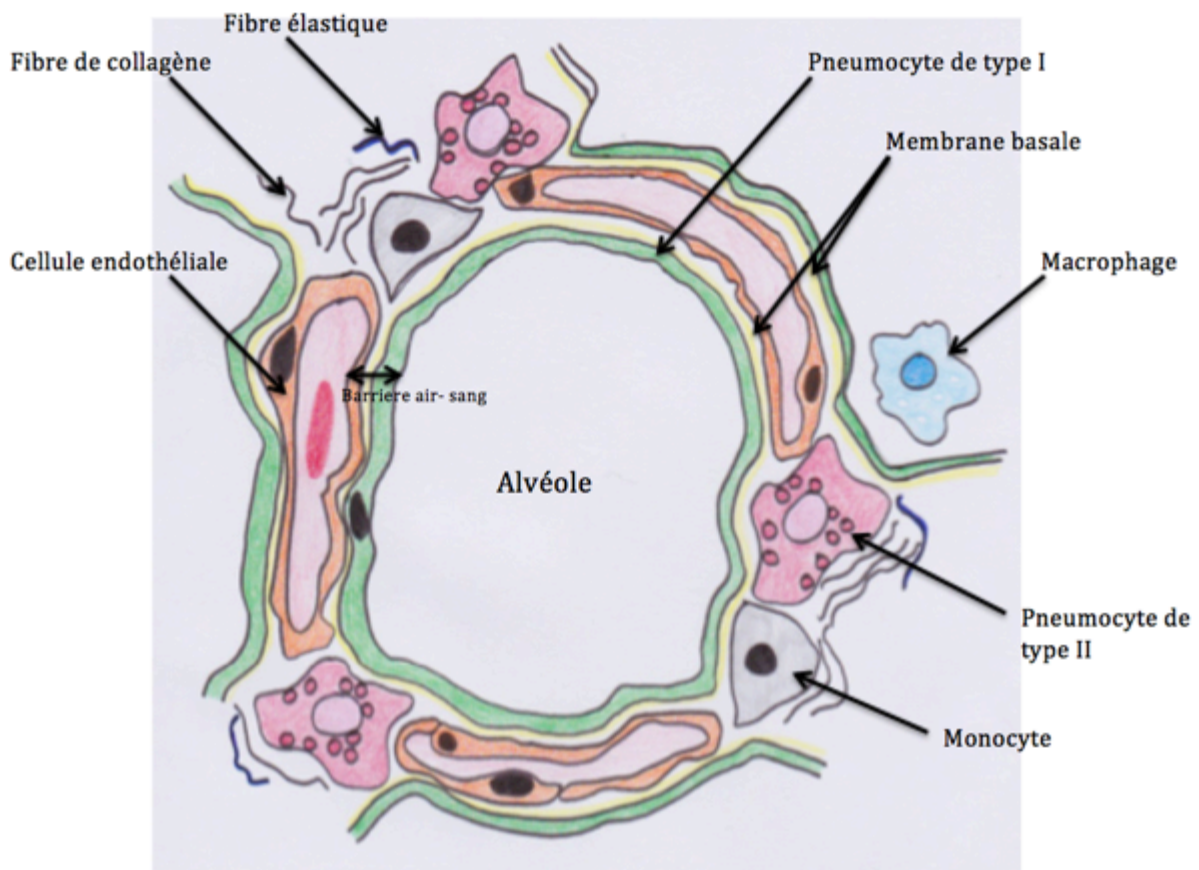


Figure 7: Schéma de l'organisation cellulaire d'une alvéole

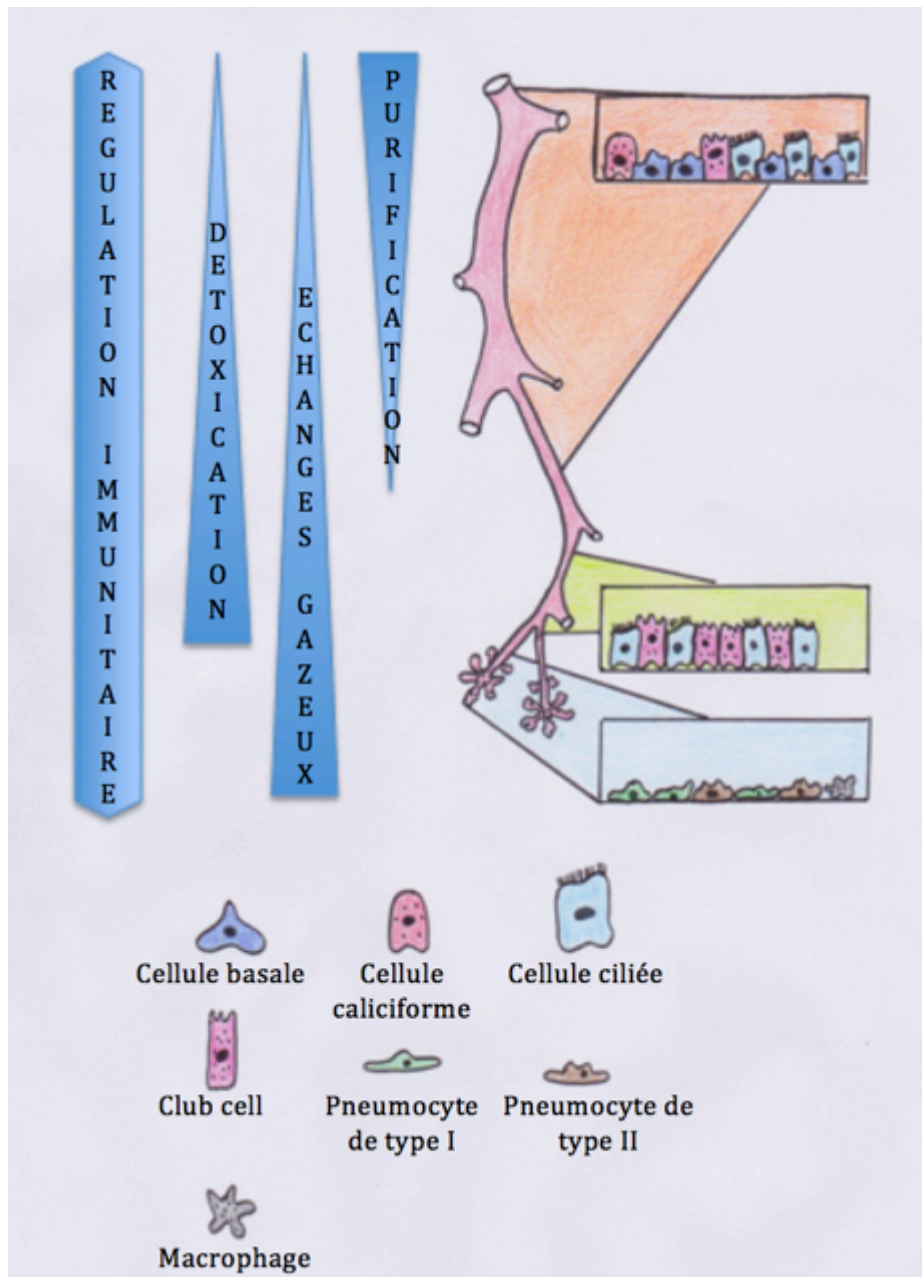


Figure 8: Composition cellulaire et fonctions de l'épithélium des différentes régions du poumon (d'après (44))

Ainsi l'appareil respiratoire profond est composé de nombreux types cellulaires très différenciés qui présentent chacun des rôles précis indispensables à la fonction respiratoire. Cependant, malgré cette différenciation poussée, il semble que certaines de ces cellules soient douées d'une capacité de dédifférenciation, ce qui laisse entrevoir des possibilités de régénération pulmonaire pouvant servir à l'élaboration d'un modèle tridimensionnel de cet organe.

1.3. PHYSIOLOGIE DU POUMON.

1.3.1. La mécanique respiratoire

Le cycle respiratoire est constitué de deux phases : **l'inspiration**, suivie de **l'expiration**. La capacité à faire entrer l'air dans les poumons lors de l'inspiration et à l'en faire ressortir lors de l'expiration repose sur le **gradient de pression** entre la pression atmosphérique et la pression intrapulmonaire (Figure 9).

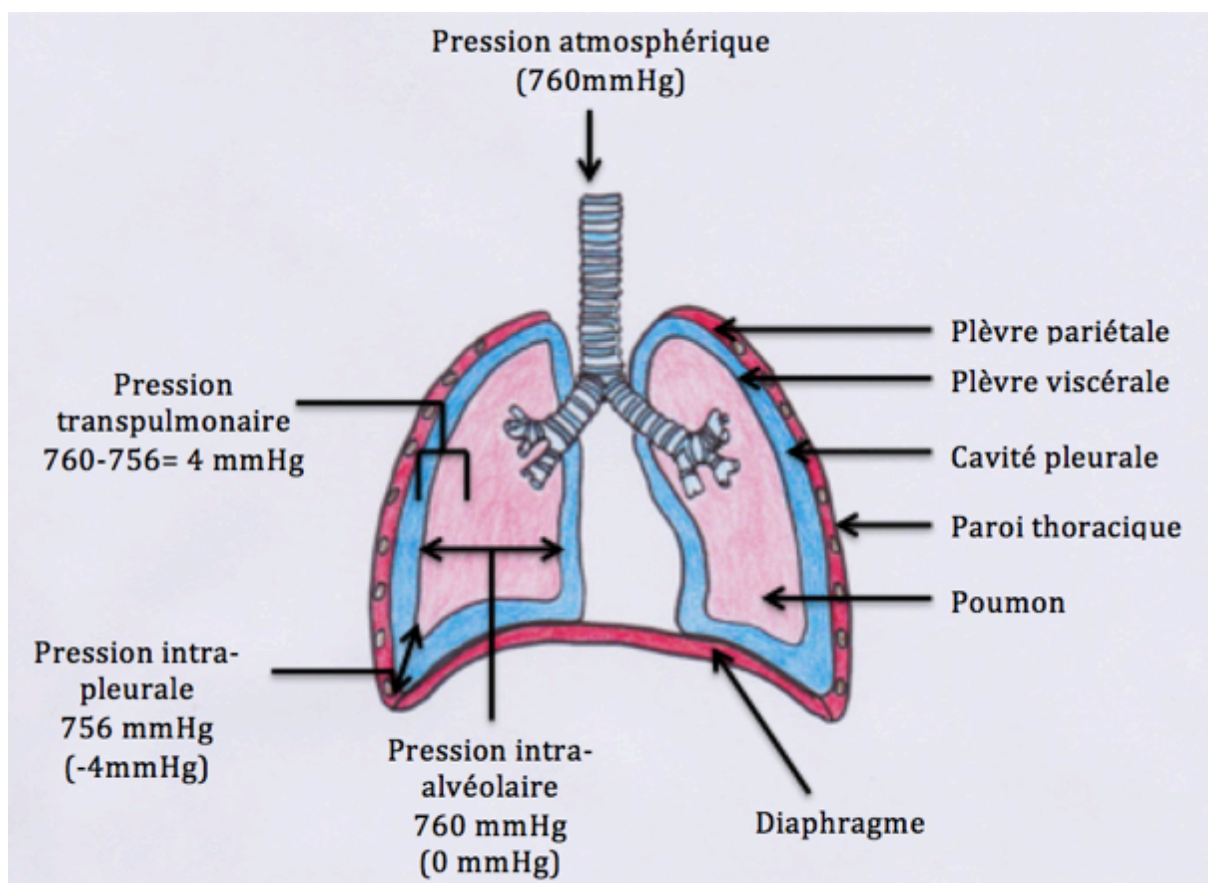


Figure 9: Relation entre la pression intrapulmonaire et la pression intrapleurale. La pression alvéolaire change selon les différentes phases du cycle.

Les poumons sont liés aux parois thoraciques par les **plèvres**, leur permettant de suivre les mouvements et les modifications de volume du thorax. La contraction et le relâchement du **diaphragme** et des muscles du thorax, notamment les **muscles intercostaux**, permettent de créer des modifications de la pression de l'air dans les poumons et ainsi d'assurer le cycle respiratoire. Lors de l'inspiration, le diaphragme se contracte, ce qui provoque son abaissement, le volume thoracique augmente et la pression intra-pulmonaire diminue et devient inférieure à la pression atmosphérique, permettant l'entrée d'air dans les voies respiratoires. C'est l'inverse qui se produit lors de l'expiration. L'expiration est donc la phase passive du cycle respiratoire alors que l'inspiration est dite active (Figure 10).

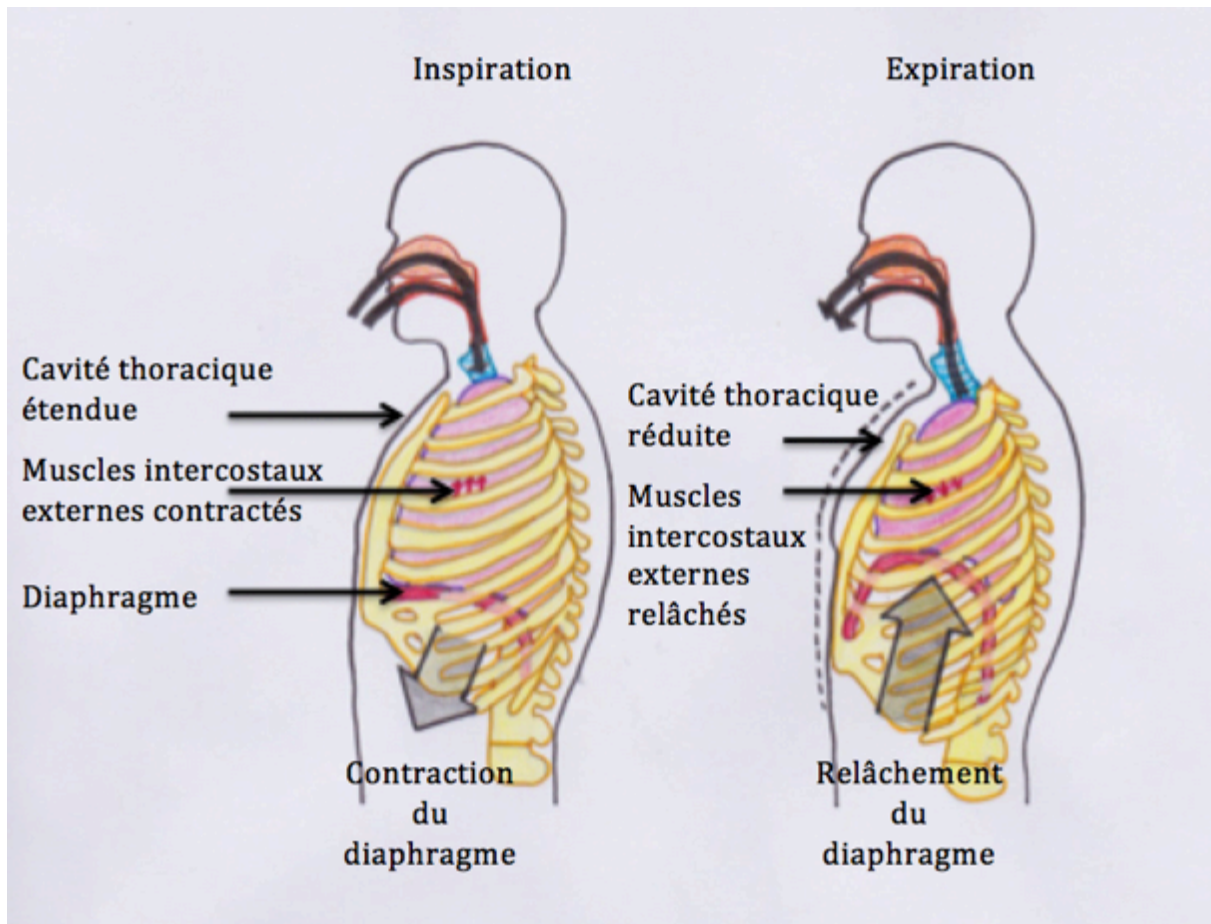


Figure 10: Inspiration et Expiration. L'inspiration et l'expiration se produisent grâce à l'expansion et à la contraction de la cavité thoracique, respectivement

Le **volume courant** correspond au volume total inspiré et expiré (450 à 500 ml chez l'homme). L'espace mort anatomique correspond aux régions de l'appareil respiratoire où aucun échange gazeux ne peut avoir lieu, c'est-à-dire les voies de conduction de l'air, depuis les ouvertures nasales et buccales jusqu'aux bronchioles des deux poumons (150 ml chez l'homme). Il faut donc que les **voies conductrices ne soient pas trop étroites pour limiter les résistances et les turbulences mais pas trop larges pour limiter l'espace mort** anatomique. Ainsi, le volume d'air qui atteint les alvéoles est le volume courant inspiratoire moins l'espace mort anatomique ; chez l'homme, il est de 300ml. En multipliant ce volume par la fréquence respiratoire, on obtient la ventilation alvéolaire. L'espace mort total correspond à l'espace mort anatomique plus l'espace mort alvéolaire. Ce dernier correspond aux alvéoles qui ne sont pas desservies par des capillaires ou bien aux alvéoles qui sont obstruées. Cet espace mort augmente si de nombreux capillaires sont endommagés ou détruits par une pathologie comme l'emphysème (49).

On définit également la **compliance** qui est un paramètre primordial pour l'efficacité du cycle respiratoire. Elle correspond à l'inverse de la rigidité et reflète la **capacité d'extension du poumon**. Elle est mesurée par la pression nécessaire pour gonfler un poumon jusqu'à un volume donné. La principale origine d'une diminution de la compliance pulmonaire est une **destruction des fibres élastiques** dans la paroi alvéolaire et leur remplacement par du **tissu fibreux cicatriciel**. Une diminution de la compliance augmente le **coût énergétique** de la respiration et diminue la **ventilation alvéolaire**, ce qui entraîne une modification du ratio **ventilation/perfusion**. Les oedèmes pulmonaires, les spasmes bronchiques ou encore les maladies obstructives pulmonaires chroniques sont responsables d'une diminution de la compliance (49).

Afin que la respiration soit efficace il convient que l'écoulement de l'air dans les voies respiratoires soit **laminaire**. L'écoulement devient turbulent seulement en cas d'hyperpnée (comme lors d'un exercice physique important) et seulement dans la trachée et dans les premières générations de bronches. Des tourbillons peuvent également apparaître lorsque la paroi est irrégulière à cause d'une accumulation de mucus ou une cicatrice par exemple. Dans le cas où les zones de turbulences et de tourbillons seraient étendues (inflammation diffuse de la muqueuse par exemple menant à une obstruction des voies conductrices de l'air et à de la dyspnée), des hauts gradients de pression seraient nécessaires pour maintenir le flux d'air et provoqueraient une augmentation du coût énergétique de la respiration. Des turbulences dans le flux d'air entraînent des vibrations et donc des sons qui peuvent être entendus lors de l'auscultation pulmonaire (crépitements, sifflements)(49).

Le **surfactant** est aussi un paramètre primordial dans la mécanique du cycle respiratoire, il est indispensable pour éviter le collapsus des alvéoles et limiter le coût énergétique de la respiration. La tension superficielle est la tendance pour une interface air-liquide à se réduire à une surface minimum. La force exercée par la tension superficielle d'un film de liquide dans une sphère est directement proportionnelle à la tension superficielle de ce liquide spécifiquement et est inversement proportionnelle au rayon de la sphère considérée. Ainsi, pour un même film liquide, plus le rayon de la sphère est petit plus la force de tension superficielle sera importante. Les alvéoles des mammifères peuvent être rapportées à de petites sphères tapissées par une fine couche de surfactant. Elles développent donc une force de tension superficielle importante, ce qui crée des problèmes fonctionnels. En moyenne, un homme réalise 15000 mouvements respiratoires par jour, et autant d'expansions et rétractions du territoire alvéolaire, le coût énergétique pour vaincre la force de tension superficielle n'est donc pas négligeable. Le surfactant qui tapisse la surface des alvéoles permet de réduire largement ce coût énergétique. De plus, il permet également de réduire la filtration de fluides depuis le plasma vers la lumière alvéolaire. La force de tension superficielle favorise la filtration, ainsi, en diminuant cette force de tension superficielle, le surfactant réduit également la filtration. Il permet aussi de faciliter les transports de gaz entre le gaz et la phase liquide. Enfin il a des propriétés bactéricides qui contribuent à la défense

des alvéoles contre des invasions bactériennes. Environ les 2/3 de l'énergie nécessaire pour réaliser une expiration au repos sont fournies par les forces de tension superficielle présente dans les alvéoles, Le dernier tiers est fourni par retour élastique grâce aux fibres élastiques contenues dans le parenchyme pulmonaire.

Enfin, il existe une **ventilation collatérale** grâce à des canaux reliant certaines bronchioles aux alvéoles connectées à une autre bronchiole. Ceci permet qu'en cas de contraction ou d'obstruction d'une bronchiole, le territoire alvéolaire desservi par celle ci ne soit pas complètement inutile, ce qui pourrait porter atteinte à l'efficacité de la ventilation. De la fumée insufflée dans une bronche émerge par une autre bronche. Ces canaux ont un diamètre d'environ 30 μm , ce qui représente trois fois le diamètre des pores alvéolaires. Ils sont ouverts lorsque le muscle bronchique est contracté. Des grands mouvements d'air peuvent se produire *via* cette ventilation collatérale (49).

L'hypoxie et l'hypercapnie alvéolaire ont une action directe sur le muscle lisse des bronchioles, elles entraînent sa relaxation. Il existe donc un mécanisme d'autorégulation de la résistance des voies conductrices de l'air (49). Il existe également un mécanisme d'autorégulation qui fait intervenir des shunts des capillaires des alvéoles qui ne sont pas bien ventilées (49).

1.3.2. Les échanges gazeux

Les échanges gazeux ont lieu au niveau de la **barrière alvéolo-capillaire**, c'est à dire la partie où la paroi alvéolaire est réduite à son minimum. Les échanges gazeux ont lieu par **simple diffusion** au travers de ce tissu très fin. L'épaisseur à traverser seulement constituée d'un pneumocyte de type I, d'une cellule endothéliale et de la lame basale qui les lie. Les capillaires sont tellement fins que la couche de plasma qui accompagne les globules rouges est très mince et les érythrocytes doivent se déformer pour pouvoir passer. Ainsi leur surface est souvent en contact avec l'endothélium ce qui facilite encore les échanges (49).

La surface et la finesse de la barrière alvéolo-capillaire ainsi que le volume sanguin des capillaires pulmonaires permettent de déterminer le taux de diffusion de l'oxygène au travers de ces structures. Ces paramètres peuvent être mesurés pour obtenir une estimation de la capacité totale de diffusion de l'oxygène des poumons gauche et droit. La valeur obtenue est appelée capacité de diffusion de l'oxygène anatomique pulmonaire totale. Elle est exprimée par unité de masse corporelle. Cette valeur bien que théorique permet de révéler à quel point une espèce est structurellement adaptée pour les échanges gazeux et permet ainsi de comparer les espèces entre elles. Par exemple cette valeur est 10 % plus élevée chez le cheval que chez le chien, et celle du chien 50 % plus élevée que celle de la vache, celle de l'homme se rapproche des valeurs retrouvées chez les mammifères à activité physique réduite

comme la vache. Cette valeur peut devenir très important chez des animaux de très petite taille, par exemple, chez la musaraigne qui pèse environ 2,6 g, chez laquelle cette capacité est environ 50 % plus élevée que chez le cheval. La capacité la plus élevée est retrouvée chez les chauves-souris en rapport avec leur volume pulmonaire et leur surface alvéolaire extrêmement développés, ainsi que leur barrière alvéolo capillaire exceptionnellement fine. Cependant cette valeur n'est finalement jamais atteinte et correspond à la capacité de diffusion approchée lors d'un exercice physique extrêmement sévère. En pratique, les mesures physiologiques réalisées lors d'un exercice physique important représentent la moitié de la capacité anatomique estimée. On parle de capacité de diffusion physiologique qui correspond au volume d'oxygène qui diffuse depuis le gaz alvéolaire vers le sang pulmonaire par minute lorsque la différence de pression partielle en oxygène entre le gaz alvéolaire et le sang des capillaires pulmonaires est de 1 mmHg (49).

Dans les alvéoles, les pressions partielles deviennent celles du gaz alvéolaire. Les valeurs changent car le gaz alvéolaire n'est pas entièrement renouveler par de l'air frais à chaque inspiration à cause de l'espace mort anatomique et également parce que l'oxygène est constamment enlevé du gaz alvéolaire et du dioxyde de carbone y est ajouté (49).

Lors de la respiration au repos chez un homme, la pression partielle en oxygène (PO_2) dans le gaz alvéolaire est maintenue à 104 mmHg et celle du dioxyde de carbone (PCO_2) à 40 mmHg. Ces valeurs sont importantes à considérer dans la mesure où elles gouvernent la pression partielle de ces deux gaz dans le sang artériel. Le sang qui rejoint les capillaires alvéolaires à une PO_2 d'environ 40 mmHg et une PCO_2 d'environ 45 mmHg, puis l'équilibre se fait avec le gaz alvéolaire. Ainsi le sang qui quitte les capillaires alvéolaires a une PO_2 de 104 mmHg et une PCO_2 de 40 mmHg. Les mouvements de gaz dans les alvéoles se font uniquement par diffusion. La vitesse de mouvement du gaz est tellement importante et la distance entre les bronchioles et les parois alvéolaires tellement courte que les échanges gazeux au niveau de l'alvéole se font en une fraction de seconde. Le gradient de diffusion de l'oxygène au niveau de la barrière alvéolo capillaire est de 64 mmHg, celui du dioxyde de carbone est seulement de 5 mmHg mais ce gaz diffuse vingt fois plus rapidement que l'oxygène. Les échanges gazeux entre le gaz alvéolaires et les globules rouges sont terminés le temps que ceux-ci atteignent le premier tiers du capillaire. Tout le sang qui irrigue le poumon n'est pas destiné aux alvéoles, une partie du sang rejoint la circulation bronchique pour irriguer les muscles lisses et la plèvre viscérale entre autre. Ce sang n'est donc pas oxygéné au niveau de la barrière alvéolo-capillaire mais il rejoint quand même les veines pulmonaires et dilue le sang artériel qui vient d'être oxygéné. Ainsi le sang qui entre dans l'aorte avant d'être distribué dans la grande circulation n'a pas une PO_2 de 104 mmHg mais seulement de 95 mmHg (49) (Tableau II)

Tableau II: Pressions partielles de différents gaz composant l'air à plusieurs étages de l'appareil respiratoire chez l'homme

	Pression partielle (mmHg)				Pression totale (mmHg)
	Dioxygène	Dioxyde de carbone	eau	diazote	
Air sec au niveau de la mer	159,1	0,3	0	600,0	760
Entrée des voies respiratoires	149,2	0,3	47	563,5	760
Gaz alvéolaire	104	40	/	/	/
Sang afférent dans capillaire	40	45	/	/	/
Sang efférent dans capillaire	104	40	/	/	/

La structure des échanges gazeux est adaptée à la demande en oxygène de chacun et cette demande dépend particulièrement de la masse corporelle et de la consommation d'énergie.

Au cours de la respiration au repos, tous les capillaires ne sont pas perfusés, certains sont gardés en réserve. Ainsi, lors d'un exercice physique, les capillaires de réserve s'ouvrent et sont perfusés, les capillaires qui étaient déjà perfusés se dilatent d'avantage. On parle de recrutement capillaire. Et afin de maintenir le ratio ventilation/perfusion, il est nécessaire que la fréquence de la ventilation augmente. Dans de nombreuses atteintes des poumons, la ventilation et la perfusion sont « discordantes » (alvéole bien ventilée mais mal perfusée et inversement), ce qui impacte sérieusement la qualité des échanges gazeux et mène à une détresse respiratoire parfois sévère. Dans le cas d'un défaut de ventilation, le sang artériel qui rejoint la circulation systémique n'est pas correctement oxygéné car dilué par du sang veineux, ce qui entraîne une hypoxémie et une hypercapnie. Une déficience de ventilation peut provenir de l'obstruction d'une bronche ou d'une bronchiole causée par une quantité anormale de mucus ou un spasme bronchique par exemple. Si une alvéole est correctement ventilée mais pas perfusée, l'espace mort alvéolaire augmente, ce qui coûte de l'énergie car il y a mise en jeu de muscles respiratoires mais aucun apport d'oxygène supplémentaire ni de diminution du dioxyde de carbone sanguin. Ceci peut donc finalement mener aussi à une hypoxémie et une hypercapnie. Ce défaut de perfusion peut être due à une embolie pulmonaire ou bien à la destruction des parois alvéolaires comme lors d'emphysème alvéolaire. Cependant l'incompatibilité ventilation/perfusion existe également à l'état physiologique. En effet, certaines régions des poumons seront plus ou moins bien perfusées selon la posture du corps. Chez l'homme, en position debout, les lobes craniaux sont moins bien perfusés que les lobes

caudaux à cause de la gravité. De même, chez les quadrupèdes, la partie dorsale des poumons est moins bien perfusée que la partie ventrale. La modification de ce ratio à cause de la posture peut devenir problématique chez les quadrupèdes de grande taille comme les chevaux ou les bovins s'ils restent en décubitus latéral de manière prolongée, comme lors d'une anesthésie. Du fait de la gravité le poumon qui se trouve le plus bas est mieux perfusé mais du fait du poids important de l'animal ce poumon est atelectasié, d'où une hypoventilation. Le risque d'hypoxémie et d'hypercapnie est alors important. Malgré tout il existe des mécanismes de compensation, certains facteurs métaboliques permettent d'ajuster la perfusion des alvéoles en temps réel. Une faible pression partielle en O₂ dans une alvéole mal ventilée entraîne une vasoconstriction de l'artériole pulmonaire locale, la résistance à l'écoulement du sang augmente dans cette alvéole et le sang est alors redistribué dans les capillaires d'autres alvéoles mieux ventilées. Un système similaire d'autorégulation permet d'adapter la ventilation des alvéoles. Une pression partielle en CO₂ peu élevée (ie. Une mauvaise perfusion de l'alvéole) entraîne une contraction des muscles lisses des conduits alvéolaires, la compliance diminue et le gaz est redistribué dans des alvéoles mieux perfusées.

1.3.3. Défenses de l'arbre aérifère.

Le poumon est l'organe interne le plus exposé à **l'environnement extérieur**, notamment à des agents pathogènes, toxiques et nocifs. Le territoire broncho-alvéolaire est cependant capable de se défendre et de se protéger efficacement. Les mécanismes mis en place doivent être efficaces tout en limitant l'inflammation afin de maintenir l'homéostasie (50). Trois mécanismes principaux de défense sont décrits : **l'appareil muco-ciliaire**, les **jonctions intercellulaires** et la production de **peptides antimicrobiens**.

Dans les bronches, le **mucus** sécrété par les cellules glandulaires permet de tapisser l'épithélium et permet de protéger celui-ci des différents agents cités précédemment, ensuite **l'appareil muco-ciliaire** permet de faire remonter ces agents à la surface et des mécanismes de **toux** permettent de les expectorer ou de les avaler. Dans les alvéoles cette couche de mucus est inexistante car elle entraverait la diffusion des gaz au travers de la barrière alvéolo-capillaire. C'est donc un système de phagocytose qui intervient. Si un agent délétère parvient malgré tout à passer la couche de mucus qui recouvre l'épithélium bronchique ou échappe à la phagocytose alvéolaire, d'autres systèmes de défense interviennent, notamment, les mécanismes de défense immunitaire et non immunitaire (50).

L'appareil muco-ciliaire s'étend des **bronchioles** les plus petites jusqu'à l'entrée du **pharynx**. Cet appareil joue un rôle vital pour rejeter des particules inertes comme du carbone ou bien de l'amiante ou infectieuses, virus et bactéries. Ainsi toute particule qui rentre en contact avec la couche de mucus devrait y adhérer. Les mouvements de l'escalator muco-ciliaire permettent de les faire remonter jusqu'à

l'oropharynx. Il n'y a plus de production de mucus à partir des bronchioles jusqu'aux alvéoles, ainsi tous les territoires compris entre ces deux entités doivent compter principalement sur la phagocytose alvéolaire. Le mucus repose sur une couche d'eau produite par les cellules épithéliales sous-jacentes, la faible viscosité de cette couche permet aux cils de se mouvoir facilement et d'être efficaces pour faire remonter les particules le long des voies conductrices de l'air. Le mucus est sécrété par les cellules caliciformes et les glandes séro-muqueuses présentes dans la trachée et les bronches. Il est composé de 95 % **d'eau**, de protéines et de **mucine**, une glycoprotéine, qui lui confère sa viscosité et sa structure (50). En plus d'être une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'épithélium des voies pulmonaires, il limite le temps dont disposent les microorganismes pour adhérer, coloniser et pénétrer dans l'épithélium sous-jacent. Enfin, il contient quelques immunoglobulines: **IgG et IgA** et enzymes bactéricides : **lysozyme et lactoferrine** et des **inhibiteurs de protéases**, qui en font un environnement hostile pour les agents pathogènes. En effet le lysozyme est une enzyme qui a une action antimicrobienne sur un grand nombre de bactéries à Gram positif en dégradant leur couche de peptidoglycanes. La lactoferrine est un chélateur du fer, elle inhibe ainsi la croissance microbienne en séquestrant le fer qui est indispensable à leur développement. De plus elle permet de détériorer la membrane externe des bactéries à Gram négatif, découvrant ainsi leur couche de peptidoglycanes et rendant le lysozyme également efficace contre celles-ci. Enfin la lactoferrine joue aussi un rôle antiviral, efficace à la fois sur les virus à ARN et les virus à ADN. Elle interagit avec les glycosaminoglycanes et les intégrines de la membrane des cellules, empêchant ainsi les virus de s'y lier et de pénétrer dans les cellules (50). Enfin le mucus est imperméable, ce qui permet de prévenir la déshydratation de l'épithélium. La clairance muco-ciliaire dépend de la longueur des voies respiratoires et de la vitesse de mouvements, celle-ci est estimée à 5 mm/ min chez l'homme. En théorie une particule devrait rejoindre l'oropharynx en environ 40 minutes chez un mammifère de petite taille et en environ 3 heures et demi chez un animal de grande taille. La durée du renouvellement complet du mucus est estimée à 24 heures. Un agent pathogène doit donc mettre moins de temps que ça pour coloniser et pénétrer le tissu (51).

Dans l'épithélium des voies de conceptions, des jonctions serrées et adhérentes permettent d'assurer **l'imperméabilité** renforçant encore les mécanismes de défense de cette zone.

Le poumon apparaît finalement comme un organe complexe avec une diversité histologique capable de mettre en place des mécanismes de défenses locaux sans troubler son homéostasie afin d'assurer une fonction optimale.

Cette première partie a permis de présenter les mécanismes de formation de l'arbre respiratoire, ainsi que sa diversité histologique et ses principes de fonctionnement. Les maladies infectieuses de l'appareil respiratoire profond, la maladie obstructive chronique des voies respiratoires, le cancer du poumon et la tuberculose font partie des dix causes de mortalité les plus fréquentes dans le monde (52). Dès lors, l'élaboration de modèle d'étude du poumon pour mieux comprendre ces maladies et d'autres, développer des thérapies et même reconstruire des poumons pour envisager une transplantation se développe.

2. TECHNIQUE D'ÉLABORATION D'UN MODÈLE D'ÉTUDE DU TISSU PULMONAIRE

La création d'un modèle tridimensionnel (3D) pour un tissu ou un organe donné implique l'utilisation de **cellules adaptées** pour recréer le tissu en question, ces cellules doivent être capables de **proliférer** et de se **différencier**. Elle implique également de trouver un **support** adéquat sur lequel déposer et ensemençer les cellules sélectionnées ainsi qu'un **milieu** adapté où faire « vivre » ce tissu ou cet organe. Dans cette partie nous allons donc décrire les différentes étapes nécessaires à l'obtention d'un modèle tridimensionnel.

2.1. LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES DISPONIBLES ET UTILISABLES

Pour être fonctionnel *in vivo*, un poumon artificiel doit contenir les cellules spécifiques de cet organe, doit avoir l'organisation spécifique de l'arbre aérifère ainsi que la micro-perfusion associée, et doit aussi fournir une barrière air-sang qui autorise les échanges gazeux dans les conditions de pressions physiologiques (53). La récente utilisation des cellules souches pour créer des organoïdes a permis une réelle avancée dans la réalisation d'organogénèse *in vitro* de différents tissus et notamment du poumon (54).

Les cellules utilisées peuvent être des **cellules souches embryonnaires**, **foétales** ou **adultes**, des cellules **autologues** du patient ou bien des **cellules souches pluripotentes induites** (55).

2.1.1. Cellules souches et progénitrices adultes

Les cellules souches et progénitrices adultes sont les cellules **différenciées** présentes dans les **tissus spécialisés**. Ce sont des cellules **multipotentes**, elles peuvent donc se différencier en différents types cellulaires mais elles possèdent des capacités **de régénération limitées**. Physiologiquement, elles assurent le **remplacement des cellules mortes** et contribuent donc à **l'homéostasie** de l'organe. Elles sont le plus souvent regroupées dans des zones de l'organe appelées « niches », une modification de la niche entraîne l'activation de ces cellules. Elles ont l'intérêt **de pouvoir être isolées du patient lui-même**, ce qui permet d'éviter les réactions de rejet (56).

Les cellules souches et progénitrices du poumon adulte sont donc celles qui assurent la **régénération et la réparation du poumon** déjà abordées précédemment. Elles regroupent les **cellules basales**, les **cellules Club**, les **CSBA** et les **pneumocytes de type II** (Tableau III).

Les cellules progénitrices adultes déjà présentes dans le poumon semblent être une source intéressante de cellules à utiliser pour l'organogénèse *in vitro* mais elles sont souvent difficiles à isoler.

Tableau III: Cellules souches et progénitrices du poumon adulte capables de produire un organoïde chez l'homme et chez la souris (56).

Localisation	Type cellulaire	Marqueurs spécifiques permettant de les isoler	Capacité de différenciation des les organoïdes
Région trachéo-bronchique	Cellules basales	<ul style="list-style-type: none"> • Krt5⁺, Ngfr⁺Itgα6⁺, GSIβ4⁺ (souris) <ul style="list-style-type: none"> • Ngfr⁺Itgα6⁺ (humain) • Ngfr⁺CD166⁺CD44⁺ (humain) 	Cellules basales
			Cellules Club
Région bronchiolaire	Cellules Club	<ul style="list-style-type: none"> • Scgb1a1⁺ (souris) 	Cellules caliciformes
			Cellules ciliées
			Pneumocytes II
Région alvéolaire	Cellules souches bronchoalvéolaires	<ul style="list-style-type: none"> • EpCAM^{hi}Itgα6⁺β4⁺CD24^{low} (souris) 	Cellules caliciformes
		<ul style="list-style-type: none"> • CD45⁻CD31⁻CD34⁻ (Lin⁻) Sca-1^{low} (souris) 	Cellules ciliées
		<ul style="list-style-type: none"> • EpCAM⁺CD24^{low}Sftpc-GFP^{neg/low} (souris) <ul style="list-style-type: none"> • EpCAM⁺Sca1⁺ (souris) 	Pneumocytes II
		<ul style="list-style-type: none"> • Sftpc⁺ (souris) 	Pneumocytes II
	Pneumocytes II	<ul style="list-style-type: none"> • EpCAM⁺Sca1⁻CD24⁻Sftpc-GFP^{hi} (souris) <ul style="list-style-type: none"> • EpCAM⁺Sca1⁻ (souris) • EpCAM⁺HTII-280⁺ (humain) 	Pneumocytes I

In vivo, les cellules progénitrices adultes interagissent avec leur **environnement**. Les niches, dans lesquelles elles se trouvent, comprennent des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes. Ces cellules interagissent avec les cellules progénitrices *via* des signaux paracrines, juxtacrines et autocrines. De plus des molécules présentes dans la matrice extracellulaire comme le collagène, la laminine ou la fibronectine interviennent aussi dans ces interactions (57). L'utilisation d'un substitut synthétique de matrice extracellulaire, le « Matrigel™ », dans les systèmes de culture 3D a permis de progresser dans la manipulation et caractérisation de ces cellules (57). La culture de ces cellules *in vitro* a d'ailleurs mis en évidence qu'un contact physique entre les cellules progénitrices et les fibroblastes est essentiel pour leur prolifération et leur différenciation (24). L'expression des différentes FGF et de leur récepteur est aussi nécessaire pour l'activation et pour la différenciation des cellules progénitrices (57).

2.1.2. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires proviennent de la partie interne de la masse cellulaire du stade blastula en cours du développement embryonnaire. Ce sont des cellules de petite taille (environ 2 à 3 μm) dotées d'un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et capables d'adhérer à un support, tout en formant des colonies (58). Elles sont **capables de se différencier en n'importe quel type cellulaire** d'origine endodermique, ectodermique ou mésodermique. Différents facteurs de transcription responsables de leur **pluripotence** ont été identifiés, notamment OCT3/4 (Octamer 3 et 4) et SOX2 (59). Ces cellules sont cultivées sur des milieux spécifiques enrichis en facteur de croissance afin de maintenir leur capacité à proliférer et leur pluripotence. Les cellules souches embryonnaires humaines sont donc capables de se différencier en cellules de l'épithélium bronchique ou bien en pneumocytes de type II par exemple (60). Ainsi, un poumon décellularisé promeut la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules des lignées épithéliale et endothéliale (60) (61). Finalement, **les poumons décellularisés favorisent aussi la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules différenciées spécifiques du poumon et ils peuvent donc être recellularisés par celles-ci (60)**.

Les cellules souches embryonnaires peuvent être obtenues à partir d'embryons congelés issus d'une fécondation *in vitro*, en dehors d'un projet parental, ou si l'embryon obtenu ne présente pas une qualité suffisante ou des anomalies génétiques détectées avant l'implantation. Enfin elles peuvent être issues d'embryons après fécondation *in vitro* spécialement développées pour la recherche. Ce dernier type d'obtention de cellules souches embryonnaires est interdit en France notamment. Par ailleurs quelque soit leur origine d'obtention, leur utilisation pose des questions éthiques. Leur prélèvement nécessite la destruction d'un embryon et donc d'une probable vie humaine.

2.1.3. Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses ont une certaine capacité à **s'auto-renouveler et à se différencier en des types cellulaires très variés**, notamment selon les **conditions environnementales** qui leur sont imposées. Elles représentent une faible proportion des cellules de la moelle osseuse, du placenta, du liquide synovial ou encore de la pulpe dentaire. Elles n'ont pas de marqueurs spécifiques mais elles ont été définies comme des cellules capables d'adhérer au plastique lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de culture standard. Elles expriment les protéines de surface CD75, CD90, et CD105 et n'expriment pas CD34, CD45, HLA-DR, ou CD11b, CD19 et sont capables de se différencier en différents types cellulaires. Leur capacité de différenciation et de multiplication est donneur-dépendante. Celle-ci diminue selon l'âge et la pathologie du donneur. (62).

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse font parties des cellules souches les plus étudiées. Elles sont décrites comme des cellules adhérentes ressemblant à des fibroblastes avec des propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation (63). Elles sont libérées dans la circulation sanguine en cas de stimuli inflammatoire et facilitent la réparation et la guérison lors de processus inflammatoire.

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent aussi être obtenues à partir de sang ombilical. Ces cellules pourraient être une alternative intéressante à l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse et des cellules souches embryonnaires dans la régénération des poumons lésés (64). Ces cellules sont facilement obtenues immédiatement après une naissance à partir du placenta et du cordon ombilical. Elles sont isolées puis maintenues sur différents supports comme l'épithélium trachéal de souris ou l'épithélium des petites voies respiratoires ou sur des milieux connus pour favoriser la croissance et la différenciation de l'épithélium alvéolaire, pendant une, deux ou quatre semaines. Les cellules souches mésenchymateuses issues du sang ombilical expriment la protéine SCGB1A1 sécrétée par les cellules Club après avoir été cultivées sur un milieu de croissance spécifique des voies respiratoires. Ces cellules peuvent ensuite être inoculées à des souris immunotolérantes ayant subi des lésions pulmonaires par irradiation et **s'implanter sur l'épithélium des voies respiratoires et des alvéoles**. Les cellules inoculées ne sont plus détectées dans les poumons sur le long terme, mais l'utilisation de modèles de souris avec des lésions pulmonaires plus importantes pourrait s'avérer intéressante car la prise de la greffe devrait augmenter avec un modèle lésionnel plus prononcé. Néanmoins les mécanismes par lesquels les cellules souches mésenchymateuses migrent spécifiquement vers les poumons et acquièrent certaines caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules de cet organe sont encore inconnus. Une autre étude montre que ces cellules **peuvent exprimer les marqueurs phénotypiques des pneumocytes de type II in vitro** (65).

Enfin, des cellules souches mésenchymateuses **d'origine pulmonaire** ont également été isolées et seraient capables de se différencier en cellules de l'épithélium pulmonaire (66). Une co-culture de cellules souches mésenchymateuses d'origine pulmonaire et de pneumocytes de type II sur une durée relativement longue (au moins 14 jours) montre le développement de l'expression de marqueurs épithéliaux à la surface des cellules souches mésenchymateuses, ainsi que l'acquisition d'une forme cuboïde caractéristique des pneumocytes de type II. Cette différenciation est uniquement initiée par des **facteurs humoraux** provenant des pneumocytes de type II. Ces signaux sont donc essentiels pour stimuler la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Par ailleurs, des cellules souches mésenchymateuses cultivées sans pneumocytes de type II ne développent pas les caractéristiques décrites précédemment (66). La capacité des cellules souches mésenchymateuses à donner d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou interstitielles n'a pas encore été démontrée, et constitue une limite à leur utilisation (67) (66). L'un des avantages des souches mésenchymateuses par rapport aux cellules souches embryonnaires est qu'elles ne sont **ni tumorigènes ni teratogènes** (68). Les cellules souches embryonnaires ont la capacité de proliférer presque à l'infini et de se différencier en tout type cellulaire, ce qui augmente le risque de développement d'une tumeur.

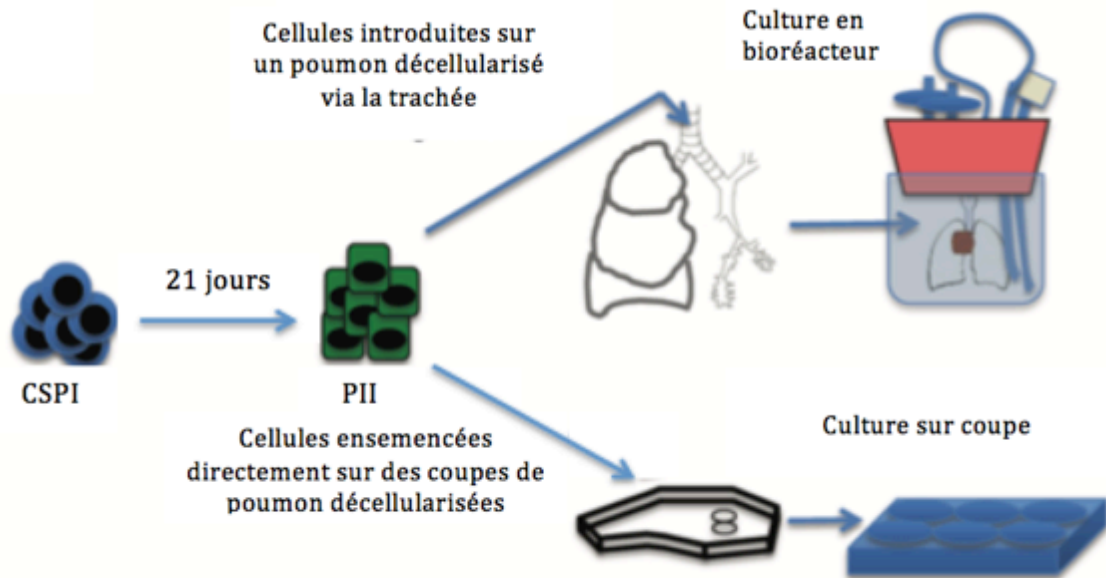
Les cellules souches mésenchymateuses, selon leur origine, constituent donc une source intéressante de cellules à étudier pour la culture 3D du poumon.

2.1.4. Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites sont des **cellules somatiques** dérivées de cellules adultes en présence de facteurs de transcription spécifiques **reprogrammées *in vitro* en cellules souches pluripotentes** (69). Ces cellules ont les **mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires**. Elles sont moins contraignantes éthiquement car prélevées sur l'adulte et permettent d'obtenir des **cellules différenciées autologues**.

Les cellules souches pluripotentes induites peuvent être obtenues à partir de cellules embryonnaires ou de **fibroblastes adultes** chez la souris, grâce à **l'expression de quatre facteurs de transcription**: OCT3/4, SOX2, c-Myc et KLF4 (Kruppel like factor 4), dans les mêmes conditions que les cellules souches embryonnaires (59). Les cellules obtenues présentent les propriétés morphologiques et de croissance des cellules souches embryonnaires et expriment des gènes marqueurs caractéristiques de ces dernières. L'inoculation de ces cellules dans des embryons de souris au stade blastocyste a établi qu'elles participaient au développement embryonnaire. L'analyse histologique confirme qu'elles sont retrouvées dans les trois feuilletts embryonnaires (59).

Les **pneumocytes de type I et de type II** peuvent être obtenus à partir de cellules souches pluripotentes induites en présence **d'activine A** pour générer des cellules de l'endoderme et des facteurs indispensables au développement de l'épithélium alvéolaire soit **EGF, BMP4, WNT3a et FGF10** (70). L'utilisation d'un **bioréacteur** avec une **interface air-liquide** permet d'obtenir des **pneumocytes de type I à partir de pneumocyte de type II issus de cellules souches pluripotentes induites** (71) (Figure 11).



CSPI : Cellules souches pluripotentes induites ; PII : Pneumocytes de type II

Figure 11 : Résumé de la différenciation des cellules souches pluripotentes induites et de la decellularisation-recellularisation de poumons avec des pneumocytes II issus de cellules souches pluripotentes induites (d'après (70))

2.2. DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES EN CELLULES DE L'ÉPITHÉLIUM PULMONAIRE

2.2.1. Orientation de la différenciation cellulaire à partir des différentes cellules souches disponibles

L'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines, comprenant les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites, est l'une des techniques les plus efficaces pour obtenir la différenciation de cellules ou de tissus, dont l'épithélium pulmonaire. Diriger la différenciation des cellules souches pluripotentes qu'elles soient d'origine embryonnaire ou induites, consiste finalement à **recréer le déroulement du développement *in vivo*** grâce à l'activation et à l'inhibition de différentes voies de signalisation *in vitro*, à une concentration et à un instant précis (72). Ainsi, l'orientation de la différenciation des cellules souches pluripotentes doit commencer par une **différenciation en endoderme définitif** puis en **endoderme**

ventral avant de procéder à la **différenciation des différentes lignées cellulaires** de l'épithélium pulmonaire (73).

Plusieurs techniques ont été décrites. Il est possible d'obtenir des cellules de l'épithélium pulmonaire **avec formation de corps embryoides** à partir de cellules souches pluripotentes ou de cellules souches pluripotentes induites, ou bien **sans formation de corps embryoides**. Des cellules souches indifférenciées de souris ou d'homme peuvent former des **corps embryoides** qui sont ensuite transférés sur un **milieu de culture** conçu pour la maintenance de l'épithélium **respiratoire mature** (74) (75). Les corps embryoides sont formés par agrégation forcée et contiennent **les trois lignées cellulaires embryonnaires**, à savoir l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Ils miment la phase de gastrulation de l'embryogénèse et marquent l'initiation de la différenciation des cellules (76)(77). La présence de la protéine C et de la protéine B du surfactant ainsi que la forme cuboïdale des cellules marquent la dérivation de pneumocytes de type II. (74)(75)(78). Chez la souris, des pneumocytes de type II peuvent être obtenus par culture de corps embryoides avec du mésenchyme pulmonaire de souriceaux de 11,5 à 13,5 jours par contact direct ou séparés par une membrane (79). L'étape suivante comporte une phase **de culture adhérente** sur un support de type « Matrigel TM » dans un milieu sans sérum. Les milieux sans sérums ont une composition plus simple et mieux définies avec moins de contaminants et moins de risques de contamination, ce qui permet d'améliorer la reproductibilité des résultats entre les manipulations. La première étape du développement pulmonaire est la spécification précoce de l'endoderme définitif sous l'influence de l'activine A et de BMP4. Ces facteurs sont ajoutés au milieu de culture et ont pour objectif de donner le signal de spécification aux cellules de l'endoderme dans le corps embryoïde qui donneront plus tard les cellules du poumon (77)(80). Ensuite, l'ajout d'EGF et de FGF permet de mimer la phase d'antériorisation de l'endoderme définitif. Les cellules ainsi obtenues sont donc les cellules de l'endoderme pulmonaire et sont marquées par l'expression du facteur de transcription NKX2-1 (77)(72). À l'issue de cette étape les cellules obtenues peuvent être assimilées aux cellules des premiers bourgeons bronchiques *in vivo* (77). Il est primordial de **respecter la cascade des facteurs** mais aussi leur **intervention à un moment précis** pour récapituler la différenciation. Par exemple, l'ajout prématuré du facteur WNT régionalise l'endoderme en un épithélium correspondant à l'intestin postérieur et empêche la différenciation de cellules exprimant NKX2-1 (81). La dernière étape réside en l'utilisation d'un milieu de culture spécifique pour obtenir les cellules **pulmonaires progénitrices** (80)(72). Deux milieux de culture distincts peuvent être élaborer afin d'obtenir les cellules progénitrices du poumon proximal et du poumon distal (77). Les cellules progénitrices du poumon proximal donnent naissance aux cellules Club, aux cellules caliciformes, aux cellules ciliées et aux cellules neuroendocrines. Le milieu de culture mis en place pour obtenir ces cellules est enrichi en BMP7 (Bone morphogenetic protein 7), en FGF7 (Fibroblast growth factor 7) et en acide rétinoïque. Pour spécifier les cellules épithéliales du poumon distal, les pneumocytes de type I et de type II, le milieu de culture est enrichi en BMP2 (Bone

morphogenetic protein 2), FGF10 (Fibroblast growth factor 10), BMP4 et WNT3A (77). Cette technique permet de produire des cellules avec une forte capacité de différenciation et de prolifération qui donnent naissance aux différents types cellulaires présents dans l'épithélium pulmonaire. Toutefois les premières cellules progénitrices générées sont celles de l'épithélium des voies respiratoires et de l'épithélium alvéolaire mais rapidement un phénomène **d'apoptose** des cellules présentant les marqueurs des voies respiratoires est suspecté, d'où l'obtention d'une **grande proportion de pneumocytes de type II** (72).

Il est également possible de générer des pneumocytes de type II à partir de cellules souches embryonnaires humaines et de cellules souches pluripotentes induites sans formation de corps embryoïdes (82)(78). La culture de cellules souches sur une couche de « Matrigel TM » permet leur différenciation directement en **pneumocytes de types II sans formation de corps embryoïdes** (82). L'expression de la protéine C du surfactant des pneumocytes de type II est mise en évidence plus précocement qu'avec l'utilisation de corps embryoïdes. Une plus grande proportion de cellules expriment la protéine C du surfactant ; 11,2% à 15 jours de culture contre 2,8% à 33 jours de culture avec formation de corps embryoïdes (82). Ces résultats tendent à montrer que les composants du substrat de culture comme la laminine et le collagène IV sont efficaces à la fois pour maintenir les caractéristiques biologiques des pneumocytes de type II et pour stimuler spécifiquement la différenciation des cellules souches embryonnaires en pneumocytes de type II (82).

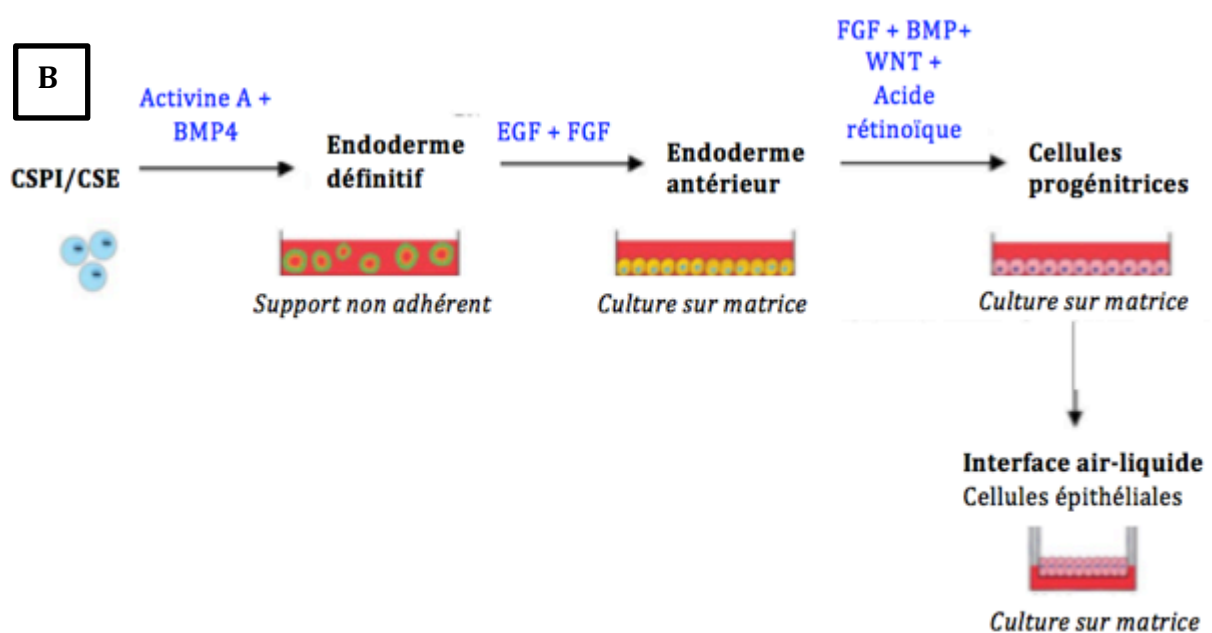
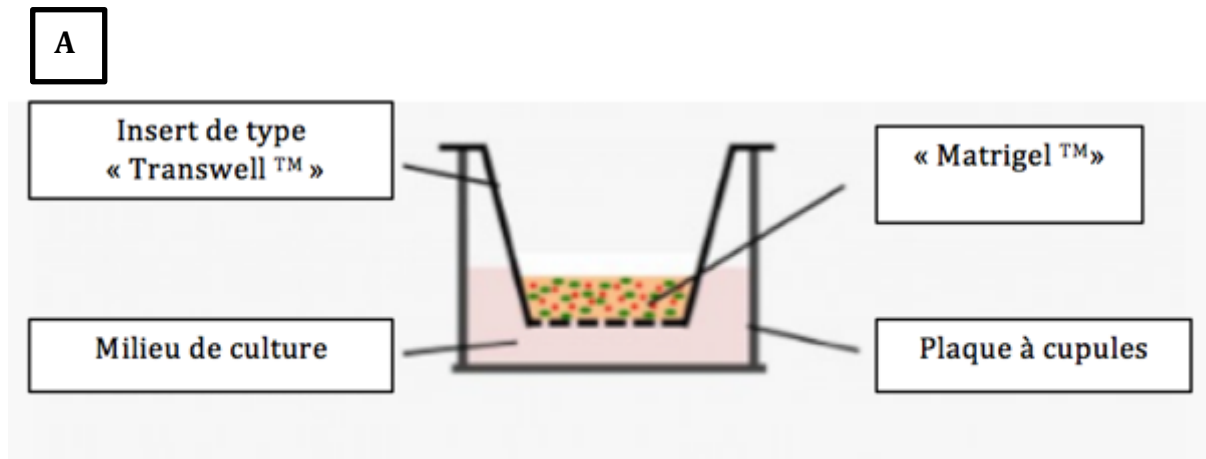
Les protocoles précédents ont été réalisés sur des supports en deux dimensions. Le développement de **modèles tridimensionnels** offre différents avantages (83). **L'organisation architecturale de l'organe natif** et le développement de différents types cellulaires d'origines variées (mésoderme et endoderme par exemple) en font un **modèle physiologique complexe pour étudier les processus de développement, l'homéostasie tissulaire et les réponses face à différents pathogènes**. Les modèles de différents organes ont dès lors été générés sous forme d'« **organoïdes** »(83). En culture cellulaire, un organoïde est une structure multicellulaire tridimensionnelle qui reproduit *in vitro* la micro-anatomie d'un organe; il s'agit donc un modèle de l'organe. Une des limites des modèles bidimensionnels est l'incapacité à décrire s'ils peuvent générer des cellules issues du mésoderme. Des organoïdes pulmonaires humains ont été obtenus à partir de cellules souches pluripotentes humaines, intégrant à la fois des cellules mésenchymateuses et des cellules épithéliales des voies respiratoires et alvéolaires (83). Les cultures en organoïdes permettent donc de maintenir l'organisation tissulaire et notamment les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme (83).

Ainsi, il est possible d'obtenir les différents types cellulaires de l'épithélium des voies respiratoires et de l'épithélium alvéolaire *ex-vivo*, à partir de cellules souches non différenciées. Ces protocoles une étape essentielle pour la recellularisation des modèles tridimensionnels de poumon.

Trois stratégies principales peuvent dès lors être adoptées, l'utilisation de cellules souches pluripotentes, l'utilisation d'un mélange de cellules progénitrices adultes capables de produire les différents types cellulaires nécessaires, ou bien l'utilisation d'un mélange de cellules unipotentes de chaque lignée cellulaire retrouvée dans les voies respiratoires et dans les alvéoles (84).

2.2.2. Utilisation de bioréacteurs et d'interface air-liquide pour la différenciation cellulaire

Les interfaces air-liquide sont des types de culture qui permettent aux cellules de se différencier et de croître dans un **environnement proche de celui retrouvé *in vivo***. Elles permettent d'**exposer sélectivement les pôles basal et apical des cellules à différentes conditions** (85). Elles sont très utilisées pour la **culture des cellules des voies respiratoires**. Ces systèmes utilisent une chambre apicale et une chambre basolatérale séparées par une fine membrane de polyester sur laquelle les cellules se trouvent. Le milieu de culture est déposé dans les deux chambres (86) ou uniquement dans la chambre inférieur. Les cellules sont donc soit nourries par la méthode classique d'immersion, soit nourries uniquement à leur base, la partie apicale étant alors en contact avec l'air. L'utilisation de cette culture biphasique avec des cellules épithéliales des voies de conceptions de l'air montrent des **effets positifs sur leur croissance et leur différenciation** (87) (Figure 12).



CSPI : Cellules souches pluripotentes induites ; CSE : Cellules souches embryonnaires

Figure 12 : Interface air-liquide (A) et son utilisation pour la différenciation des cellules épithéliales du poumon (B) (d'après (88))

Les bioréacteurs sont des outils utilisés pour l'élaboration de tissus artificiels afin de cultiver et de guider le développement de ces tissus. Ce sont des systèmes de culture *in vitro* conçus pour assurer la survie cellulaire en assurant la distribution adéquate de nutriments essentiels pour la survie de la construction tridimensionnelle du tissu artificiel (89). La maintenance et l'expansion dans des conditions stables sur de longues périodes, de cellules ou de cultures tissulaires obtenues artificiellement peuvent être réalisées dans ces bioréacteurs (89). Le développement de culture en bioréacteur permettant **de contrôler l'approvisionnement du milieu, le pH, l'oxygène, et d'évacuer les produits métaboliques** est une étape importante pour la production de cellules en conditions contrôlées à grande échelle. L'agitation du milieu de culture n'apporte pas seulement des conditions environnementales et de nutrition optimales

mais aussi une **stimulation mécanique** qui favorise la **croissance et la différenciation des cellules**. Les bioréacteurs disponibles sont très variés et vont de ceux pour les cultures en suspension à ceux pour des cultures adhérentes sur des matrices spécifiques. L'utilisation de bioréacteurs rotatoires est déjà décrite pour la différenciation des cellules souches pluripotentes induites en cellules épithéliales alvéolaires (89) (Figure 13).

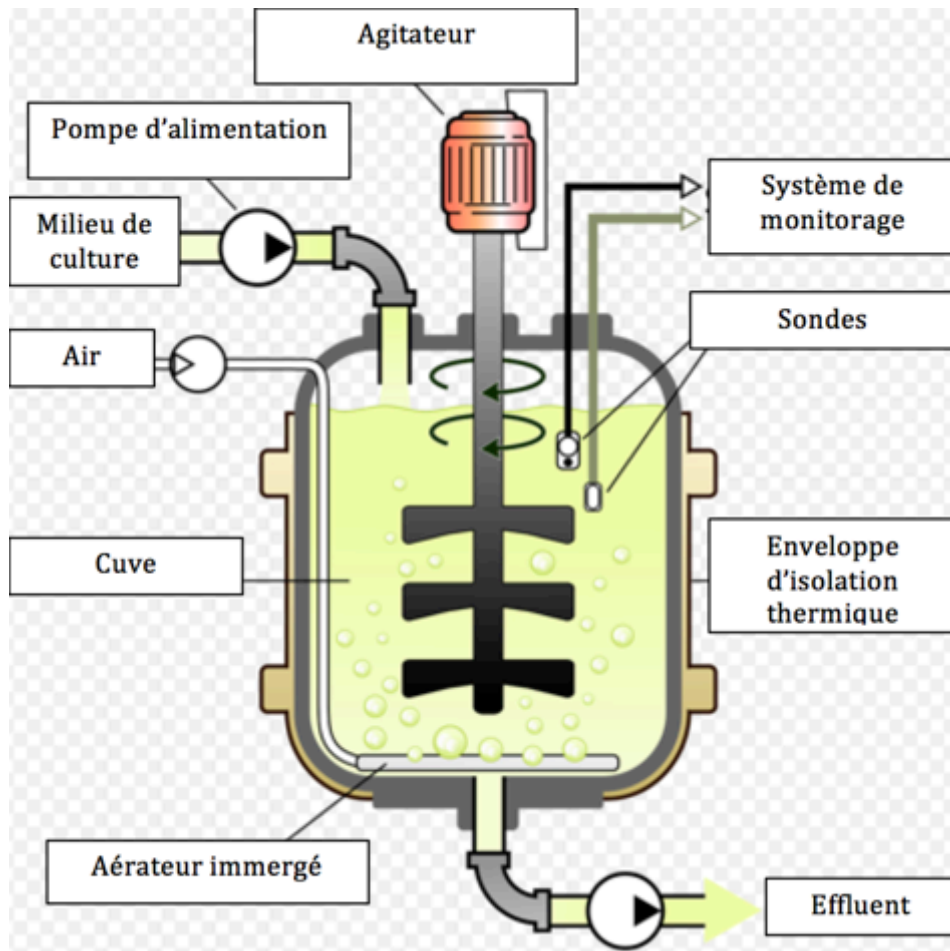
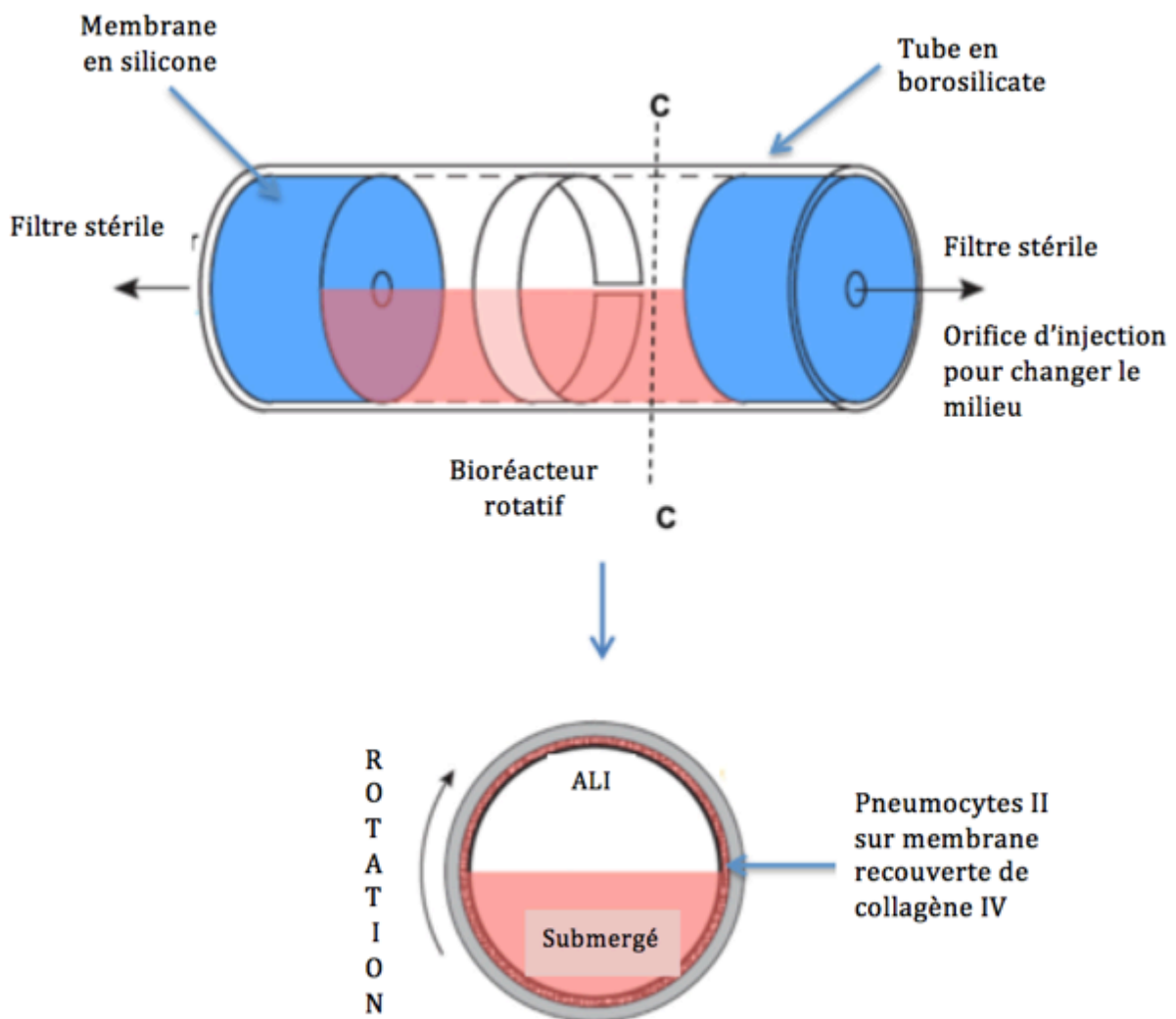


Figure 13 : Bioréacteur pour la culture cellulaire

L'utilisation d'un **bioréacteur rotatif avec une interface air-liquide** est un puissant **inducteur de différenciation des pneumocytes de type II en pneumocytes de type I** (71). Les pneumocytes de type II initiaux sont soit des pneumocytes humains soit issus de cellules souches pluripotentes induites. Cette technique fournit une méthode pour la production de cellules de l'épithélium alvéolaire à grande échelle. Cet environnement biologique imite en quelque sorte les conditions respiratoires *in vitro*. Le système de rotation continue permet à toutes les cellules de passer un temps égal dans l'air et dans le liquide (Figure 14).



ALI : Interface air liquide ; C : Coupe

Figure 14 : Utilisation d'un bioréacteur rotatif pour la différenciation des pneumocytes II en pneumocytes I (d'après (71))

Les résultats sont comparés avec ceux obtenus avec une culture statique de pneumocytes de type II issus de cellules souches pluripotentes induites cultivés avec des molécules favorisant la différenciation en pneumocytes de type I, c'est à dire, en inhibant la voie de signalisation WNT/ β -caténine. Dans les deux types de culture des marqueurs de pneumocytes de type I sont mis en évidence par immunohistochimie (notamment aquaporine 5, cavéoline-1, T1a) en parallèle d'une diminution des marqueurs de pneumocytes de type II. **L'utilisation du bioréacteur semble plus efficace que la culture statique pour obtenir des pneumocytes de type I à partir de pneumocytes de type II et permet ainsi d'obtenir ces cellules à plus grande échelle.**

La différenciation cellulaire est fortement dépendante des conditions environnementales. Les bioréacteurs sont donc des outils indispensables pour orienter la différenciation des cellules souches en cellules de l'épithélium pulmonaire et des voies respiratoires.

2.3. TYPE DE SUPPORT

La détermination du support permettant aux cellules d'adhérer est critique pour l'obtention de populations cellulaires définies. Le support matériel fournit un **modèle structural** pour que les cellules adhèrent et que le tissu croisse alors que les bioréacteurs servent à contrôler l'environnement. Le design des systèmes de tissus artificiels sont nécessairement inspirés par la biologie à la fois des organismes en développement mais aussi des organismes adultes (90)

Un des composants important du **microenvironnement** des cellules souches est la **matrice extracellulaire** qui les entoure incluant de nombreux **signaux chimiques et biophysiques**. En contexte naturel la **matrice extracellulaire** est composée de **collagène**, **d'élastine**, de **glycoprotéines**, de **protéoglycanes**, de **glycosaminoglycanes** et **d'eau (91)**. Les différents composants de la matrice extracellulaire contrôlent les interactions cellulaires et les liaisons aux récepteurs (90). Une grande variété de matériaux avec différentes propriétés a été conçue et utilisée pour étudier les interactions avec les cellules souches. Il existe des échafauds **poreux, fibreux ou sous forme d'hydrogel**. Les supports poreux fournissent des pores macroscopiques dans lesquels les cellules migrent et s'infiltrant, alors que les supports fibreux présentent des dimensions proches de celles d'une matrice extracellulaire native. Les hydrogels sont des polymères gorgés d'eau qui peuvent être issus des composants de matrice extracellulaire ou de composants synthétiques (90).

Les supports utilisés peuvent donc être **biologiques ou synthétiques** et **biodégradables ou non**. L'avantage des supports biodégradable est qu'ils sont absorbés par le corps après implantation, mais une réaction inflammatoire peut se développer dans les tissus qui l'entourent (53). Les supports biologiques sont plus proches du tissu d'origine. Il existe différentes sortes de support biologiques comme le **collagène**, le « **Matrigel™** » ou les **organes décellularisés**. La décellularisation est réalisée de sorte que tous les composants de la matrice extracellulaire et leurs propriétés soient préservés. Différentes techniques chimiques, physiques et enzymatiques ont été développées (53).

2.3.1. Supports biologiques

Tous les tissus et organes sont composés de cellules et de matrice extracellulaire. Cette dernière influence **l'adhérence**, la **migration**, la **prolifération** et **l'organisation tridimensionnelle** des cellules. Les supports biologiques sont issus de la matrice extracellulaire naturellement présente dans l'organisme. Ils conservent **la structure anatomique**, **l'architecture** native de la matrice ainsi que ses **propriétés biomécaniques** et la plupart des **ligands** nécessaires à **l'adhésion** des cellules que l'on retrouve dans le tissu vivant. Ce type de support va des simples **protéines purifiées**, aux **mélanges de protéines extraites**, jusqu'aux **organes entiers décellularisés** (92).

2.3.1.1. Protéines et mélanges de protéines purifiées

Des exemples de matériaux naturels étudiés pour cultiver les cellules souches sont le « **Matrigel™** », le **collagène**, **l'alginate**, la **fibrine** ou encore **l'acide hyaluronique**. Le « **Matrigel™** » est un **mélange de molécules dérivées d'une matrice extracellulaire**, comprenant des principalement de la laminine, du collagène IV, de l'entactine et de l'héparane sulfate protéoglycane et des facteurs de croissance : FGF, EGF, IGF1 (Insulin-like growth factor 1), TGF- β (Transforming growth factor β), PDGF (platelet-derived growth factor) et NGF (Nerve growth factor) (93). Il a été étudié pour la culture des cellules et en particulier de **cellules souches**. Lorsqu'il est associé ou non à des gels de collagène, il est capable de favoriser la formation de certaines structures de tissus comme les follicules thyroïdiens, la cornée ou encore la muqueuse vésicale (92)(94).

Le **collagène** est présent en grande quantité dans la matrice extracellulaire native et interagit avec les cellules *via* les **intégrines**, c'est pourquoi l'utilisation de gels tridimensionnels de collagène est rependue pour la culture cellulaire (90). Le collagène de type I permet de soutenir la croissance cellulaire et de promouvoir la morphologie spécifique des cellules et leur fonction (92).

L'alginate est un poly anion, provenant d'une algue, qui a la capacité de former des **hydrogels**. Il n'y a pas d'interactions directes entre l'alginate et les cellules cultivées mais l'hydrogel formé devient **soluble** (90)(94). L'alginate supporte la croissance et la différenciation des cellules souches embryonnaires (94). Il a notamment déjà été utilisé pour la différenciation en cellules de la lignée hépatique (94).

La **fibrine** a déjà été utilisée pour la **culture de cellules souches embryonnaires** de souris (90). Enfin, **l'acide hyaluronique** est un polysaccharide retrouvé dans de nombreux tissus et qui a été modifié pour former des **hydrogels** avec des propriétés bien définies qui permettent **l'encapsulation de cellules viables** (90). L'encapsulation des cellules permet de maintenir leur viabilité et leur fonctionnalité, permet de protéger les cellules des forces de frottement externes et face à une réponse

immunitaire en cas d'implantation dans un tissu et elle permet la diffusion des éléments nutritifs des cellules.

Les limites de ces supports sont leurs propriétés mécaniques inadéquates, leur taux de dégradations variables et leur incapacité à recréer précisément la complexité tridimensionnelle du poumon.

2.3.1.2. La matrice extracellulaire et les organes décellularisés

La matrice extracellulaire a été fortement étudiée pour la création de tissus artificiels et en médecine régénérative. Elle est capable d'induire la formation de nouveaux tissus présentant l'organisation spatiale correspondante au tissu initial ou d'intérêt. Les composants de la matrice extracellulaire peuvent **promouvoir la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules et structures similaires au tissu dont a été extraite la matrice** (95). La matrice extracellulaire obtenue par la décellularisation de tissus présente l'avantage d'apporter des **molécules spécifiques structurelles et fonctionnelles dans des proportions proches de celles retrouvées dans le tissu natif**, ainsi que le maintien de l'organisation architecturale en trois dimensions (96). La diversité et la complexité des molécules qui composent cette matrice rend difficile la création d'un analogue à partir de protéines purifiées ou de matériaux de synthèses. L'isolement de celle-ci par décellularisation de tissus et d'organes est donc une méthode efficace pour obtenir un matériau qui peut être utilisé dans la reconstruction tissulaire (96). La matrice extracellulaire étant produite par les fibroblastes d'un tissu ou organe donné, sa composition et sa structure varient selon son origine (97). Elle a de plus la capacité à orienter la différenciation des cellules souches embryonnaires et les cellules progénitrices adultes (98).

Le but de la **décellularisation** est de **retirer tout le matériel cellulaire** sans affecter la composition biochimique, les propriétés mécaniques, la topographie des ligands et l'activité biologique résiduelle du support restant. La plupart des molécules qui composent la matrice extracellulaire sont bien connues et forment une maille complexe spécifique du tissu comprenant du **collagène de type I et IV**, des **glycosaminoglycanes**, de la **fibronectine**, de la **laminine**, de l'**élastine** et de petites molécules. Parmi ces petites molécules se trouvent des **cytokines** et des **facteurs de croissance** comme **EGF, FGF, BMP, PDGF, TGF- β , VEGF** (Vascular endothelial growth factor) (96). Bien que présentes en faible concentration, ces molécules sont de **puissants modulateurs du comportement cellulaire**. La matrice extracellulaire agit donc **comme réservoir de ces molécules** (96) (97). Le collagène et l'élastine assurent la résistance et l'élasticité du parenchyme pulmonaire, alors que la laminine et l'héparine sulfate induisent la polarisation des cellules épithéliales et la formation de la

lumière (99). La morphologie et le fonctionnement des pneumocytes de type II sont dépendants de leur contact direct avec les fibroblastes et les fibres de collagène (99). L'adhérence et la viabilité des cellules ensemencées sur une matrice acellulaire naturelle de poumon sont significativement meilleures qu'avec d'autres types de supports comme le « Matrigel TM » (100).

Les supports biologiques les plus sophistiqués sont **les tissus ou organes complets décellularisés**. Ils conservent l'architecture macroscopique de l'organe et conservent également ses signaux spécifiques qui soutiennent la croissance cellulaire nécessaire pour le reconstruire en entier. L'utilisation d'un organe entier décellularisé permet de conserver la trame de son **réseau vasculaire**. La difficulté dans l'utilisation de ce type de support réside dans le processus nécessaire pour **retirer les cellules et le matériel immunogène** du tissu ou organe donneur tout en maintenant les propriétés biochimiques et biophysiques de ce support qui vont permettre aux cellules nouvellement implantées de s'adapter (96) (101).

En s'appuyant sur les résultats obtenus dans les études déjà menées, dans lesquelles des organes décellularisés ont été implantés chez des individus receveurs et chez qui des réponses de rejets ont été évitées, **des critères minimum pour assurer l'efficacité de la décellularisation** ont pu être déduits (102) :

- <50 ng ADN double brin par mg de matière sèche de matrice extracellulaire.
- Fragments d'ADN <200 paires de bases.
- Absence de matériel nucléaire visible sur les coupes colorées avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ou de l'hématoxyline et de l'éosine

Des techniques ont été développées pour décellulariser des organes complexes comme le cœur, le foie ou les reins (96). Décellulariser un tissu pulmonaire natif permet de retirer tous les constituants immunogènes. Après une décellularisation précautionneuse, le tissu garde son **architecture alvéolaire, sa capacité à fonctionner comme barrière contre les particules** ainsi que ses **propriétés mécaniques** mais avec une matrice non anti-génique, ce qui permet **d'éviter les traitements immunosuppresseurs** indispensables en cas d'allogreffes et souvent délétères (53). La repopulation de cet échafaud acellulaire avec plusieurs types de cellules de l'épithélium pulmonaire néonatale donne une **implantation cellulaire régionale** respectant les localisations anatomiques physiologiques. Pour favoriser la survie et la différenciation des cellules de l'épithélium, l'échafaud est cultivé dans un **bioréacteur** conçu pour imiter certaines particularités de l'environnement du développement fœtal du poumon, incluant notamment la perfusion vasculaire et la ventilation (53).

La question de l'origine et de la qualité des poumons à décellulariser est à prendre en considération. Les poumons humains utilisés pour produire des supports biologiques proviennent de donneurs décédés (100). Cet organe est en contact permanent avec l'environnement extérieur ce qui augmente le risque de contamination

et d'infection. Les organes donneurs doivent donc autant que possible être indemnes de toute lésion ou affection afin de pouvoir assurer une décellularisation optimale et de pouvoir obtenir un échafaud conforme à la structure d'un poumon normal (103).

La décellularisation des poumons peut être réalisée grâce à une **perfusion intra-artérielle et/ou intra-trachéale** contenant différentes substances, des détergents, des enzymes, des solutions ioniques, acides ou basiques (55)(102). Des poumons décellularisés peuvent être maintenus stériles jusqu'à six mois après leur décellularisation en conditions réfrigérées (104). Cependant un entreposage prolongé entraîne une perte de structure et le développement d'une atélectasie (104). Celle-ci peut être partiellement reversée par ré-insufflation d'air dans des poumons stockés pendant trois mois, par contre ces changements sont irréversibles pour des poumons entreposés pendant six mois (104). La technique de stérilisation par irradiation ou acide péracétique a un impact sur la qualité de l'organe (104). L'irradiation provoque une modification importante de l'apparence des poumons avec fusion de certains septa alvéolaires, apparition de zones d'emphysème et épaississement de certaines régions (104). L'acide peracétique semble moins délétère et plus adapté pour la stérilisation de ces structures car seulement quelques plages d'atélectasie réversible sont observées (104). Cependant son effet sur les protéines, et spécifiquement celles de la matrice extracellulaire, est à prendre en considération puisqu'il s'agit d'un agent dénaturant (104). Finalement les conditions d'entreposage et de stérilisation des poumons décellularisés peuvent significativement affecter leur structure et leur composition.

2.3.1.3. Protocoles de décellularisation détaillés

L'efficacité de la suppression des cellules dépend de l'origine du tissu et des méthodes physiques, chimiques et enzymatiques qui sont utilisées. Chacun de ces traitements affecte la composition biochimique, la structure tissulaire et le comportement mécanique de la matrice extracellulaire restante (105).

Les antigènes xenogéniques et allogéniques sont par définition reconnus comme étrangers par un hôte et induisent une réaction inflammatoire conduisant au rejet par l'hôte. Néanmoins, les composants de la matrice extracellulaire sont généralement conservés entre les espèces et sont plutôt bien tolérés même dans le cadre d'une greffe xenogénique. **Le but des protocoles de décellularisation est de retirer efficacement tout le matériel cellulaire et nucléaire tout en minimisant les effets négatifs sur la composition, l'activité biologique et l'intégrité mécanique de la matrice extracellulaire restante** (105).

La décellularisation consiste en un traitement du tissu avec des **solutions ioniques** destabilisant les membranes cellulaires, un traitement **enzymatique** avec de la trypsine pour digérer les protéines et des nucléases pour séparer les acides nucléiques,. Les éléments protéiques sont dégradés en présence de **détergents** comme le dodécylsulfate

de sodium (SDS) ou le désoxycholate de sodium (96). Enfin, des **solutions alcalines** ou **acides** sont communément utilisées pour retirer les acides nucléiques qui pourraient encore se trouver sur la matrice, et pour la désinfecter avant de la stériliser (96). Toutes ces étapes sont souvent couplées à des **traitements physiques** comme la **congélation**, l'application d'une **pression directe**, l'utilisation **d'ultrasons**, ou **l'agitation** afin d'améliorer l'efficacité de la décellularisation (96). Ensuite des **rinçages** successifs sont nécessaires pour retirer les agents chimiques résiduels et éviter les réactions de rejet du tissu receveur par rapport aux agents de décellularisation (96). Plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre comme la **perfusion continue** des poumons dans un bioréacteur, ou **l'instillation manuelle** de fluides de décellularisation, ou l'exposition de coupes de tissu à ces fluides et à l'agitation mécanique (106). Malgré les précautions prises, les traitements réalisés ont un effet sur la matrice. Les détergents **perturbent le collagène** dans certains tissus, ce qui rend la matrice extracellulaire **moins solide**. Cet effet délétère du détergent est variable selon les tissus puisque leur composition en collagène est variable. De même, l'ablation des **glycosaminoglycanes** peut modifier les **propriétés viscoélastiques** de la matrice restante (96). Les techniques de décellularisation doivent être optimisées en fonction des organes ou tissus afin de ne pas compromettre les propriétés fonctionnelles et structurales de la matrice extracellulaire. En général, les méthodes utilisées sont insuffisantes pour parvenir à une décellularisation complète (96).

Les méthodes physiques qui peuvent être utilisées pour faciliter la décellularisation regroupent la **congélation**, l'application d'une **pression directe**, la **sonication** et **l'agitation**. En refroidissant rapidement un tissu, des cristaux de glace intracellulaires se forment et provoquent la rupture des membranes cellulaires ce qui aboutit à la lyse des cellules. Le changement de température doit être contrôlé précisément afin d'éviter la formation de glace dans la matrice extracellulaire, ce qui serait délétère pour celle-ci. Cette méthode est efficace pour provoquer une lyse cellulaire mais elle doit tout de même être accompagnée d'un procédé pour retirer les débris obtenus. L'application directe d'une pression sur le tissu peut provoquer une lyse cellulaire, mais cette technique n'est efficace que sur des tissus et organes qui ne possèdent pas une matrice extracellulaire très dense, elle se révèle donc efficace pour décellulariser des poumons. L'agitation mécanique et la sonication ont déjà été utilisées simultanément avec un traitement chimique. L'agitation mécanique peut être appliquée en utilisant un agitateur magnétique, un agitateur orbital ou un agitateur rotatif. Quelle que soit la méthode utilisée, la vitesse optimale, le volume de réactif et la durée de l'agitation mécanique dépendent de la composition, du volume et de la nature du tissu (105) (Tableau IV).

Les traitements **acides et basiques** sont utilisés dans les protocoles de décellularisation pour solubiliser les composants cytoplasmiques des cellules mais aussi pour éliminer les acides nucléiques comme l'ADN et l'ARN. Par exemple, l'acide acétique, l'acide peracétique, l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde d'ammonium

peuvent efficacement rompre les membranes cellulaires et les organites intracellulaires. Cependant ces produits peuvent aussi altérer les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire. L'acide peracétique a été étudié en particulier et s'est montré efficace pour décellulariser de fines matrices extracellulaires à une concentration comprise entre 0,10% et 0,15% (105). Son utilisation permet de désinfecter simultanément le matériel. Son effet sur la matrice extracellulaire restante a été examiné et montre que celle-ci conserve de nombreux glycosaminoglycanes natifs comme l'acide hyaluronique, l'héparine, l'héparine sulfate, la chondroïtine sulfate A. La laminine et la fibronectine de la matrice sont également toujours présentes après traitement et la structure et la fonction de nombreux facteurs de croissance comme TGF- β , VEGF et FGF ne sont pas non plus altérées. L'acide peracétique ne semble pas non plus avoir d'effets néfastes sur le comportement mécanique de la matrice extracellulaire malgré ses propriétés de dénaturation des protéines. Ces produits, et en particulier l'acide peracétique, sont donc efficaces pour décellulariser et désinfecter les substrats (105). Les bases comme l'hydroxyde de sodium sont assez peu utilisées car elles réduisent fortement les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire en clivant les fibrilles de collagène et peuvent aussi complètement éliminer les facteurs de croissance présents (102) (Tableau IV).

Les **détergents non ioniques** sont beaucoup utilisés pour la décellularisation car leur effet sur la structure du tissu est relativement modéré. Ils déstabilisent les interactions lipide-lipide et lipide-protéine mais n'altèrent pas les liaisons protéine-protéine. Ainsi les protéines présentes dans un tissu après traitement par ce type de détergent conservent leur conformation fonctionnelle. Le Triton X-100 est le détergent non ionique le plus étudié dans le cadre des protocoles de décellularisation. Les résultats obtenus sont variables. Son efficacité est dépendante du tissu à décellulariser et des autres méthodes qui lui sont associées. De plus, son effet sur les glycosaminoglycanes est aussi mitigé (105) (Tableau IV).

Les **détergents ioniques** sont efficaces à la fois pour solubiliser la membrane cytoplasmique des cellules mais aussi leur membrane nucléaire mais ils ont tendance à dénaturer les protéines en déstabilisant leurs liaisons. Les détergents ioniques les plus utilisés sont le SDS et le désoxycholate de sodium. Le SDS est très efficace pour retirer les composants cellulaires d'un tissu. Comparé à d'autres détergents, le SDS amène à une élimination plus complète des protéines cytoplasmiques. Cependant, il tend à perturber la structure native du tissu et provoque une diminution de la concentration en glycosaminoglycanes et une perte de l'intégrité du collagène. Le désoxycholate de sodium est aussi très efficace pour éliminer les restes cellulaires mais semble causer plus de perturbations de l'architecture du tissu natif par rapport au SDS (105)(Tableau IV).

Les **détergents zwitterioniques** possèdent les propriétés des détergents ioniques et des détergents non ioniques. Ils ont une plus forte propension à déstabiliser les protéines que les détergents non ioniques (105) (Tableau IV).

L'élimination des protéines de la matrice extracellulaire et de l'ADN par les détergents augmente avec la durée d'exposition et varie selon l'organe, le type de tissu et l'âge du donneur. L'association de plusieurs détergents augmente la perte protéique. Le SDS est plus efficace pour éliminer les résidus cellulaires par rapport aux autres détergents mais perturbe d'avantage la matrice extracellulaire. En particulier, Le détergent zwitterionique 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) est plus efficace pour décellulariser des tissus fins comme le poumon (53).

Certains **solvants organiques** ont été étudiés pour la décellularisation des organes. Le tri(n-butyl)phosphate (TBP) est un agent chaotrope qui a déjà été utilisé dans certaines études et notamment pour la décellularisation de tendons et de ligaments. Il s'est montré efficace pour éliminer tous les restes d'origine nucléaire des tissus sur lesquels il a été testé. Il n'a montré aucun effet sur la résistance à la traction des fibres de collagène comparé à un échantillon de tissu témoin qui n'a pas subi de traitement au TBP. Cet agent chaotrope qui présente peu d'incidence sur le comportement mécanique de la matrice extracellulaire semble donc prometteur pour la décellularisation des tissus et organes (105) (Tableau IV).

Des traitements **hypertoniques et hypotoniques** sont aussi décrits. En effet, un choc osmotique avec de l'eau déminéralisée ou avec une solution à force ionique faible provoque une lyse cellulaire dans les tissus et organes. Un traitement avec une solution hypotonique, suivi d'un traitement avec une solution hypertonique peut provoquer une lyse des cellules mais n'élimine généralement pas les débris des cellules. Un traitement chimique ou enzymatique doit donc y être ajouté (105) (102) (Tableau IV).

Les **agents chélateurs**, comme l'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) ou l'EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid), sont des complexes moléculaires en forme d'anneau qui se lient fermement et isolent certains ions. Il a été démontré que des cations divalents comme Ca^{2+} et Mg^{2+} sont nécessaires à l'adhésion des cellules au collagène et à la fibronectine. En isolant les cations divalents présents au niveau de la liaison entre les cellules et la matrice extracellulaire ces agents facilitent l'élimination du matériel cellulaire des tissus. L'EDTA est habituellement utilisé en association avec la trypsine (105) (Tableau IV).

Les techniques **enzymatiques** de décellularisation comprennent l'utilisation de protéases de digestion, d'agents chélateurs du calcium et de nucléases. La trypsine est une des enzymes protéolytiques les plus communément employées dans les protocoles de décellularisation. Il s'agit d'une enzyme très spécifique qui clive la liaison peptidique

du côté du carbone de l'arginine et de la lysine, si le peptide suivant n'est pas la proline. Les nucléases comme les endonucléases catalysent l'hydrolyse des liaisons internes des chaînes désoxyribonucléotidiques et ribonucléotidiques alors que les exonucléases catalysent l'hydrolyse des liaisons terminales des chaînes désoxyribonucléotidiques et des ribonucléotidiques, ce qui mène finalement à la dégradation de l'ADN et de l'ARN. L'utilisation de traitements enzymatiques n'est pas sans conséquence sur les éléments de la matrice extracellulaire des tissus et organes. Un traitement trypsine/EDTA réduit sensiblement la composition en fibronectine et en laminine de la matrice extracellulaire et une exposition prolongée à ce traitement réduit considérablement la teneur en élastine et en glycosaminoglycanes. Ce traitement peut mener à une diminution de la résistance à la traction de la matrice extracellulaire de l'ordre de 50%. Il est donc important, dans ce protocole, d'optimiser le temps d'exposition afin d'apporter une décellularisation efficace sans compromettre les propriétés de la matrice extracellulaire (105) (Tableau IV).

Au cours de la décellularisation un certain nombre de protéases peuvent être libérées par les cellules rompues. Ces protéases peuvent altérer la matrice extracellulaire. C'est pour cette raison qu'il peut être intéressant d'inclure des inhibiteurs de protéases comme le fluorure de phénylméthylsulfonyl, la leupeptine ou l'aprotinine dans la solution dans laquelle le tissu est immergé. L'utilisation d'une solution tampon à pH 7-8 inhibe également de nombreuses protéases, et le contrôle de la température et du temps d'exposition à la solution est aussi un moyen de limiter l'activité de ces enzymes (105) (Tableau IV).

Un des problèmes rencontrés avec ces protocoles de décellularisation est la présence de bactéries qui peuvent contaminer la matrice extracellulaire restante. L'utilisation d'antibiotiques est décrite notamment la pénicilline, la streptomycine et l'amphotéricine B. Des résidus d'antibiotiques peuvent alors être retrouvés dans les supports utilisés pour la culture tridimensionnelle des cellules, ce qui mène à un autre sujet de préoccupation (105) (Tableau IV).

L'efficacité de la décellularisation et l'altération de la matrice extracellulaire varient, entre autre, selon l'origine du tissu, sa composition, sa densité. Pour chaque tissu, il est nécessaire d'optimiser le protocole de décellularisation afin d'obtenir une élimination cellulaire acceptable (105).

Il existe plusieurs méthodes pour vérifier l'efficacité de la décellularisation d'un tissu. Une **coloration cellulaire** standard à l'hématoxyline-éosine permet de déterminer si des structures cellulaires peuvent encore être observées. **L'immunohistochimie** peut se révéler utile pour la recherche de protéines spécifiques comme l'actine ou la vimentine qui sont des protéines spécifiques du cytosquelette. La recherche de l'ADN peut être réalisée en utilisant des molécules fluorescentes, comme le DAPI par exemple, qui se lie spécifiquement à l'ADN. En plus de la vérification de

l'élimination des cellules il est important de s'assurer que les éléments utiles de la matrice sont conservés, comme les protéines d'adhésion (fibronectine, laminine), les glycosaminoglycanes, les facteurs de croissance, les fibres élastiques, et le collagène qui seront indispensables pour l'infiltration des cellules souhaitées dans la matrice *in vivo* (105).

Les protocoles de décellularisation comprennent l'emploi de substances chimiques utilisées pour leur capacité à endommager les cellules éliminées par des phases de **rinçage**. Si ces substances demeurent dans le tissu à une forte concentration elles seront toxiques pour les cellules utilisées pour recoloniser l'organe décellularisé (105). Il n'existe pour l'instant **aucune méthode pour quantifier les résidus** de ces produits chimiques.

Enfinement, la décellularisation requiert en général la combinaison de **traitements physiques, enzymatiques et chimiques**. Il est souhaitable de recourir au traitement le **plus doux possible** qui permet d'obtenir un matériel acellulaire sans altération des propriétés physiques et fonctionnelles de la matrice extracellulaire. **L'élimination des protéines d'adhésion et des glycosaminoglycanes de la matrice peut ralentir la migration des cellulesensemencées mais aussi altérer la bioactivité de la matrice elle-même**. De même, un **affaiblissement du réseau de fibres de collagène peut modifier le comportement mécanique de la matrice extracellulaire**. Enfin les traitements chimiques utilisés peuvent rendre la matrice plus **vulnérable à la dégradation enzymatique *in vivo***, ce qui peut mener à une **diminution rapide de la résistance du support** une fois implantés chez le receveur.

Tableau IV: Méthodes de décellularisation communément employées (105).

Méthode	Mode d'action	Effets négatifs sur la matrice extracellulaire
Congélation	Rupture des membranes cellulaires	Altération et fragmentation si refroidissement trop rapide
Force mécanique	Éclatement des cellules	Altération
Agitation mécanique	Lyse cellulaire+ Exposition du tissu aux solutions chimiques+ élimination des cellules	Rupture lors des lavages
Solution acide ou basique	Solubilisation les composants cytoplasmiques	Élimination les glycosaminoglycane
<i>Détergent non ionique</i> Triton X-100	Rupture des liaisons lipide-lipide et lipide-protéine	Élimination les glycosaminoglycane
<i>Détergent ionique</i> SDS	Solubilisation membranes cytoplasmiques	Altération glycosaminoglycane et collagène
<i>Détergent ionique</i> Désoxycholate de sodium	Solubilisation membranes cytoplasmiques	Altération glycosaminoglycane et collagène
Détergent zwitterionique	Rupture des liaisons lipide-lipide et lipide-protéine+ solubilisation membranes cytoplasmiques	Élimination glycosaminoglycane
Tri(n-butyl)phosphate	Rupture des liaisons entre les protéines	Altération du collagène
Solutions hypertoniques et hypotoniques	Lyse cellulaire par choc osmotique	Pas d'élimination des résidus cellulaires
EDTA, EGTA	Liaisons aux cations divalents	/
Trypsine	Clivage des liaisons peptidiques du coté C-terminal de la lysine et de l'arginine	Altération, élimination de la laminine, de la fibronectine, de l'élastine et des glycosaminoglycane
Endonucléases	Hydrolyse des liaisons internes des chaines nucléiques	Difficile à éliminer
Exonucléases	Hydrolyse des liaisons terminales des chaines nucléiques	Difficile à éliminer

Dans le cas du poumon, les méthodes physiques comme la congélation et l'agitation vigoureuse peuvent provoquer des **destructions excessives** de la matrice extracellulaire fragile (107). Les agents enzymatiques utilisés seuls ne sont pas suffisamment rentables pour des organes avec une vaste surface comme le poumon. C'est pour cela que **les méthodes chimiques sont les plus utilisées pour la décellularisation des poumons** (107). La méthode de distribution des substances utilisées est aussi à prendre en compte afin de préserver au mieux la vascularisation (108).

Des poumons d'hommes et de porcs ont déjà été décellularisés (100). La trachée et l'artère pulmonaire sont chacune connectées à une canule. Du SDS est ensuite injecté dans les poumons via ces canules et les poumons sont eux-mêmes immergés dans cette solution. Les bains et les flux de perfusions sont régulièrement changés pendant sept jours. À partir du sixième jour d'immersion la décellularisation est presque complète (Figure 15). Le septième jour, les poumons sont perfusés avec de l'eau distillée puis une solution contenant de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B. Les échafauds acellulaires obtenus sont ensuite stockés dans cette solution associée à une solution antimycotique. Une endoscopie des vaisseaux et des voies conductrices de l'air montre que macroscopiquement les structures de surface semblent intactes, sans signe d'altération de l'architecture et sans débris cellulaires visibles. La comparaison de la pression maximale et de la compliance statique et dynamique entre des poumons de porcs décellularisés et des poumons de porcs « normaux » ne montre pas de différence significative.

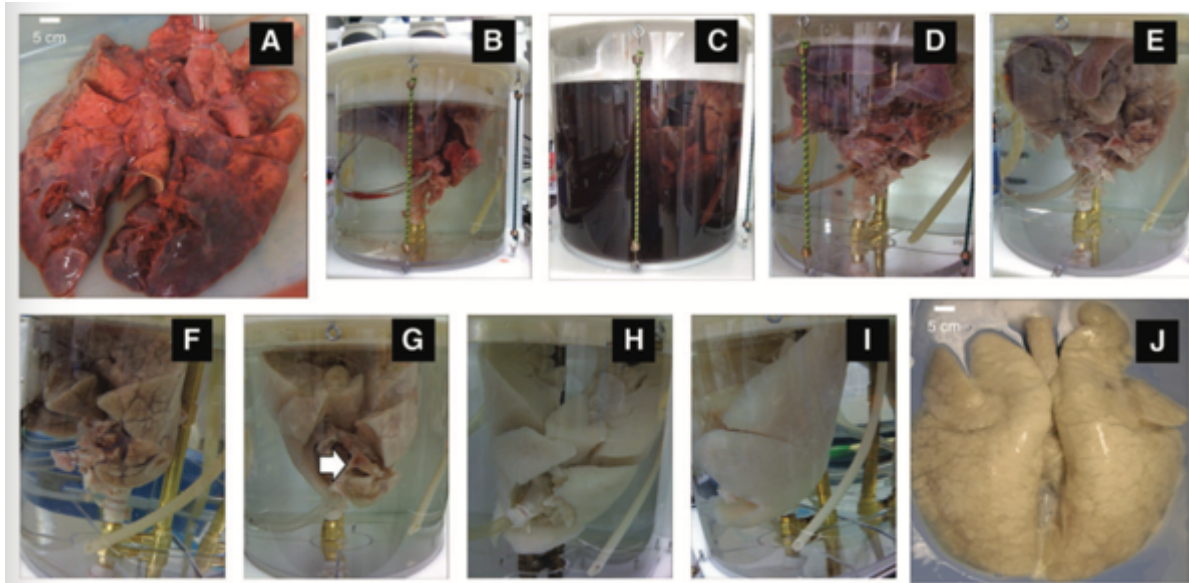


Figure 15: Procédure de traitement pour la décellularisation d'une trachée et de poumons d'un porc (d'après (100)). (A) Poumon du porc avant traitement. (B) Placement des canules dans la trachée et dans l'artère pulmonaire. (C) Début du traitement de décellularisation le premier jour, Le SDS présent dans la cuve est décoloré à cause de la présence de sang hémolysé et de débris cellulaires. (D) Deuxième jour de traitement. (E) Troisième jour de traitement. (F) Quatrième jour de traitement. Les zones blanches correspondent aux zones décellularisées. (G) Cinquième jour de traitement. La flèche blanche montre une partie proche de la carène qui n'est pas encore entièrement décellularisée. (H) Sixième jour de traitement. (I) Septième jour de traitement. (J) poumons complètement décellularisés retirés de la cuve le septième jour, vue de face.

La quantification des fibres de collagène montre que les poumons décellularisés ne contiennent que 50% du collagène d'un poumon natif considéré comme normal (100). Malgré la diminution de la teneur en collagène des poumons acellulaires, les principales structures macroscopiques et microscopiques sont conservées. L'utilisation de l'immunohistochimie ne montre pas de cellules ou de débris cellulaires après décellularisation. De plus l'immunomarquage révèle que le poumon distal contient des paquets de fibres de collagène intercalés avec de petites quantités de fibres d'élastine. La fibronectine est aussi retrouvée dans toutes les zones examinées du poumon distal. Les bronches souches principales conservent leur forme et leur structure, le collagène de type I et l'élastine conservent la même organisation architecturale que dans des bronches normales (100). Aucune différence significative de réaction des poumons au détergent entre l'homme et le porc n'a pu être mise en évidence. L'intégrité de la matrice extracellulaire a aussi été vérifiée en insufflant de l'air dans les poumons et aucune fuite d'air n'a été détectée (103). L'application d'un cycle de ventilation avec un volume allant de 15 à 100 cm³/insufflation montre que les poumons acellulaires permettent une inspiration et que le retour élastique est suffisant pour assurer une expiration passive (103).

Il est donc possible d'obtenir des poumons entiers décellularisés chez le porc et chez l'homme. Les propriétés mécaniques et structurales des poumons sont conservées. L'utilisation du SDS semble donc être prometteuse pour obtenir des poumons acellulaires qui conservent une majorité de leurs caractéristiques mécaniques, structurales et biologiques.

La comparaison de l'utilisation du SDS à celle d'un détergent zwitterionique, le CHAPS sur des poumons de rongeurs montre que dans les deux cas tout le matériel cellulaire est éliminé, notamment au moins 99% de l'ADN (107). La coloration histochimique et les tests mécaniques révèlent que le collagène et l'élastine sont conservés dans les matrices décellularisées par le CHAPS alors que dans le cas de l'utilisation du SDS une perte de collagène et une diminution de la résistance mécanique sont objectivées. L'analyse quantitative confirme ces informations avec une perte de 80% du collagène avec le SDS avec une perte de résistance associée. Pour les deux détergents, au moins 60% de l'élastine et 95% des protéoglycanes sont éliminés (107). L'élastine est essentielle pour assurer le retour passif lors de l'expiration, le maintien d'au moins quelques fibres après le processus de décellularisation est donc important pour conserver la compliance physiologique du poumon. Malgré la perte d'une grande quantité d'élastine avec les deux types de traitement, il semblerait que les fibres restantes soient suffisantes pour assurer le retour élastique nécessaire. Aucun effet significatif de l'élimination des protéoglycanes n'est objectivé (107). **L'utilisation du CHAPS semble être une bonne alternative à celle du SDS.** Selon les études, Le SDS mène à une perte plus ou moins importante des propriétés mécaniques des poumons (103)(107). Ceci peut être lié au fait que les espèces étudiées ne sont pas les mêmes et la composition de la matrice extracellulaire n'est pas identique (109). De même, le protocole appliqué n'est possiblement pas exactement le même. Il est donc important d'établir un protocole précis propre à chaque espèce. L'association Triton X-100/ SDC déstabilise moins la matrice extracellulaire que les deux autres détergents et permettrait donc de mieux conserver les propriétés mécaniques du poumon (110). Néanmoins, la recellularisation réalisée ensuite ne montre initialement pas de différences significatives en terme d'adhérence et de proliférations des cellules inoculées.

Enfin, Il existe une variété de protocoles possibles pour produire des poumons décellularisés compatibles pour l'ensemencement cellulaire et éventuellement une greffe. Toutefois il reste quelques interrogations sur ce qui constitue un support décellularisé optimal et quels devraient alors être les critères d'optimisation.

2.3.2. Supports synthétiques

Les matériaux synthétiques sont couramment utilisés. Ils peuvent être non biodégradables ou bien être dégradés par des mécanismes hydrolytiques ou enzymatiques. Leur avantage est **l'adaptabilité de leurs propriétés physiques** (90). Les **polyesters** sont souvent utilisés pour l'élaboration de tissus artificiels. En particulier, des cellules souches embryonnaires déposées sur ce genre de support avec un milieu de culture et des facteurs de croissance appropriés a déjà permis la régénération de différents types tissulaires comme des structures vasculaires et nerveuses (111). Les **hydrogels de polyéthylène glycol (PEG)** ont également été étudiés pour la culture et la différenciation des cellules souches embryonnaires afin de parvenir à différents types de tissus obtenus artificiellement. Des **auto-assemblages de peptides** ont aussi été testés pour la différenciation contrôlée des cellules souches. Ces gels forment des structures fibrillaires très fines, de l'ordre du nanomètre, similaires à la matrice extracellulaire native. Ainsi, bien que synthétiques les hydrogels permettent d'imiter la structure et les signaux retrouvés dans la matrice extracellulaire naturelle (111). Les **polymères synthétiques bio résorbables** sont très intéressants à étudier pour deux raisons précises. D'abord, ils se dégradent en formant des produits qui sont ensuite métabolisés et/ou excrétés, et parfois ne laissent finalement plus aucun matériau chez le receveur. Ensuite, ils sont extrêmement **polyvalents** puisque que leurs **propriétés physicochimiques peuvent être complètement contrôlées**. Ils peuvent donc être ajustés à l'utilisation souhaitée (85). L'un des éléments essentiel de ces polymères est leur **biocompatibilité**, ce qui implique que le support choisi ne doit **pas provoquer de réactions immunogènes ou inflammatoires délétères**. Les matériaux utilisés doivent pouvoir être **stérilisés** et doivent se dégrader sans produire de composés **cytotoxiques, inflammatoires** ou **immunogènes**. De plus, ils doivent présenter une épaisseur et un volume adaptés, ainsi qu'un microenvironnement adéquate pour réguler l'adhésion, la prolifération, la mobilité, la survie et la différenciation des cellules. Les **interactions** entre les cellules et le support synthétique doivent être optimisées car celles-ci ont un impact sur l'adhérence et la morphologie cellulaire, qui vont elles-mêmes ensuite influencer différents processus cellulaires. Ces interactions sont directement ou indirectement liées aux **caractéristiques physicochimiques** de la surface du polymère, notamment, son **hydrophilie**, sa **rugosité**, sa **crystallinité**, sa **charge** (85). Le plus souvent les supports synthétiques sont dépourvus de ligands spécifiques que les récepteurs cellulaires reconnaissent en conditions physiologiques, ainsi l'ajout de molécules de matrice extracellulaire est nécessaire pour améliorer ces interactions. La rigidité du substrat est aussi un paramètre important à considérer, puisqu'elle détermine l'organisation du cytosquelette des cellules et les fonctions qui y sont associées (85). Elle influence la prolifération cellulaire. En général, une rigidité du support similaire à celle du tissu natif favorise le phénotype cellulaire correspondant à ce tissu. La **porosité**, la taille des pores et les interconnexions entre les pores sont des caractéristiques morphologiques du support qui ont une influence directe sur les interactions entre cellules. Une porosité importante

est bénéfique pour favoriser l'infiltration des vaisseaux mais elle compromet en général les propriétés mécaniques du support. La taille des pores influence l'infiltration cellulaire, les interactions entre cellules et le transport des nutriments et des métabolites (85). La géométrie du réseau de pores est aussi à prendre en considération. Elle affecte l'organisation des cellules sur le support. En général, des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu natif sont recherchées. Une structure faible ne sera pas capable de résister aux forces biomécaniques retrouvées *in vivo*. Au contraire, une structure très solide va engendrer des contraintes, c'est à dire que la charge physique est transférée au support, ce qui mène à une stimulation mécanique insuffisante du tissu qui entoure l'implant (85). De plus, la dégradation des polymères biorésorbables mène à des modifications de leurs propriétés physiques en fonction du temps. Ainsi la capacité à **contrôler les modalités de dégradation** de ces polymères est recherchée. Leur dégradation dépend de différents paramètres, et leur mode de dégradation varie aussi : érosion de surface, érosion en profondeur, intervention d'enzymes. Idéalement, le support doit **maintenir ses propriétés mécaniques le temps que la reconstruction ait lieu** (85). Enfin, le taux de dégradation du support détermine l'espace disponible pour la croissance du tissu une fois implanté chez le receveur. Dans un scénario optimal, le taux de dégradation et le taux de formation tissulaire doivent être coordonnés afin de fournir une stabilité mécanique et structurale au greffon. Une série de polymères biorésorbables a été étudiée pour leur application en bio ingénierie tissulaire et en particulier les polyesters (85).

Plusieurs procédés de fabrication ont été développés pour former des supports synthétiques tridimensionnels. La fabrication de tels polymères implique généralement plusieurs étapes, une étape de **fusion** des polymères, une étape de **dissolution** dans des solvants organiques, une étape de **traitement** par des gaz ou des fluides sous haute pression et/ ou une étape de lessivage. La plupart des méthodes utilisées permettent **l'incorporation de molécules bioactives** dans la matrice du polymère. **Cependant, les conditions de fabrication du support peuvent altérer l'activité de ces molécules** (85).

Enfin, malgré les grandes possibilités offertes par les supports synthétiques (en terme de substrat, des formes,...), il semble que les supports organiques décellularisés soient au centre des recherches actuelles car ils sont plus à même de respecter l'organisation tridimensionnelle physiologique des organes et *a fortiori* du poumon.

Après avoir déterminé les cellules disponibles pour la culture ainsi que les supports possibles pour leur ensemencement, nous allons nous pencher plus spécifiquement sur la mise en œuvre de la culture tridimensionnelle en elle-même.

2.4. RECONSTITUTION EN PRATIQUE

Deux techniques sont décrites pour parvenir à un organe dit artificiel, la recellularisation et la bioimpression.

2.4.1. La recellularisation.

L'ingénierie des organes et des tissus *ex vivo* requiert la culture de cellules avec une forte densité sur des supports biorésorbables dans un environnement contrôlé. Différentes difficultés doivent être surmontées comme **un ensemencement cellulaire uniforme**, un **apport nutritionnel suffisant** et la **suppression des déchets**. De plus, l'environnement de culture doit être maintenu sous contrôle, notamment la **température**, le **taux d'oxygène**, le **pH**, les **stimulations biochimiques** et **biomécaniques**. La recellularisation est un processus long qui nécessite une source de cellules adéquate, une méthode d'ensemencement optimale et une méthode de culture correspondant aux conditions physiologiques. Pour déposer les cellules, un système de perfusion pulsatile ou continue, ou bioréacteur, est indispensable afin de délivrer de l'oxygène aux cellules et de maintenir le milieu à une température constante. Les liquides de perfusion dérivent des milieux de culture utilisés pour les cellules ensemencées. Ils doivent contenir des facteurs de croissance et des molécules spécifiques de l'organe concerné (55). Comme évoqué précédemment, différents types cellulaires ont été étudiés comme candidats potentiels pour une recellularisation efficace des supports acellulaires, notamment des suspensions de cellules pulmonaires, des cellules progénitrices, des cellules souches adultes et embryonnaires, et des cellules souches pluripotentes induites (112). Dans le cas de l'utilisation de cellules souches embryonnaires, celles-ci peuvent être pré-différenciées en un type cellulaire spécifique avant l'ensemencement ou bien laissées à l'état indifférencié (61). Malgré les variations de compositions de la matrice obtenue après la décellularisation du poumon, il semblerait que les cellules inoculées et ensemencées parviennent à adhérer et à recellulariser le poumon quel que soit le protocole de décellularisation utilisé (110).

Le type de cellules sélectionné pour ensemercer les poumons est d'abord cultivé sur un support plat dans un milieu de culture approprié. Les cellules sont ensuite **décollées** de ce support, avec de la trypsine par exemple, puis remises en **suspension** avant **d'être introduite sur le support acellulaire** (113). Le poumon dispose de deux voies pour l'ensemencement, les **vaisseaux sanguins**, notamment l'artère pulmonaire, et les **voies respiratoires**.

En plus des cellules de l'épithélium pulmonaires, des cellules **endothéliales** et des **fibroblastes** doivent être ensemencés sur le support. En effet les cellules endothéliales permettent d'avoir une barrière non thrombotique dans la matrice acellulaire de l'organe et assure que le flux sanguin soit confiné à l'espace vasculaire lorsque l'organe est réimplanté *in vivo* (53). Les propriétés de l'endothélium des vaisseaux pulmonaires sont primordiales pour la réalisation de nombreux processus,

incluant les échanges gazeux, la régulation du passage des fluides et des solutés entre le sang et l'espace interstitiel et ces cellules font également partie de la charpente qui soutient l'épithélium alvéolaire. L'ensemencement du compartiment vasculaire de poumon décellularisé révèle une distribution inégale avec une couverture incomplète des vaisseaux (53). Des phénomènes thrombotiques ainsi qu'une insuffisance organique terminale peuvent se développer. Ceci montre l'importance à accorder à l'étude de la recellularisation de l'endothélium, notamment les types cellulaires à utiliser, leur potentiel de croissance et leur voie d'administration (53). Les phénomènes thrombotiques sont en effet une des limites à l'utilisation de ces structures pour la réimplantation *in vivo*. L'avantage d'utiliser des organes complets décellularisés est la conservation du réseau de vaisseaux sanguins mais l'utilisation de ceux-ci nécessitent une endothélialisation adéquate (53). Les fibroblastes qui sécrètent et remodelent la matrice extracellulaire et améliorent les fonctions des cellules du parenchyme pulmonaire sont indispensables pour la recellularisation complète (97).

Les cellules peuvent être déposées en conditions **statiques** en présence d'un milieu de culture défini. Un des inconvénients majeurs de cette méthode est que la plupart des cellules ne **pénètrent pas au delà de quelques centaines de microns** dans le support, ce qui mène à une **croissance hétérogène du tissu** (85). Pour améliorer ce point, les cellules peuvent être **ensemencées par injection**, par **perfusion**, par **centrifugation** ou bien déposées par **aspiration** (85). Toutes ces techniques ont montré une **amélioration de la distribution** des cellules (85). Dans le cas de l'ensemencement par injection il est facile de contrôler le lieu de dépôt des cellules mais cette technique requiert de multiples inoculations en différentes parties de la matrice et mène à une densité cellulaire très importante localement qui peut potentiellement former des agrégats cellulaires puis mener à de la nécrose (85). Dans le cas de la perfusion, les cellules sont projetées dans le parenchyme par un flux ce qui peut endommager la matrice mais la distribution des cellules est plus simple par rapport à l'utilisation des injections et permet d'obtenir une distribution plus homogène (85). Par contre la matrice est soumise à des forces de cisaillement pendant toute l'opération (85). L'ensemencement par perfusion a été réalisé sur des poumons de rats décellularisés, cent millions de cellules épithéliales néonatales ont été introduites dans les voies aériennes, suivi d'une nuit de culture statique pour faciliter l'adhérence des cellules. Les poumons ont ensuite été perfusé *via* la vascularisation et ventilé *via* les voies de conduction de l'air. Trente millions de cellules endothéliales ont été introduites par injection dans les vaisseaux. La ventilation pendant l'administration des cellules favorise la diffusion des cellules endothéliales le long de l'axe vasculaire. Cette stratégie d'ensemencement permet une couverture satisfaisante de la matrice pulmonaire décellularisée (53). Cette technique de recellularisation permet d'obtenir des alvéoles comparables en nombre en taille à celles d'un poumon natif (114). Quoiqu'il en soit, si des cellules progénitrices ou souches sont utilisées et non des cellules matures il n'y a pas besoin d'une couverture parfaite et complète de la matrice dans un premier temps car ces cellules sont censées se multiplier et mûrir après leur dépôt (97). Dans le cas

de l'utilisation de support en polymères hydrophobes, le recours à l'éthanol et l'eau pour pré humidifier montre une amélioration de la pénétration des cellules dans les pores de l'échafaud (85). De même, l'hydrolyse de la surface du polymère ou bien l'infiltration de celui-ci avec un polymère hydrophile augmente la cellularité de l'édifice. Par ailleurs dans ces conditions, la diffusion des molécules étant le principal moyen d'apporter les nutriments et de se débarrasser des déchets, une moins bonne survie des cellules est souvent observée dans la partie centrale de la construction, en raison du gradient des nutriments et des métabolites générés le long du support. (85) Le support peut être placé sur un fil de fer dans un contenant avec un agitateur magnétique qui crée donc une suspension cellulaire bien mélangée, aboutissant à un ensemencement dynamique du support. La vitesse de rotation de l'agitateur est à adapter de telle façon qu'elle soit suffisante pour favoriser le dépôt des cellules et leur pénétration dans le support sans provoquer de lésions cellulaires. Le support peut également être placé dans un récipient cylindrique rotatif. La force centrifuge générée par la rotation du cylindre contrebalance la gravité, ce qui permet de maintenir le support en suspension dans le milieu de culture. (85)(Figure 16). Les matrices ensemencées sont ensuite maintenues **dans des systèmes de cultures adéquates ou bioréacteurs qui permettent la survie et le fonctionnement des cellules.**

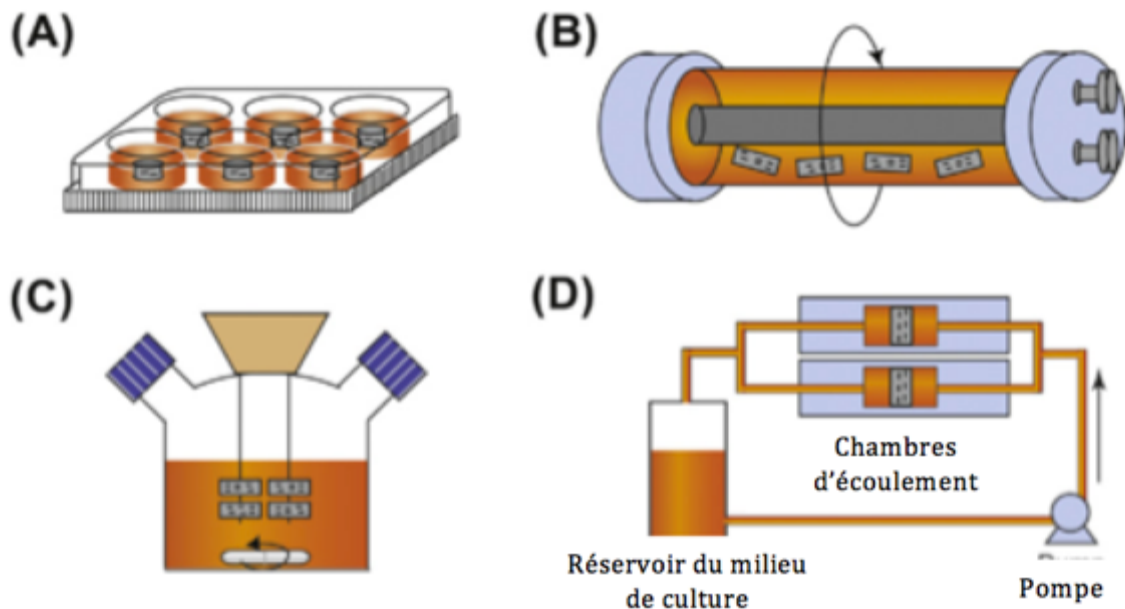


Figure 16 : Différentes techniques de cellularisation d'un support (d'après (85)). (A) Ensemencement statique ; **(B)** ensemencement en tube rotatif ; **(C)** Ensemencement avec agitateur magnétique, **(D)** Ensemencement par perfusion

2.4.2. La bio-impression

Les progrès de **l'impression tridimensionnelle** permettent désormais son utilisation pour **l'ingénierie tissulaire**. La **superposition couche par couche de matériel biologique et biochimique, associée à un contrôle du placement dans l'espace des composants fonctionnels est utilisée pour former des structures tridimensionnelles**.

La bio-impression regroupe trois approches différentes : le **biomimétisme**, **l'auto-assemblage** et la **construction de mini-tissus** (115). Le biomimétisme permet d'obtenir une reproduction à l'identique des composants cellulaires et acellulaires d'un tissu ou d'un organe. La compréhension du microenvironnement, en particulier l'arrangement spécifique des cellules fonctionnelles et des cellules qui les supportent, les concentrations en facteurs solubles et insolubles, la composition de la matrice extracellulaire est indispensable. L'utilisation du déroulement du développement embryonnaire d'un organe comme guide est la seconde clef de la réplication de tissus biologiques. Les premiers composants cellulaires d'un tissu en développement produisent leur propre matrice extracellulaire et les signaux intercellulaires appropriés et s'assemblent de manière autonome pour parvenir à la microarchitecture et aux fonctions biologiques correspondantes au tissu en question. Cette capacité d'auto-assemblage correspond aux sphéroïdes déjà évoqués dans un contexte sans support (116). Les organes et tissus peuvent être subdivisés en sous-unités fonctionnelles et structurales ou mini tissus. Ces mini-tissus peuvent être fabriqués et assemblés en des sous ensembles plus grands par conception rationnelle ou auto-assemblage ou encore par combinaison des deux (116). Il existe deux stratégies principales, la première consiste en un auto-assemblage des cellules sous forme de sphères qui s'assemblent elles-mêmes en un macro-tissu avec une organisation et une architecture inspirées de la biologie (116). La seconde, consiste en l'élaboration de reproductions très précises et haute résolution d'unités tissulaires qui sont ensuite amenées à s'auto-assembler en un macro-tissu fonctionnel. L'association de ces deux stratégies est utile pour imprimer une structure biologique tridimensionnelle complexe avec de multiples propriétés et composants fonctionnels, structuraux et mécaniques (115). Les étapes majeures dans la bio-impression sont la **conception** et la **représentation**, le choix des **matériaux** et des **cellules**, et **l'impression** du tissu construit. Le tissu obtenu est ensuite transplanté, parfois après une période de maturation *in vitro*, ou bien maintenu *in vitro* pour réaliser des analyses (115).

Afin de reproduire l'architecture complexe et hétérogène d'un organe fonctionnel, une connaissance complète de sa composition et de son organisation est obligatoire (115). **L'imagerie médicale** est un outil indispensable pour obtenir des informations sur la structure et le fonctionnement à l'échelle cellulaire, tissulaire, organique et à l'échelle de l'organisme entier. Les techniques d'imagerie les plus courantes dans ce contexte sont les rayons X avec un scanner et l'imagerie par

résonnance magnétique (IRM) (115). Des **modélisations faites à l'ordinateur** sont ensuite utilisées pour obtenir **des modèles tridimensionnels des organes**. Le modèle obtenu peut dès lors être **utilisé directement comme patron pour l'impression tridimensionnelle**. Plusieurs techniques de bio-impression tissulaire sont décrites, l'impression par **jets**, par **micro-extrusion**, ou **assistée par laser**. Ces différentes techniques n'offrent **pas les mêmes caractéristiques en terme de résolution, de viabilité cellulaire et de matériel biologique utilisé** (115).

L'impression par **jets** est le type d'impression le **plus utilisé à la fois pour des applications biologiques et non biologiques**. Ces imprimantes utilisent une force thermique ou acoustique pour éjecter des gouttes de liquide sur un substrat qui supporte ou forme une partie de la construction finale (117)(118)(119). Les imprimantes thermiques fonctionnent par réchauffement électrique de la tête d'impression qui permet de produire de petites impulsions au niveau de la buse et donc provoque le dépôt de gouttelettes. L'augmentation de la température localement n'a pas de conséquences sur la stabilité des molécules comme l'ADN ni sur la viabilité des cellules (120)(121). Les avantages de ce type d'imprimantes sont la **vitesse d'impression**, leur faible coût et leur grande disponibilité (115). Cependant, le **risque** d'exposer les cellules et les matériaux utilisés à un **stress mécanique et thermique**, la non uniformisation de la taille des gouttelettes, l'encrassement fréquent de la buse, et l'encapsulation aléatoire des cellules sont des inconvénients fréquemment rencontrés lors de son utilisation (115). D'autres imprimantes de ce type contiennent un cristal piézoélectrique qui génère une **onde acoustique** dans la tête d'impression qui permet de **fractionner** le liquide en gouttelettes à **intervalle de temps régulier**. D'autres imprimantes encore utilisent une onde acoustique associée à des **ultrasons** pour éjecter les gouttelettes. Les paramètres des ultrasons comme leur amplitude, leur durée et leur rythme peuvent être ajustés afin de **contrôler la taille** des gouttes et leur **cadence** d'éjection (115). Les avantages de ces imprimantes acoustiques sont la possibilité de produire des gouttelettes de taille **uniforme** et de contrôler cette taille, ainsi que la **direction** de l'éjection, elles permettent aussi d'exposer les matériaux et les cellules à des **températures moins élevées**. De plus ces imprimantes peuvent combiner plusieurs éjecteurs, ce qui facilite l'impression simultanée de plusieurs types de cellules et de matériaux (122). Enfin, une des limites de toutes ces imprimantes est la **viscosité** des substances utilisées, car une viscosité importante nécessite une **force d'éjection élevée** (115). De plus, le matériel biologique doit être sous forme **liquide** pour pouvoir former des **gouttelettes**, mais une fois imprimé ce liquide doit **pouvoir s'organiser en une construction solide tridimensionnelle fonctionnelle**. Cette limite peut être surmontée par l'utilisation de produits chimiques ou d'ultraviolets ou par des modifications de pH après l'impression. Mais l'utilisation de tels procédés impliquent des **modifications des composants de la matrice extracellulaire** et peut aussi être toxique pour certaines cellules, ce qui amène à une **diminution de la viabilité et de la fonctionnalité** du tissu obtenu (115). Enfin il est difficile d'obtenir une densité cellulaire compatible avec un tissu fonctionnel. Ces imprimantes offrent néanmoins des

avantages puisqu'elles sont relativement peu coûteuses, proposent une haute résolution et une grande vitesse d'impression et sont compatibles avec de nombreux matériaux biologiques (115).

L'impression par **micro-extrusion** est la technique la plus accessible et la plus commune pour l'impression tridimensionnelle non biologique (115). Ces imprimantes permettent de déposer un matériau sur un substrat après passage dans une micro-aiguille. **Des agrégats de cellules sont poussés dans cette micro-aiguille**, en alternance avec un **hydrogel** qui sont donc déposés en deux dimensions. La micro-aiguille se déplace dans les trois dimensions de l'espace selon les informations données par la modélisation obtenue informatiquement et chaque couche formée successivement sert de base pour la suivante (115). Cette technologie permet **de déposer des cellules avec une forte densité** (119). Or obtenir une forte densité cellulaire est un des défis de l'ingénierie tissulaire. Les agrégats cellulaires déposés successivement fusionnent pour former finalement une construction macroscopique cohésive. La **viabilité cellulaire** obtenue avec cette technique est **moins bonne** qu'avec l'impression par jets (115). La survie cellulaire est comprise entre 40 et 86% et diminue avec l'augmentation de la pression d'extrusion et la diminution du diamètre des aiguilles utilisées. La pression peut être diminuée et les aiguilles utilisées peuvent être de plus grand calibre mais la résolution du tissu obtenu et la vitesse d'impression sont alors moins bonnes. De plus les cellules ne doivent pas seulement survivre mais doivent aussi rester fonctionnelles. Ainsi il est important de **trouver un juste équilibre entre la résolution du tissu obtenu et la viabilité et la fonctionnalité des cellules**. L'association d'hydrogels aux agrégats cellulaires a pour but de maintenir la viabilité cellulaire. Ils sont mécaniquement plus solide et disposent également de propriétés mécaniques qui soutiennent la survie des cellules une fois déposées (115).

L'impression assistée par **laser** est **de plus en plus utilisée pour l'ingénierie tissulaire**, bien qu'elle reste encore moins commune que les deux types d'impressions précédentes (115). Cette technologie a montré son efficacité avec du matériel biologique comme des peptides, de l'ADN et des cellules (123)(124). Un faisceau laser permet de transférer le matériau souhaité depuis un substrat donneur vers un substrat receveur. La résolution de l'impression est influencée par de nombreux facteurs, dont la fluence du laser, c'est à dire l'énergie qu'il délivre par unité de surface, la tension superficielle, la mouillabilité du substrat receveur, l'épaisseur de la lame d'air entre les deux substrats, et la finesse et la viscosité de la couche de matériel biologique à transférer (125). Cette technique d'impression permet d'éviter les problèmes liés à la buse ou aux aiguilles d'impression puisqu'il n'y en a pas. Elle conserve également la viabilité et la fonctionnalité des cellules. L'une des limites de cette technologie est la préparation de chaque substrat donneur qui est très chronophage et peut vite devenir très onéreuse si de nombreux types cellulaires et hydrogels sont nécessaires. Cette technique reste à améliorer mais semble prometteuse pour l'avenir de l'ingénierie tissulaire (115).

Les matériaux et hydrogels qui composent les supports associés aux cellules sont ceux décrits dans la partie précédente, à savoir des substrats synthétiques ou biologiques comme des mélanges de protéines de la matrice extracellulaire ou la matrice extracellulaire obtenue à partir d'organes décellularisés. Un des enjeux de la bio-impression tridimensionnelle est de développer des méthodes pour incorporer ces matériaux dans les constructions, tout en s'assurant qu'ils se dégradent de façon appropriées sans produire de composés toxiques et sans provoquer de réaction inflammatoire ou immunitaire (115).

Toutes les cellules sélectionnées pour l'impression doivent être capables de se **multiplier** en un nombre suffisant. Le contrôle précis de la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* est importante pour la bio-impression. Une multiplication trop faible mènera à une **perte de viabilité** de l'organe transplanté, au contraire une prolifération trop importante mènera à une **hyperplasie** ou à un phénomène **d'apoptose** cellulaire (115). Par ailleurs, initialement un fort taux de prolifération est souhaité afin de recouvrir la construction, mais sur le long terme, la prolifération cellulaire doit être maintenue à un taux adapté pour assurer l'homéostasie du tissu sans hyperplasie (115). Les cellules choisies doivent être capables de supporter le processus d'impression mais à priori les cellules décrites précédemment sont de bonnes candidates (Figure 17).

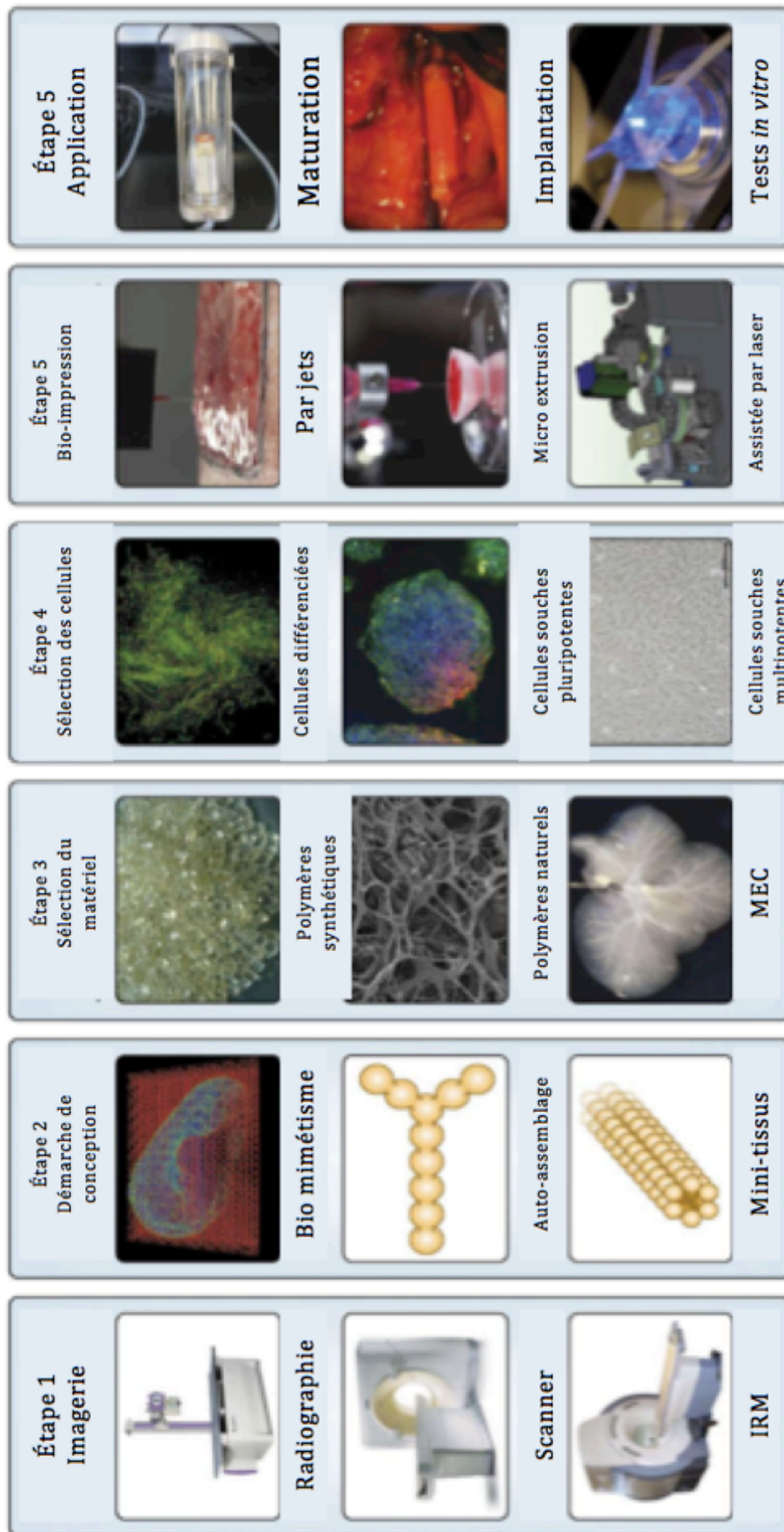


Figure 17: Procédure de bio-impresion de tissus en trois dimensions (d'après (115)).

Actuellement, des essais d'impressions tridimensionnelles de vaisseaux, de cartilage, de tissus cardiaque et hépatique ont déjà été réalisées (119).

Bien que l'impression tridimensionnelle de tissus et organes en soit à ses débuts, un patron de trachée humaine en matériau bio-résorbable a déjà été obtenu par micro-extrusion (126), ce qui est très encourageant pour l'avenir de ces techniques et notamment pour l'obtention de poumons entièrement créés à partir d'une impression.

2.4.3. Caractéristiques des systèmes de culture

Les conditions de culture d'un organe complet doit supporter la survie et le fonctionnement cellulaire pour au moins plusieurs semaines. *In vitro*, l'endothélialisation des vaisseaux sanguins prend deux semaines et l'obtention des cellules peut prendre plus d'un mois (97). Un **bioréacteur** est nécessaire pour la régénération des organes, afin de délivrer les nutriments jusqu'à leur cœur. Il peut s'agir d'un appareil très simple avec un système de pompe et une cuve pour l'organe avec au moins une voie d'entrée et une voie de sortie. Des systèmes plus sophistiqués ont aussi été développés et permettent de contrôler et modifier un certain nombre de paramètres comme le débit, la pression, l'oxygénation, et autres. L'utilisation de stimuli spécifiques de l'organe est également cruciale pour son bon développement fonctionnel. Des signaux mécaniques peuvent faciliter le maintien d'un phénotype donné ou bien stimuler la différenciation de cellules progénitrices (60). Ils sont capables de conserver une construction cellulaire pendant au moins trois semaines, facilitant ainsi la culture des cellules dans un environnement tridimensionnel sur le long terme (127). Le bioréacteur permet d'apporter aux cellules l'oxygène dont elles ont besoin, et maintenir la culture à une température constante, la température physiologique en général. Les solutés utilisés dérivent des milieux de cultures nécessaires à la croissance de ces cellules. Ils contiennent notamment des **facteurs de croissance**, comme l'EGF, et des molécules plus spécifiques à la croissance de l'organe (128). Durant le développement du tissu pulmonaire, **l'étirement provoqué par les mouvements respiratoires** est un facteur important intervenant dans la différenciation de l'épithélium, ainsi la mise en place d'une **ventilation du poumon artificiel** a un effet bénéfique sur la survie des cellules des alvéoles distales et l'évacuation des sécrétions épithéliales de l'arbre aérifère, ainsi que sur la prolifération et la différenciation de l'épithélium (53) (97) (114). La ventilation des poumons avec le milieu de culture est plus bénéfique que la ventilation avec de l'air pouvant au contraire mener à une dilatation des alvéoles et à la formation de débris cellulaires, probablement dû à un collapsus des alvéoles lors de l'exhalation (129). Le milieu de culture permet d'apporter plus de nutriments aux cellules et ainsi favoriser leur prolifération et leur différenciation (129). La perfusion vasculaire seule sans ventilation n'est pas suffisante pour maintenir la survie des cellules et la différenciation cellulaire (129). Les bioréacteurs utilisés nécessitent donc

l'inclusion d'éléments qui imitent l'environnement biophysique *in vivo* pour induire la maturation et la fonction du tissu.

Les bioréacteurs sont composés de plusieurs éléments constitutifs, une chambre de culture, un réservoir de fluide, un système d'échange de fluide et de gaz et les différents instruments pour le monitoring et le contrôle. Un des prérequis essentiels de tout élément du bioréacteur qui se trouve en contact avec les cellules et le milieu de culture est sa biocompatibilité. Contrairement aux biomatériaux utilisés pour des applications cliniques, qui sont donc conçus pour leur activité biologique, les matériaux utilisés dans les bioréacteurs doivent être le plus inertes et neutres possibles afin de ne pas affecter les cellules et les facteurs moléculaires du milieu de culture (130). Les composants doivent être stérilisés et la stérilité doit être conservée durant toute la période de culture. Ils doivent également permettre de pouvoir faire des prélèvements du tissu en construction et du milieu de culture de manière stérile mais aussi des examens d'imagerie ou l'application de stimuli extérieurs (130).

Enfin, le bioréacteur permet d'assurer le bon développement de l'organe obtenu artificiellement puis de le maintenir en vie. C'est dans ce bioréacteur que les poumons sont maintenus par exemple jusqu'à leur réimplantation ou que des modèles de maladies données pourront être obtenus pour approfondir nos connaissances les concernant. C'est cet aspect qui nous intéresse le plus dans le cadre de la médecine vétérinaire.

2.4.4. Évaluation et validation des modèles obtenus

L'évaluation des modèles de tissu respiratoire obtenus implique la mesure de la **fonctionnalité des cellules** et de la **réponse cellulaire** (127). Le contrôle du **type cellulaire**, de la **survie** des cellules, de leur **adhérence** au support et de la formation de **produits cellulaires** est nécessaire pour confirmer le bon fonctionnement du modèle. Dans le cas de modèle de poumons physiologiques, les molécules produites par les cellules épithéliales servent à assurer que ces cellules sont bien fonctionnelles. Ces molécules comprennent les **protéines A et D du surfactant** synthétisées par les pneumocytes de type II et la **protéine SCGB1A1** produite par les cellules Club (127). Si le modèle est obtenu à partir de cellules souches embryonnaires ou fœtales, il est possible d'utiliser des **marqueurs de la différenciation cellulaire** comme TTF-1 (Thyroid transcription factor 1) qui est produit par les cellules épithéliales immatures, ainsi que la protéine C du surfactant produite par les pneumocytes de type II plus matures. De même la mise en évidence de toute production de molécules ou biomarqueurs caractéristiques d'un type cellulaire confirme le bon développement du tissu. Les modèles étudiant la toxicologie suivent la viabilité cellulaire et les marqueurs d'apoptose (131). Enfin, les modèles créés pour étudier la pathogénie et les maladies infectieuses requièrent la connaissance de la maladie à modéliser ainsi que les cellules impliquées dans la réponse pathologique. La capacité à démanteler une réponse en

utilisant le moins de types cellulaires possibles nécessaires pour provoquer cette réponse est ce qui rend la conception de ces modèles à la fois difficile et captivante. Une fois qu'un modèle de maladie est obtenu il doit être **standardisé** (127). De simples modèles de micro-poumons avec un ou deux types cellulaires sont assez simples à standardiser mais des systèmes complexes macro-physiologiques qui nécessitent un grand nombre de types cellulaires différents, et la formation de tissu avec des schémas particuliers comme l'endothélium ou le poumon distal sont beaucoup plus compliqués. Les modèles nécessitant une réponse immunitaire fonctionnelle sont également difficiles à créer et à standardiser. La validation de la production de produits de certaines lignées cellulaires du poumon ou l'expression de protéines spécifiques des membranes de ces cellules ou encore de facteurs de transcription doit être réalisée par PCR (Réaction en chaîne par polymérase), électrophorèse ou encore d'autres méthodes en particulier lors de la conception de modèles plus recherchés de pathogénie ou de maladies infectieuses du poumon (127).

Actuellement nous disposons donc de tous les outils et des ressources nécessaires pour exploiter la culture tridimensionnelle du poumon afin d'approfondir nos connaissances sur sa physiologie et sa pathologie.

3. PERSPECTIVES EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

La reproduction tridimensionnelle de poumon apparaît comme un outil extrêmement intéressant et les connaissances acquises commencent à être suffisantes pour envisager son utilisation dans la modélisation de certaines maladies. En médecine vétérinaire, comme en médecine humaine, les affections pulmonaires sont nombreuses. Leur étiologie et leur pathogénie ne sont pas toujours entièrement connues, les méthodes diagnostiques et les traitements pas nécessairement adaptés et maîtrisés. C'est plus particulièrement dans ce cadre que la création de tels modèles prend tout son sens. Plusieurs affections courantes rencontrées chez différents mammifères domestiques et dont certains aspects sont encore imprécis ont été sélectionnées à titre d'exemple, pour démontrer les perspectives offertes par l'ingénierie d'organes en médecine vétérinaire.

3.1. LA BRONCHITE ASTHMATIQUE CHEZ LE CHAT.

La bronchite asthmatique du chat est une affection courante et évolutive pour laquelle il n'existe actuellement pas de traitement étiologique et qui, en cas de crise sévère, peut mener à la mort soudaine de l'animal. Le chat dispose par ailleurs de particularités histologiques qui lui sont propres et qui interviennent dans la pathogénie de cette affection. Des modèles déjà existants issus d'autres animaux ne peuvent donc pas pleinement répondre aux questions qui demeurent sur cette maladie.

3.1.1. Particularités histologiques de l'appareil respiratoire du chat

Chez le chat, le tissu musculaire lisse est présent jusqu'au fond du tractus respiratoire. Le cartilage bronchique est hyalin donc rigide vers la lumière et plus élastique vers la périphérie. Cette proportion se modifie au profit du cartilage élastique à mesure que le diamètre des bronches diminue: à partir des bronchioles, seul ce cartilage est présent. Les récepteurs sensoriels sont présents en grande quantité tout le long de l'arbre trachéobronchique, jusque dans la paroi des alvéoles (132). À ce niveau ils sont toujours capables de réagir à divers stimuli en provoquant un bronchospasme. De plus les glandes sécrétrices sont observables jusqu'aux bronchioles respiratoires. Ceci n'entre pas dans la pathogénie du bronchospasme, mais est un des facteurs favorisant l'obstruction bronchique chez le chat asthmatique (132). Ces particularités histologiques expliquent la plus **grande réactivité** des poumons du chat et la fréquence élevée des accès de bronchospasme dans cette espèce.

3.1.2. Étiologie, pathogénie, physiopathologie, diagnostic et traitements actuels

3.1.2.1. Définition et étiologie

La bronchite asthmatique du chat, autrement appelée bronchite allergique ou bronchite chronique, est l'une des affections respiratoires les plus courantes dans cette espèce et toucherait environ 1% de sa population (133). Il s'agit d'une affection **obstructive chronique**. Elle a été décrite pour la première fois dans la littérature vétérinaire par Hill en 1906 (134). Elle se manifeste cliniquement par de la toux, une respiration sifflante, une intolérance à l'effort et une détresse respiratoire avec dyspnée expiratoire. Elle est caractérisée par une **inflammation des voies respiratoires basses** sans cause évidente identifiable. Toutefois il n'existe pas de réel consensus sur sa définition ni sur les critères concrets permettant de la discriminer des autres affections inflammatoires de l'appareil respiratoire profond (133). Les chats jeunes et d'âge moyen (environ 4-5 ans) sont les plus souvent atteints et une prédisposition chez les chats siamois pourrait exister mais toutes les races de chats sont concernées (135). Toutefois ces données épidémiologiques restent controversées car les animaux présentés en consultation souffrent souvent d'une toux évoluant depuis un certain temps. Cette maladie est la conséquence d'une **réponse immunitaire excessive, d'une hyperréactivité bronchique** et d'un **appareil mucociliaire déficient**. La maladie est la résultante d'une combinaison de facteurs dont le plus important est une prédisposition génétique au développement d'une **hypersensibilité de type I** (136). L'inflammation induite provoque une hyperréactivité bronchique et des anomalies de l'appareil mucociliaire (136).

3.1.2.2. Physiopathologie et pathogénie

Les signes cliniques varient d'une **simple toux intermittente à un syndrome de détresse respiratoire sévère** causés par une obstruction des voies respiratoires due à une inflammation bronchique avec contraction des fibres musculaires lisses, œdème de l'épithélium et hypertrophie et hyperactivité des glandes muqueuses (135).

La diminution du flux d'air dans les petites voies respiratoires est la conséquence d'une production excessive de **mucus**, de **l'œdème**, de **l'infiltration cellulaire** et de la **contraction des muscles lisses**. Ainsi une diminution de 50% du diamètre de la lumière des voies respiratoires amène à une augmentation de la résistance de l'ordre de 16 fois (135). Une obstruction sévère des voies respiratoires les plus profondes chez les chats atteints d'asthme peut mener à une **hyperinsufflation** des poumons car ceux-ci deviennent incapables de réaliser une exhalation complète via les voies de conductions rétrécies (135). L'air reste donc piégé. Cette inflammation chronique avec obstruction peut alors conduire à une **augmentation importante de la pression intrapulmonaire** sur de longues périodes et provoquer une dilatation permanente des voies respiratoires ou **bronchiectasie** et une perte de la structure élastique du parenchyme pulmonaire,

encore appelée **emphysème** (135). Dans d'autres cas, l'obstruction complète d'une bronche principale amène à l'**atélectasie** du lobe concerné car l'air n'est plus capable d'y entrer ou d'en sortir et l'air résiduel se résorbe. Pour des raisons encore inconnues, il semblerait que le lobe moyen droit soit plus souvent atteint d'atélectasie que les autres lobes chez les chats asthmatiques (135). La toux peut être induites par différents facteurs chez le chat, incluant la compression des voies respiratoires, la présence d'un corps étranger, l'inhalation de gaz nocifs et la présence de tissu, de mucus ou de fluides dans l'arbre aérifère. Dans le cas de la bronchite asthmatique, la toux résulte de la stimulation de récepteurs à cause de la présence excessive de mucus et de médiateurs de l'inflammation provenant des bronches contractées et inflammées. (135).

L'asthme est caractérisé par une accumulation localisée de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, et en particulier **d'éosinophiles** et de **lymphocytes activés**. Les éosinophiles semblent être les premières cellules effectrices dans le développement de l'asthme bronchique chez le chat comme chez l'homme (135). La protéine cationique retrouvée en grande quantité dans les granules des éosinophiles est libérée dans les voies respiratoires ce qui provoque une perturbation de l'épithélium et une **hyperréactivité musculaire** (135). Des études réalisées chez la souris ont montré que l'**interleukine-5 (IL-5)** sécrétée par les lymphocytes T activés joue un rôle pivot dans la migration des éosinophiles activés jusqu'aux voies respiratoires (137). Les voies respiratoires reçoivent une innervation parasympathique et sympathique *via* le nerf vague et une innervation sympathique via le nerf thoracique. Une stimulation cholinergique déclenche une sécrétion glandulaire, ainsi que la contraction des muscles bronchiques et une vasodilatation et augmente la production de mucus. Le système adrénergique des voies respiratoires dispose de récepteurs β_2 et leur activation entraîne une relaxation des muscles bronchiques et diminue la production de mucus. L'activité des lymphocytes T et des éosinophiles participe à un déséquilibre entre les systèmes adrénergique et cholinergique, ce qui favorise d'autant plus l'hyperréactivité déjà évoquée.

La réaction **d'hypersensibilité de type I** est caractérisée par deux phases, une phase de **sensibilisation** durant laquelle le chat inhale un allergène de son environnement et une phase **d'hypersensibilité** qui correspond à une nouvelle exposition à l'allergène auquel le chat a été sensibilisé (136). Lors de la phase de sensibilisation, la substance incriminée est phagocytée par les cellules dendritiques qui migrent vers les nœuds lymphatiques médiastinaux. La présentation de l'antigène aux lymphocytes provoque une réponse des **lymphocytes T helper 2 (T_H2)** principalement. Ce phénomène serait influencé par des facteurs génétiques. La conséquence de ce type de réponse immunitaire est la libération d'une grande quantité **d'interleukine-4 (IL-4)** qui stimule la maturation des **lymphocytes B** en plasmocytes qui produisent des **immunoglobulines de type E (IgE)** (136). Les IgE sécrétées se fixent à la surface des mastocytes et l'individu est désormais sensibilisé à cet allergène. Lors d'une exposition ultérieure à cette substance (phase d'hypersensibilité), les **mastocytes dégranulent** et

de l'**histamine**, de la **sérotonine**, des **IL-1, 2, 3, 4 et 5**, de l'**interféron- γ** , du **granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)**, et du **tumor necrosis factor- α (TNF- α)** sont libérées. Les IL-3 et 5 participent à la différenciation, la maturation et la libération des granulocytes éosinophiles. La cascade de l'**acide arachidonique** est activée et permet la synthèse de **prostaglandines** et de **thromboxanes A2** par les cyclooxygénases et de **leucotriènes** par les lipooxygénases. Tous ces facteurs concourent à une **inflammation importante** avec œdème, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une abondance de cellules inflammatoires et en particulier de granulocytes éosinophiles (136).

L'inflammation ainsi causée provoque des **lésions de l'épithélium** respiratoire dont une **hypertrophie**, une **métaplasie** et une **desquamation** de l'épithélium bronchique. Les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses **s'hyperplasient** et **s'hypertrophient** engendrant une **hypersécrétion** de mucus. La combinaison de l'accumulation de mucus et de l'hypertrophie de la paroi bronchique contribue à l'**obstruction** des voies aérifères. Par ailleurs, les granulocytes éosinophiles dégranulent et les protéines ainsi libérées, notamment la protéine MBP (Major Basic Protein) (138), participent aux lésions de l'épithélium et aggravent la réponse inflammatoire et l'hypersécrétion de mucus. De plus, les enzymes des cellules inflammatoires génèrent des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène ou ion superoxyde. Celui-ci engendre une peroxydation des lipides membranaires ce qui aboutit à des dommages cellulaires irréversibles. L'association de tous ces phénomènes amène à la **destruction progressive de l'épithélium cilié, ce qui diminue la clairance ciliaire** (136).

3.1.2.3. Diagnostic

Le diagnostic est un **diagnostic d'exclusion**. Les chats atteints sont souvent initialement présentés pour une dyspnée expiratoire sévère et brutale dans un contexte de crises de toux sèches récurrentes. Les chats présentent dans ce cas une orthopnée, une toux forte, des efforts expiratoires, voire respirent la gueule ouverte. Dans d'autres cas, les chats atteints ne présentent qu'une toux récurrente et une respiration sifflante sans jamais présenter de détresse respiratoire marquée. L'anamnèse et l'examen clinique sont donc indispensables au diagnostic. À l'auscultation pulmonaire les bruits respiratoires peuvent être anormaux (crépitements et sifflements) mais ce n'est pas toujours le cas (139). Des facteurs déclencheurs peuvent parfois être mis en évidence comme l'exposition à un antigène spécifique ou des facteurs saisonniers (140) (137).

En cas de crise dyspnéique sévère, une réponse spectaculaire à la supplémentation en oxygène et à l'administration de glucocorticoïdes est fortement en faveur d'un diagnostic de bronchite asthmatique (140).

L'examen radiographie du thorax peut mettre en évidence une opacification **bronchique à broncho-interstitielle**, avec dans certains cas un collapsus du lobe moyen droit. Une hyperinsufflation est parfois observable et assez significative. Les signes radiographiques ne sont pas toujours visibles même chez des animaux symptomatiques (141) (137) et les signes radiographiques observés ne sont pas proportionnels à la sévérité de la maladie (132) (142) (139) (Figure 18, Figure 19).

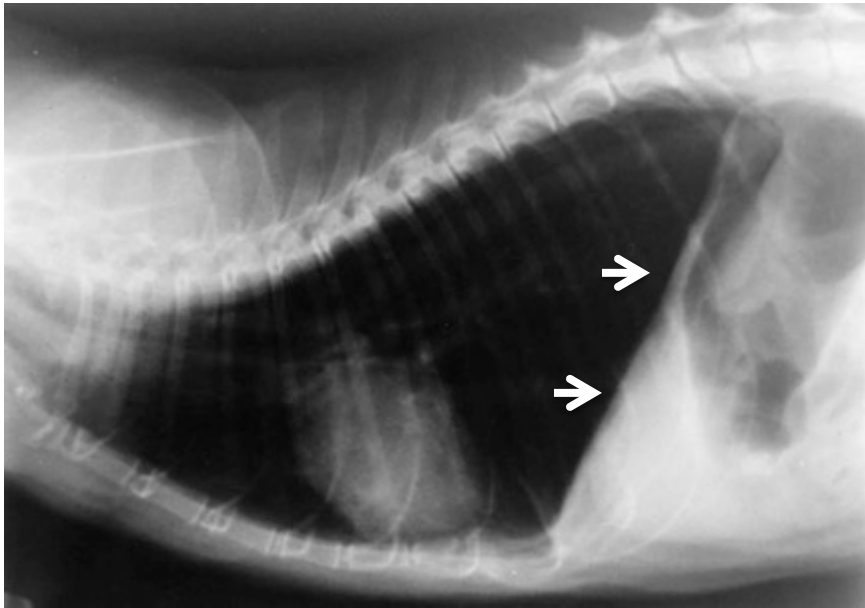


Figure 18 : Radiographie thoracique en vue latérale droite chez un chat siamois de 11 ans atteint d'une bronchite asthmatique sévère (d'après (139)). Une opacification bronchique diffuse discrète à modérée du parenchyme pulmonaire associée à un aplatissement de la coupole diaphragmatique (→) à cause de l'hyperinsufflation sont visibles.



Figure 19 : Radiographie thoracique en vue ventro-dorsale d'une atélectasie pulmonaire chez un chat souffrant d'asthme (Source : Vetagro Sup). Une opacification pulmonaire de type alvéolaire en regard des lobes moyen et cranial droit, ainsi qu'un déplacement à droite du médiastin sont visibles.

Des examens hématologiques peuvent être réalisés et révèlent souvent une neutrophilie et parfois une éosinophilie mais aucun résultat hématologique ne permet d'établir un diagnostic d'asthme félin.

La réalisation d'un **lavage bronchoalvéolaire** (LBA) permet de mettre en évidence des modifications cytologiques qui montrent une augmentation du nombre de cellules (950 cellules/ μ L contre 400 cellules/ μ L physiologiquement d'après l'étude de Johnson et Vernau (143)) avec une prédominance d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages (141)(143)(144) et une production excessive de mucus. Cependant, les données concernant la composition cellulaire du lavage chez le chat asthmatique ne font pas consensus puisque pour certains auteurs le pourcentage d'éosinophiles normal peut varier de 0% à 83% (133) (144). D'autres affections peuvent être responsables d'une hyperéosinophilie, dont une infestation parasitaire, c'est la raison pour laquelle il est très important de corréliser les résultats de ces analyses aux signes cliniques présentés par l'animal.

La **bronchoscopie** permet de visualiser une hyperhémie de la muqueuse, des irrégularités de l'épithélium, voire un collapsus des voies respiratoires, une sténose ou une bronchiectasie (Figure 20). Encore une fois, toutes ces modifications ne sont pas pathognomoniques de cette affection puisqu'elles sont également observées dans d'autres affections de l'appareil respiratoire profond notamment les maladies infectieuses et les néoplasies et doivent donc toujours être corrélées aux les signes cliniques (133) (143).

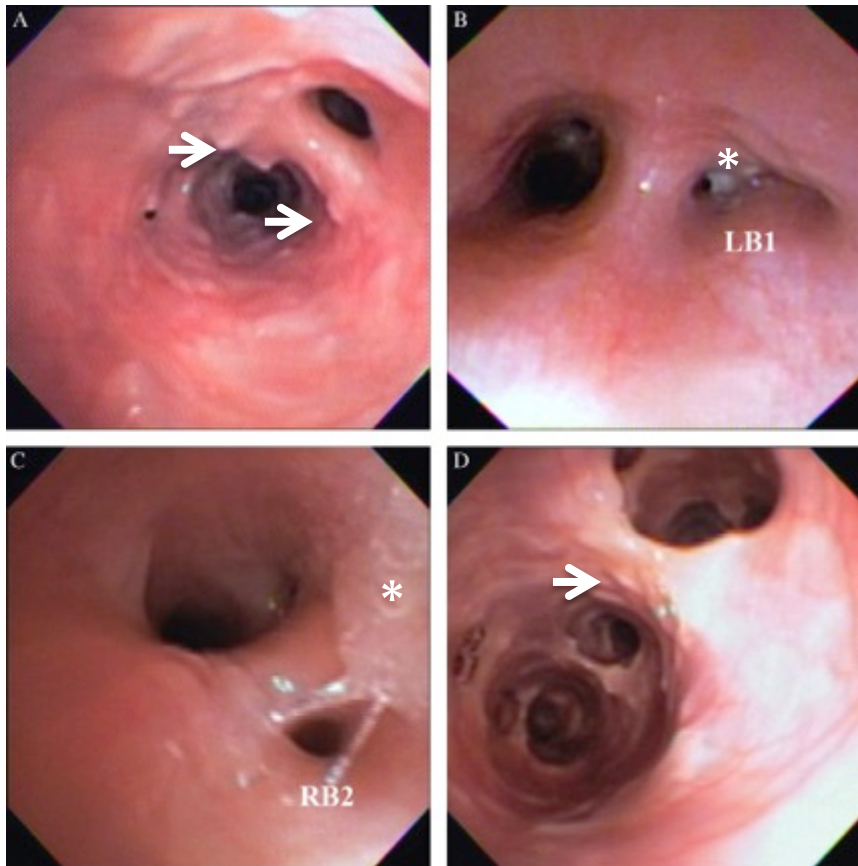


Figure 20 : Anomalies des voies respiratoires retrouvées en cas d'asthme à l'examen bronchoscopique (d'après (143)) A, B, C, D : Hyperhémie ; A, D : irrégularités nodulaires de l'épithélium (→) ; B (LB1) et C : accumulation de mucus (*) ; C (RB2) : sténose ; D : bronchiectasie

L'examen *post-mortem* des poumons montre une atélectasie du lobe moyen droit le plus souvent comme expliqué précédemment, ainsi qu'une paroi bronchique épaissie obstruant partiellement sa lumière. Microscopiquement, une hyperplasie des glandes sous-muqueuses et une prolifération des cellules caliciformes sont objectivées, ainsi qu'une érosion de l'épithélium. Le muscle lisse est hypertrophié et participe à la réduction de la lumière des voies respiratoires en aval. Du mucus et un exsudat inflammatoire participe à l'obturation des voies respiratoires (140) (Figure 21).

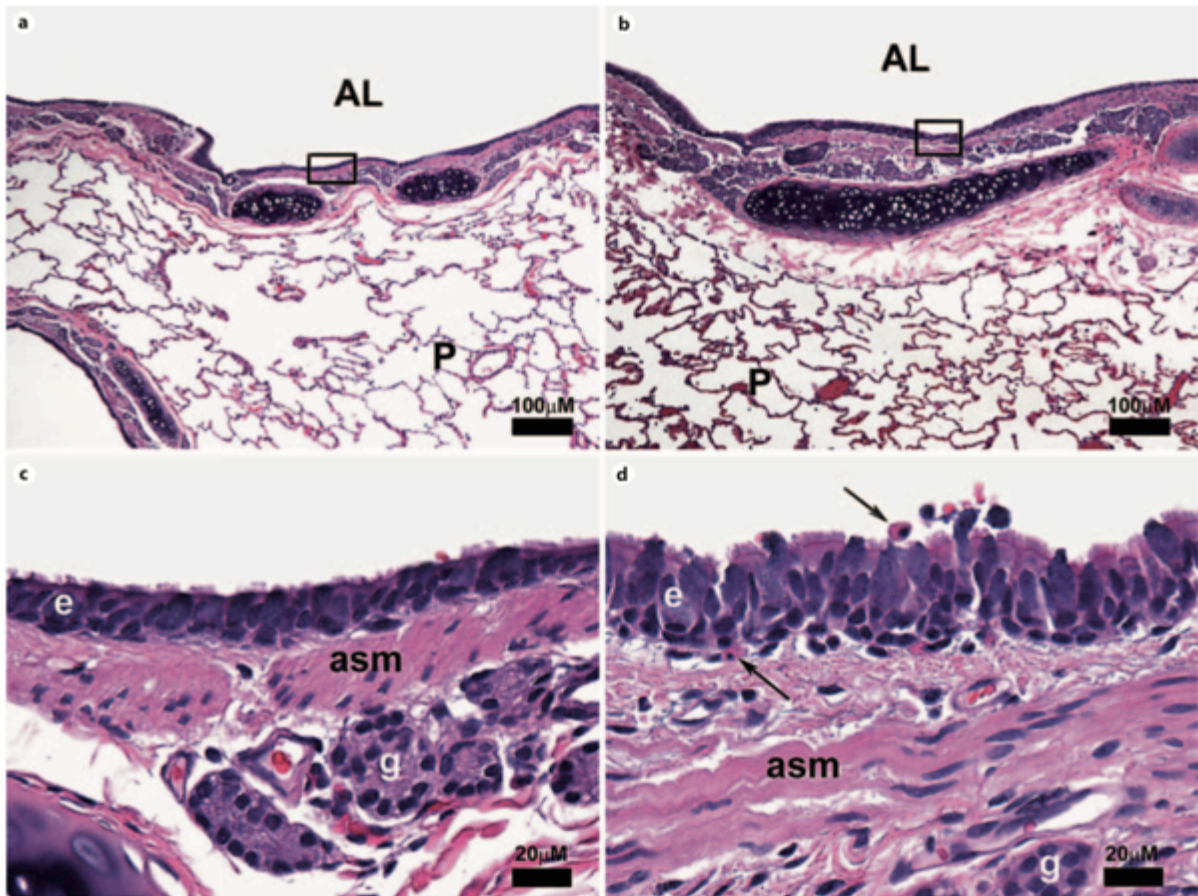


Figure 21 : observation microscopique des voies respiratoires d'un chat sain (a) et d'un chat asthmatique (b) (d'après (145)). Les zones encadrées sur les images (a) et (b) sont agrandies en (c) et (d) respectivement. On remarque la présence d'éosinophiles dans la lamina propria, dans l'épithélium et dans la lumière des voies respiratoires (AL) du chat asthmatique (flèches). P= Parenchyme pulmonaire ; e= épithélium ; g= glandes sous muqueuses ; asm= muscle lisse des voies respiratoires.

Le **diagnostic différentiel** comprend les maladies parasitaires respiratoires et cardiaques dont l'aelurostrongylose, la dirofilariose, la toxocarose pour lesquelles le lavage bronchoalvéolaire révèle également une hyperéosinophilie. Une coproscopie doit donc être réalisée pour écarter ces hypothèses. Les pneumonies bactériennes, virales ou fongiques, une effusion pleurale, un pneumothorax, une thrombo-embolie pulmonaire, une insuffisance cardiaque congestive, une obstruction des voies respiratoires avec un corps étranger bronchique par exemple ou la présence d'un néoplasme font également partie du diagnostic différentiel (133) (132)

3.1.2.4. Traitements actuels et Pronostic

Le traitement mis en place dépend du statut clinique de l'animal lorsqu'il est présenté en consultation mais aussi du stade de la maladie et de sa durée d'évolution.

Lorsqu'un allergène précis est mis en évidence, un régime d'éviction peut être entrepris sans autre traitement. La désensibilisation n'a pas montré son efficacité chez le chat.

Il est important de se souvenir que l'asthme félin, qu'il soit symptomatique ou non, repose sur **une inflammation chronique** des voies respiratoires. Ainsi lorsque la toux est quotidienne, la prise en charge thérapeutique a pour but de réduire cette inflammation (137). Elle repose donc sur l'administration de **glucocorticoïdes** sur le long terme. Cette classe de molécule procure plusieurs effets bénéfiques dont l'inhibition de la synthèse de certaines cytokines intervenant dans le processus inflammatoire. Ils peuvent être administrés oralement ou par inhalation par le propriétaire. La prednisone ou la prédnisolone par exemple peuvent être utilisées et parfois associées à des **bronchodilatateurs** en cas de crise de dyspnée ou lorsque la toux devient réfractaire à l'administration de glucocorticoïdes seuls. L'effet des bronchodilatateurs est parfois décevant. Si la toux n'est qu'occasionnelle, le traitement peut ne reposer que sur l'administration ponctuelle de bronchodilatateurs. Les méthylxanthines comme la théophylline, les agonistes β -2 et les anticholinergiques peuvent être utilisés pour leur action relaxante sur les fibres musculaires lisses responsables de la bronchostriction. Certains ont travaillé sur une alternative à l'utilisation de la théophylline sous forme de nébulisation dans la mesure où certains chats peuvent devenir peu coopératifs à force de telles manipulations (146). Chez l'enfant, son administration par voie transdermique aboutit à une concentration sanguine comprise dans l'intervalle thérapeutique. Malheureusement dans cette étude, la théophylline transdermique administrée quotidiennement n'atteint pas la concentration sanguine considérée comme thérapeutique. Des recherches supplémentaires pourraient permettre de découvrir la posologie efficace par cette voie d'administration. L'atropine peut être utilisée si les autres molécules ne sont pas suffisamment efficaces mais son utilisation reste limitée car elle provoque un épaissement du mucus. Les glucocorticoïdes sont administrés quotidiennement à une dose de 1 à 2 mg/kg dans un premier temps puis à dose dégressive jusqu'à trouver la **dose minimale efficace** propre à chaque cas (132). Toutefois l'évaluation des effets bénéfiques des glucocorticoïdes n'est le plus souvent fondée que sur **l'amélioration des signes cliniques** et non sur une réelle vérification de **l'état inflammatoire** et de l'hypersensibilité des voies respiratoires. Il est donc difficile de déterminer si le traitement permet une réelle amélioration de l'inflammation ou s'il diminue seulement les signes cliniques (133) (137) (140).

Les effets secondaires des glucocorticoïdes administrés oralement ne doivent pas être négligés, notamment la pancréatite, le diabète, la poly-uro poly-dyspsie, les hépatopathies, une immunosuppression ou encore un hyperadénocorticisme iatrogène (147). Cette classe de molécules ne doit pas être utilisée dans le cadre de certaines affections (diabète, insuffisance cardiaque). La ciclosporine peut être utilisée en alternative mais l'apparition potentielle d'effets indésirables à la suite de sont administration prolongée doit mener à un suivi régulier (148). Ainsi le développement

de nouvelles thérapies doit être étudié (133) et l'administration des traitements par **inhalation** permet de réduire considérablement les effets indésirables (149) (147) (150) (151).

Un traitement antibiotique peut être mis en place si la cytologie du LBA révèle la présence de bactéries pathogènes. Le traitement antibiotique doit alors être poursuivi au moins trois semaines (137) (140).

En cas de crise aigue caractérisée par des muqueuses cyanosées et une détresse respiratoire sévère, une oxygénothérapie est indispensable associée à une injection intramusculaire de glucocorticoïdes et l'administration d'un bronchodilatateur. Les manipulations contraignantes et stressantes comme les prises de sang, les échocardiographies ou la réalisation de radiographies du thorax ne doivent pas être entreprises tant que l'animal n'est pas stabilisé (139)(140).

Chez les animaux atteints de bronchospasmes il est nécessaire de faire attention aux autres molécules administrées dans le cadre d'une autre pathologie par exemple. En effet, les β -bloquants comme le propranolol sont connus pour aggraver la bronchostriction. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens doivent être évités car ils bloquent la production de prostaglandines et favorisent celle de leucotriènes, ce qui augmente fortement le tonus des fibres musculaires lisses bronchiques. C'est pour cette raison qu'une erreur de diagnostic en faveur d'une cardiomyopathie hypertrophique peut avoir des conséquences dramatiques sur un chat asthmatique (140).

Enfin, l'utilisation des inhibiteurs de la sérotonine et d'antihistaminiques ne montre pas de résultats probants malgré l'implication de ces molécules dans la pathogénie de cette affection (133) (152).

Le pronostic est plutôt bon, la plupart des chats répondent de manière satisfaisante à l'association d'un bronchodilatateur et des glucocorticoïdes. Toutefois, le **traitement est à vie**, avec un **suivi régulier** et requiert une implication et une motivation fortes des propriétaires. Ils doivent être informés de la fréquence des **récidives** et du **risque fatal** de la crise asthmatiforme.

3.1.3. Intérêt d'un modèle tridimensionnel

L'utilisation d'un modèle tridimensionnel de poumon de chats pour la bronchite asthmatique serait intéressante car cette maladie, relativement fréquente et parfois mortelle, est en partie due aux caractéristiques histologiques de l'appareil respiratoire du chat et en particulier au grand nombre de fibres musculaires lisses et à la présence de cartilage élastique. C'est en partie pour cela que les résultats expérimentaux obtenus sur des animaux de laboratoire de type rongeur ne peuvent être complètement assimilés à la physiologie pulmonaire du chat. De plus le chat est un des seuls mammifères, en plus

de l'homme, à développer un asthme naturel. Il sert d'ailleurs de modèle pour l'affection humaine (153). Les études visant à mieux comprendre la pathogénie et les traitements envisageables sont nombreuses mais ne regroupent malheureusement le plus souvent qu'un faible nombre d'animaux (une dizaine en général) ce qui rend leur interprétation difficile, concluent le plus souvent à un besoin d'approfondissement des résultats et ne concluent pas à de réelles avancées. La physiopathogénie n'est donc pas encore clairement élucidée, le rôle des neutrophiles par exemple reste encore imprécis. Par ailleurs, actuellement il n'existe pas de test diagnostique, puisque celui-ci repose d'avantage sur une exclusion des autres atteintes de l'appareil respiratoire et sur une réponse satisfaisante à l'administration de glucocorticoïdes qu'à un réel diagnostic de certitude. Rappelons que les signes radiographiques sont inconstants et que même si la cytologie du lavage broncho-alvéolaire permet d'orienter le diagnostic, les intervalles ne sont pas clairement définis : un chat pourrait avoir jusqu'à 83% d'éosinophiles dans ses sécrétions pulmonaires physiologiquement. Enfin la définition de cette affection reste encore vague et sa distinction avec d'autres troubles, notamment la discrimination entre un asthme et une bronchite chronique ne fait pas encore consensus (133). Le traitement est à vie et il n'existe pas de réelles preuves de son efficacité au niveau cytologique. En effet, une étude révèle que 70% des chats asthmatiques traités avec des glucocorticoïdes à forte dose pendant au moins trois semaines ne présentant plus de signes cliniques, montrent toujours une persistance de cellules inflammatoires (éosinophiles et/ou neutrophiles) au lavage broncho-alvéolaire (154). Ceci soulève la question de la diminution des doses de corticoïdes qui s'appuie sur la résolution des signes cliniques. L'inflammation étant toujours présente, les dommages irréversibles qu'elle cause à l'épithélium continuent de progresser et la maladie n'est pas contrôlée. La réalisation d'un LBA étant peu recommandée sur des animaux dyspnéiques, un tel examen ne peut être réalisé en routine. Ceci ouvre la voie à la recherche d'autres biomarqueurs de l'inflammation des voies respiratoires profondes qui pourraient être utilisés chez le chat. Rappelons que les glucocorticoïdes sont contre indiqués dans certaines situations et que leurs effets indésirables ne sont pas négligeables, ainsi les recherches actuelles concernent de nouvelles thérapies capables de restaurer une tolérance immunitaire en agissant de manière plus ciblée avec moins d'effets systémiques. Toutes ces problématiques font que la création d'un modèle tridimensionnel de la maladie serait tout à fait fructueuse et permettrait de palier le manque d'animaux disponibles pour les différentes études.

Plusieurs pistes sont en cours d'évaluation mais concluent souvent à un besoin de recherches supplémentaires et pourraient donc faire l'objet d'expérimentations sur des poumons de chats *ex-vivo*. Voici quelques exemples des projets réalisés :

- L'utilisation des inhibiteurs des tyrosines kinases est examinée. En effet, le blocage de cette voie de signalisation clef dans la pathogénie de l'asthme pourrait mener à de nouvelles techniques thérapeutiques. L'activation et la prolifération des mastocytes et des éosinophiles peuvent être inhibées par les inhibiteurs de la tyrosine kinase comme

le mastinib. Des chats recevant du mastinib (50mg/jour oralement) montrent une diminution du nombre d'éosinophiles présents dans leur LBA ainsi qu'une amélioration de la compliance pulmonaire, malheureusement les effets indésirables du traitement notamment le protéinurie induite, impose de limiter les doses utilisées (155).

- De même le développement d'une immunothérapie comme chez l'homme est à l'étude, et propose de réverser la réponse allergique médiée par les lymphocytes T_H2 en induisant une tolérance à l'allergène mis en cause. La limite chez le chat reste l'identification de l'allergène responsable et nécessite le développement de tests performants. Toutefois Reinero et al. (147) ont réalisé une étude dans laquelle l'immunothérapie menée chez des chat sensibilisés à un allergène précis et ayant développer une bronchite asthmatique (asthme induit expérimentalement) montre une diminution de la quantité d'éosinophiles dans les voies respiratoires, ainsi qu'une diminution des IgG spécifiques de l'antigène en question et de la sensibilité des lymphocytes à cet antigène. Ces résultats confirment l'avenir prometteur de l'immunothérapie pour traiter l'asthme félin mais des recherches supplémentaires sont encore nécessaires.

- L'utilisation des acides gras oméga3 polyinsaturés semble, elle aussi, prometteuse dans la réduction de l'hyperréactivité des voies respiratoires. Ils agissent comme des anti inflammatoires en réduisant la quantité d'acides arachidoniques présents dans les membranes cellulaires qui induisent la production d'eicosanoïdes inflammatoires. L'utilisation de tels acides gras associés à un antioxydant a été évaluée chez le chat atteint d'asthme et révèle une diminution de l'hyperréactivité sans diminution de la quantité d'éosinophiles. Cette piste reste donc intéressante à poursuivre comme thérapie adjuvante (133).

- De même l'utilisation de la lidocaïne en médecine humaine pour traiter l'asthme sévère encourage à étudier son utilisation chez le chat malgré sa grande sensibilité à cette molécule. Des nébulisations de lidocaïne ont donc été réalisées pendant deux semaines chez des chats sains et chez des chats asthmatiques (2mg/kg toutes les 8 heures). Une diminution de l'hyperréactivité est mise en évidence sans diminution de l'éosinophilie des voies respiratoires. Surtout aucun effet secondaire n'a été noté malgré la grande sensibilité du chat à cette molécule par voie injectable. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir l'utilité de cette molécule dans le traitement de l'asthme félin (133).

- Une étude réalisée chez la souris qui montre que l'administration systémique de cellules souches mésenchymateuses durant une sensibilisation supprime l'inflammation des voies respiratoires en promouvant une réponse de type T_H1 en dépit de la réponse T_H2 habituellement retrouvée dans la pathogénie de l'asthme (156). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas élucidés mais une investigation approfondie permettrait de faire évoluer les traitements actuels en diminuant réellement l'inflammation. Les résultats

obtenus par Ou-Yang et al. (157) vont dans le même sens. Les premiers essais chez le chat de l'administration intraveineuse de cellules souches allogéniques dérivées des adipocytes montreraient une amélioration du remodelage des voies respiratoires (confirmé par scanner) (133).

- Hirt et al. ont travaillé sur l'effet de l'adénosine monophosphate (AMP) qui provoque une bronchostriction chez les patients souffrant d'une inflammation des voies respiratoires profondes et ont montré que l'utilisation de cette molécule pourrait servir de test diagnostique pour la bronchite asthmatique féline et pour suivre sa progression. (158).

- Des recherches sur les mucolytiques comme la N-acetylcystéine (NAC) sont également pratiquées. Elles montrent pour l'instant plutôt des effets indésirables tels qu'une augmentation de la résistance au passage de l'air car cette molécule favoriserait une bronchostriction lorsqu'elle est administrée par inhalation (159)

Ainsi, beaucoup de travaux sont réalisés afin de progresser sur la pathogénie et le traitement de cette affection. La poursuite de ces recherches sur des modèles tridimensionnels pourrait peut-être aboutir à des résultats concrets concernant la prise en charge de cette maladie.

3.2. L'INFLAMMATION CHRONIQUE DES PETITES VOIES RESPIRATOIRES CHEZ LE CHEVAL

L'inflammation chronique des petites voies respiratoires est une affection extrêmement fréquente chez le cheval et dont les complications peuvent mener à la mort de l'animal. Cette affection est souvent assimilée à l'asthme de l'homme or nous allons voir qu'elle s'en distingue d'où l'intérêt de développer un modèle propre à cette espèce.

3.2.1. Définition, étiologie, physiopathologie, pathogénie, diagnostic, traitements actuels et pronostic

3.2.1.1. Définition et étiologie

L'inflammation chronique des petites voies respiratoires (ICPVR), autrement appelée pousse ou asthme équin est une **maladie inflammatoire chronique et réversible** des voies respiratoires profondes rencontrée chez les chevaux adultes et **d'origine multifactorielle**. L'étiologie et la pathogénie de cette affection ne sont encore que partiellement élucidées (160) et le nom attribué à cette maladie a longtemps fait débat et ne fait pas encore complètement consensus. Il s'agit d'une maladie inflammatoire environnementale caractérisée par une **bronchostriction réversible**,

une **hypersécrétion** de mucus et une **hyperréactivité** bronchique avec alternance de phases de **rémission** et de **crises**, comparables à celles rencontrées dans l'asthme humain (160) (161).

Il s'agit de la maladie respiratoire chronique la plus **fréquente** chez les chevaux adultes élevés en **box**, dans l'hémisphère nord. Les chevaux âgés de plus de cinq ans sont le plus souvent atteints et la prévalence augmente avec l'âge. Il n'existe à priori pas de prédisposition de sexe mais des caractères raciaux et héréditaires semblent impliqués (160).

Les signes cliniques peuvent s'étendre d'une simple **intolérance à l'effort** à une **détresse respiratoire très sévère**. Les signes cliniques fréquemment observés sont une **toux** en début d'exercice physique ou en milieu poussiéreux (comme lors de la distribution du foin), des **écoulements naseaux** séreux à muqueux bilatéraux récurrents, une augmentation des **efforts respiratoires** et une perte de poids dans les cas sévères. **Une ligne de pousse abdominale**, correspondant à une hypertrophie du muscle abdominal oblique, peut également être visible. Ces signes sont causés par une résistance au passage de l'air dans les voies respiratoires profondes à cause d'une bronchostriction généralisée. Lorsque les signes cliniques sont observés au repos cela signifie que le cheval est déjà sévèrement atteint (160). Les chevaux atteints ont souvent une inspiration rapide et une **expiration forcée** et **prolongée**. L'exhalation est alors **biphasique** avec une phase thoracique rapide suivie d'une phase de **contraction abdominale** qui s'amplifie avec la sévérité de l'affection et qui est à l'origine de la démarcation d'une ligne de pousse abdominale. L'auscultation pulmonaire révèle souvent une **hyper résonance** à la percussion du thorax en raison de l'accumulation d'air dans les poumons ainsi qu'un champ pulmonaire de taille augmentée et une augmentation des **bruits respiratoires**. L'évolution clinique est assez systématique, dans un premier temps les signes cliniques ne se manifestent que lors d'un exercice physique puis s'intensifient si aucune prise en charge n'est initiée. Une des caractéristiques de cette affection est la **réversibilité des signes cliniques** si les chevaux sont déplacés dans **un milieu contrôlé** ou placés en pâture (160).

L'étiologie précise n'est pas connue mais une combinaison de facteurs **génétiques** et **environnementaux** incluant des moisissures, du foin de mauvaise qualité, des spores fongiques (*Aspergillus fumigatus*, *Faenia rectivirgula* en sont des exemples), des endotoxines et d'autres stimuli non spécifiques est suspectée (160) (162) (163). Une réaction d'hypersensibilité à ces facteurs externes semble être à l'origine d'une réaction inflammatoire qui provoque l'obstruction bronchique (164). Une hypersensibilité de type I et une hypersensibilité de type III sont suspectées intervenir (165) mais ces hypothèses sont controversées.

3.2.1.2. *Physiopathologie et pathogénie*

L'inflammation des voies respiratoires est une des clés de la pathogénie de cette affection et doit donc être une des cibles principales de sa prise en charge. La principale lésion rencontrée est une **bronchiolite**. L'accumulation pérbronchique de cellules inflammatoires, principalement des **lymphocytes** mais aussi des mastocytes en moindre quantité et plus rarement des éosinophiles, est accompagnée d'une accumulation intra-luminale de **neutrophiles** (Figure 22). Des **modifications de l'épithélium** des petites voies respiratoires sont aussi caractéristiques, incluant une perte des granules contenus dans les cellules club, une métaplasie des cellules caliciformes et la présence de corps d'inclusion lamellaires intra-épithéliaux. Dans les septum alvéolaires entourant les bronchioles il existe des degrés variables de fibrose et de nécrose des pneumocytes de type I, qui sont alors remplacés par des pneumocytes de type II (162)(166). Dans les voies respiratoires de plus grand calibre, il y a une perte de cellules ciliées qui sont remplacées par des cellules indifférenciées, aboutissant à une **hyperplasie** de l'épithélium. Souvent, une multiplication des cellules caliciformes, la présence de kystes et de dépôts de mucus dans la muqueuse sont objectivés. Moins fréquemment une desquamation de l'épithélium est présente. L'augmentation de production de mucus par les cellules caliciformes associée à l'exsudat inflammatoire et à la disparition des cellules ciliées provoquent une stagnation du mucus dans les voies respiratoires et aggrave l'**obstruction** (162) (167). La région pulmonaire caudo-dorsale est le plus souvent impliquée sans raison connue à ce jour (163).

L'exposition d'animaux sensibles à un environnement contenant du foin et de la paille initie une inflammation des voies respiratoires. Les neutrophiles s'accumulent dans les voies respiratoires dans **les 3 à 5h** suivant l'exposition ce qui correspondrait à une réaction d'hypersensibilité de type III. Ils sont à l'origine de la libération de **protéases** et de **médiateurs de l'inflammation** tels que des élastases, des radicaux libres et du leucotriène B4 qui mènent à des dommages cellulaires. Les neutrophiles sont attirés dans le poumon par des mécanismes non spécifiques et spécifiques. Les mécanismes non spécifiques comprennent le chimiotactisme direct vers les particules inhalées et la sécrétion de cytokines par les macrophages alvéolaires. Ces mécanismes non spécifiques sont communs aux chevaux atteints d'ICPVR et aux chevaux sains qui pourraient se retrouver dans un environnement poussiéreux. Chez les chevaux souffrant d'ICPVR, des mécanismes spécifiques supplémentaires se mettent en place. L'inhalation d'antigènes provoque une réaction immunitaire spécifique dans laquelle les cellules résidentes comme les **macrophages** alvéolaires et les **lymphocytes** produisent des **cytokines** qui contribuent au recrutement des neutrophiles. L'implication des lymphocytes CD4+ est fortement suspectée et serait à l'origine du recrutement, de la maturation, de l'activation et de l'infiltration des neutrophiles (162). En effet, la proportion de lymphocytes CD4+ est augmentée dans le LBA de chevaux atteints d'ICPVR, ce qui laisse supposer leur implication dans la pathogénie de cette affection (168). La même étude montre un taux d'apoptose de ces cellules augmenté par rapport

aux chevaux sains. Cette **dérégulation** est donc supposée intervenir également dans la pathogénie mais les mécanismes mis en jeu sont encore inconnus. Certains auteurs montrent que chez des chevaux atteints d'ICPVR, il y a une présence exacerbée d'ARNm codant l'IL-4 et l'IL-5 et une expression diminuée de l'IFN- γ , ce qui correspond à un profil de cytokines caractéristiques d'une réponse immunitaire de **type T_H2** (164). L'IL-4 est essentielle pour l'induction des lymphocytes B produisant des IgE. Ceci est cohérent avec le fort taux d'IgE retrouvés dans le sérum et dans le LBA des chevaux affectés. L'inflammation chronique des petites voies respiratoires correspondrait donc à une réaction allergique, comparable à l'asthme humain. Toutefois le rôle de l'IL-5 reste à investiguer car habituellement cette cytokine est caractéristique d'un afflux d'éosinophiles, ce qui n'est pas le cas dans cette affection. De plus une hypersensibilité de type I est caractérisée par une réponse immédiate, or dans le cas de l'ICPVR la réponse inflammatoire n'apparaît **qu'environ 5h après la stimulation antigénique** et se prolonge dans le temps, ce qui ne correspond pas au schéma classique de ce type de réponse immunitaire. Pour d'autres auteurs, la concentration en IFN- γ est augmentée ce qui correspondrait d'avantage à une **réponse de type T_H1** (169). Une autre étude révèle une concentration augmentée en **IL-8** dans le LBA de chevaux atteints exposés à du foin moisi (170). Cette interleukine est une molécule chimiotactique pour les neutrophiles. Cette découverte prouve son implication dans la pathogénie de cette affection mais les mécanismes mis en jeu sont toujours occultes (171). De même que **l'IL-17**, produite par les lymphocytes T_H17 et connue pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 ainsi que des chemokines, est retrouvée en quantité augmentée dans le LBA des chevaux affectés ce qui laisse supposer que cette interleukine est elle-aussi impliquée dans la pathogénie bien que les mécanismes mis en jeu soient encore inconnus (165). Concernant le TNF- α , il semblerait que sa concentration dans le LBA varie au cours du temps en fonction du stade de la maladie et de sa durée d'évolution (172), ce qui complique encore d'avantage la compréhension de la pathogénie et le rôle joué par toutes ces différentes cytokines. Les **métalloprotéinases matricielles** (MMP) qui physiologiquement interviennent dans le renouvellement de la matrice extracellulaire semblent également intervenir dans le remodelage de l'épithélium pulmonaire. Plusieurs études montrent que la MMP-9 est retrouvée en concentrations anormalement élevées dans le LBA des chevaux souffrant d'ICPVR mais les modalités de son implication reste à investiguer (169) (173) (171). Les chevaux atteints d'ICPVR exposés à du foin de mauvaise qualité présentent une expression augmentée du **facteur de transcription nucléaire kB** (NF-kB) qui est alors retrouvé en quantité augmentée dans leur LBA et qui est donc supposé jouer un rôle important dans la modulation de l'inflammation des voies respiratoires de ces chevaux (165) (174). De même, d'autres facteurs de transcription ont une activité augmentée chez les chevaux affectés lors de crise exacerbée comme la **protéine activatrice 1** (AP-1), connue pour intervenir dans la régulation des processus inflammatoires, immunitaires, de défense pulmonaire et d'apoptose et prolifération cellulaire (175). Ainsi les nombreuses études réalisées sur l'ICPVR permettent de soulever la complexité et la diversité des éléments responsables de l'inflammation mais

les interactions qu'ils entretiennent et les mécanismes sous-jacents restent indéterminés. **Les éléments pertinents retenus à ce jour sont que l'état inflammatoire caractéristique de la maladie est le résultat d'une combinaison d'éléments de l'immunité innée et de l'immunité acquise et les cytokines mises en jeu correspondent à des profils T_H1, T_H2 et T_H17 selon la chronicité et l'évolution de l'affection (165).**

Le **bronchospasme** est une autre composante de cette affection (Figure 22). Il résulte à la fois des effets directs des médiateurs de l'inflammation sur les fibres musculaires lisses et des effets exercés par le système nerveux autonome. Les mécanismes responsables de l'hyperréactivité des voies respiratoires sont encore méconnus (162). Tous ces changements sont à l'origine d'une augmentation de la résistance au passage de l'air et d'une moins bonne compliance du poumon. L'étude de Herszberg et al. (176) montre que les chevaux atteints de la maladie présentent une augmentation significative de la **quantité de muscle lisse** présent dans les voies respiratoires (environ trois fois supérieure à celle retrouvée chez les chevaux sains), associée à une prolifération et une apoptose augmentées des myocytes. Ainsi l'ICPVR impliquerait une croissance du muscle lisse associée à une **hyperplasie** des myocytes et une **apoptose** augmentée qui reflèterait un mécanisme compensatoire afin de limiter la croissance musculaire anormale. Dès lors, il est fortement suspecté que le **remodelage du muscle lisse** des voies respiratoires serait impliqué dans la pathogénie de cette affection.

Les modifications des propriétés physiques du **mucus** sont liées à la fois à des changements **qualitatifs et quantitatifs** des **mucines** qui le constituent (177).

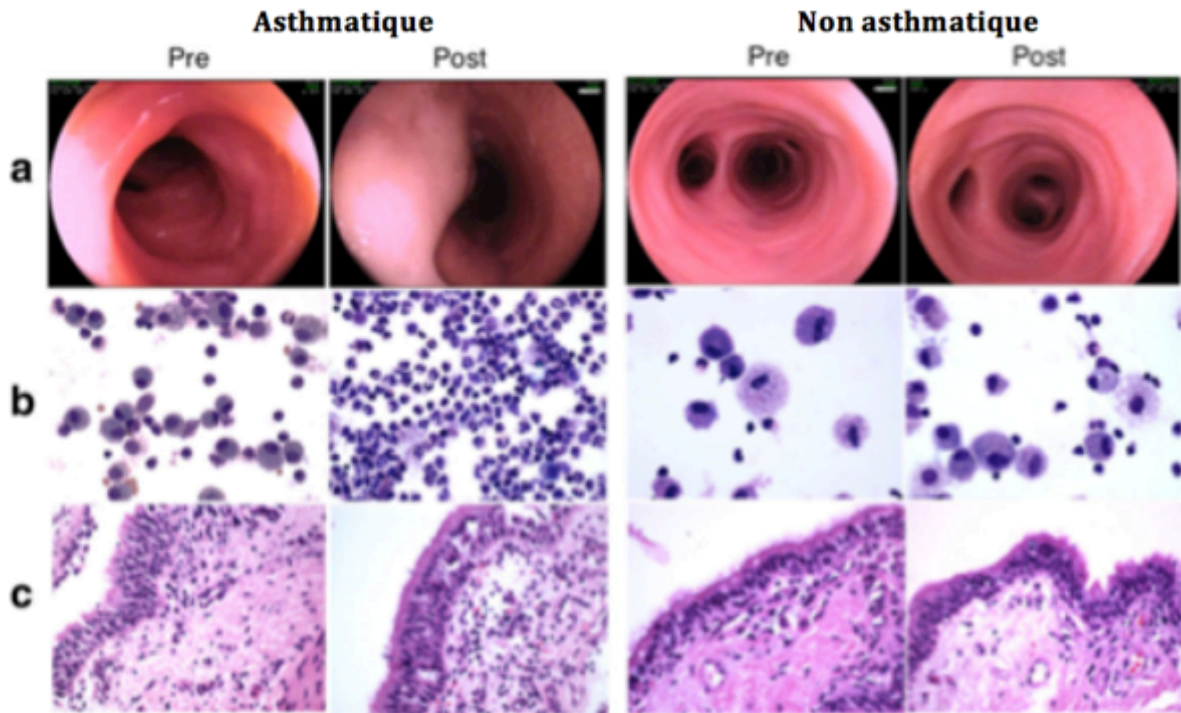


Figure 22 : Comparaison de la vue endoscopique, du lavage bronchoalvéolaire et de l'apparence histologique de biopsies de bronche entre un cheval asthmatique et un cheval non asthmatique dans un environnement poussiéreux (d'après (171)) (a) vue endoscopique d'une bronche ; (b) LBA ; (c) apparence histologique de biopsies bronchiques. (a) On observe une bronchostriction importante et une augmentation de la sécrétion de mucus chez le cheval asthmatique contre une bronchostriction modérée chez l'individu sain. (b) Chez le cheval asthmatique on observe une augmentation du nombre et de la proportion de neutrophiles dans le LBA par rapport au cheval sain. (c) Une basophilie et un influx de leucocytes sous muqueux sont évidents chez le cheval asthmatique.

L'obstruction des voies respiratoires est finalement **le résultat d'un bronchospasme, d'une accumulation de mucus et d'une inflammation chronique avec infiltration neutrophilique**. L'obstruction ainsi causée provoque une hypoxémie dont l'ampleur augmente avec la sévérité de la maladie. Une prédisposition génétique et un caractère héréditaire semblent exister car certaines filiations présentent une prévalence importante mais le support génétique mis en cause reste à investiguer (163). **Cette affection est donc la conséquence d'une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux mais les mécanismes responsables de la pathogénie restent encore une énigme.**

3.2.1.3. Diagnostic

L'observation des signes cliniques caractéristiques (intolérance à l'effort, toux, jetage, efforts expiratoires) associée à des données épidémiologiques cohérentes (cheval de plus 5 ans, vivant en box, nourri avec du foin) amènent à suspecter fortement une

ICPVR lorsque l'affection est déjà sévère. Dans les cas les moins sévères, le recours à l'utilisation d'examens complémentaires est nécessaire pour confirmer le diagnostic.

Le **test de ventilation forcée** peut être facilement mis en œuvre. Il est très mal supporté en cas d'ICPVR et met en évidence des bruits respiratoires augmentés et anormaux à l'auscultation comme des sifflements ou des crépitements.

Le **lavage bronchoalvéolaire** est l'examen complémentaire **de choix**. Ainsi un lavage bronchoalvéolaire caractéristique associé à des signes cliniques évocateurs suffit à confirmer le diagnostic. Il s'agit d'une procédure sûre, répétable et avec peu de risques de complications. Il peut donc être réalisé en routine. Chez les chevaux atteints d'ICPVR, un unique échantillon est représentatif de tout le poumon. Lorsque l'animal est affecté le LBA est caractérisé par une forte augmentation du nombre de neutrophiles (neutrophilie supérieure à 5%) et une augmentation moins importante de la quantité de mastocytes et d'éosinophiles (Figure 22). Ces mesures retournent à leur valeur de référence pendant les phases de rémission (163). L'intensité de la neutrophilie n'est pas contre pas corrélée à la sévérité des signes cliniques. De plus une quantité anormalement élevée de mucus peut être prélevée, ainsi que des cellules épithéliales issues de la desquamation de l'épithélium bronchique.

L'examen **bronchoscopique** permet d'observer des sécrétions mucopurulentes, un œdème et une hyperhémie de la muqueuse ainsi qu'un bronchospasme (163) mais ces observations ne sont pas spécifiques de cette affection et ne permettent donc pas d'établir un diagnostic de certitude (Figure 22).

Le diagnostic **histologique** est un diagnostic *post-mortem* en raison du caractère invasif des biopsies pulmonaires chez le cheval qui ne sont donc pas réalisées en routine. L'examen histologique met en évidence une augmentation de l'épaisseur de la couche de muscle lisse des voies respiratoires, ainsi qu'un dépôt de collagène et de fibres élastiques dans la lamina propria, aboutissant à un épaississement de la paroi des bronchioles. Ces lésions ne sont que partiellement réversibles malgré la mise en place d'un traitement sur le long terme. Elles sont en effet moins marquées chez les animaux en rémission que chez les animaux en crise exacerbée. Les lésions mises en évidence incluent donc une fibrose péribronchique, une hyperplasie des cellules caliciformes avec accumulation de mucus (178) (Figure 22, Figure 23), une disparition des cellules ciliées remplacées par des cellules indifférenciées, une infiltration neutrophilique et moins fréquemment une desquamation de l'épithélium. À l'étage alvéolaire, entourant les bronchioles touchées, une nécrose des pneumocytes de type I est visible, ils sont alors remplacés par des pneumocytes de type II (162)(166).

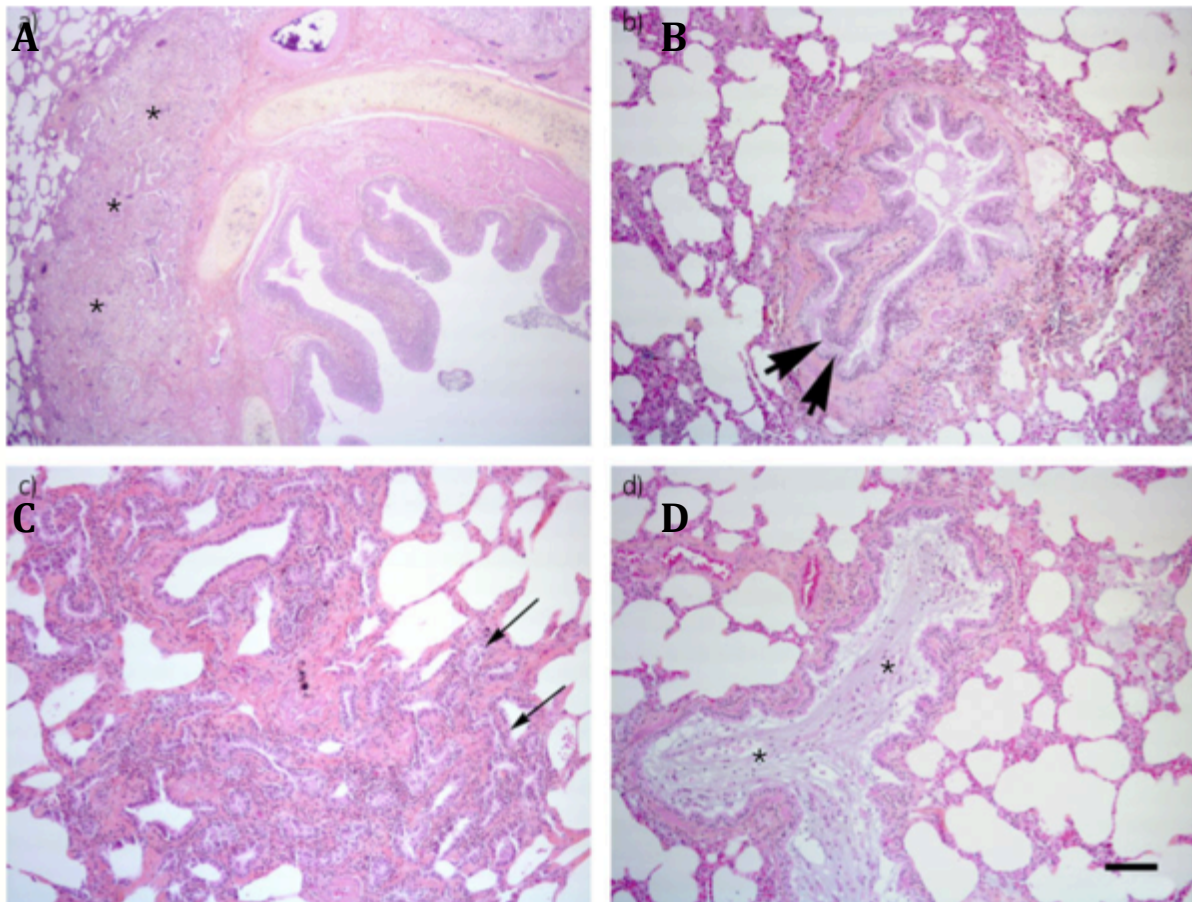


Figure 23 : Lésions histologiques observées chez des chevaux atteints d'ICPVR (d'après (178)). A) Fibrose interstitielle (*) x2,5 ; B) Hyperplasie des cellules caliciformes (→) x10 ; C) Métaplasie péribronchovascular (→) x10 ; D) stase de mucus (*) x10

La **radiographie thoracique** a peu d'intérêt pour diagnostiquer cette affection car elle est peu sensible. Une opacification broncho-interstitielle est parfois présente mais cette observation n'est pas spécifique. Dans les cas sévère une hyperinsufflation des lobes pulmonaires peut-être objectivée par l'aplatissement de la coupole diaphragmatique. Barton et al. (179) recommandent de réaliser les images radiographiques avant un LBA car celui-ci peut affecter leur interprétation.

Les **examens hématologiques et biochimiques** sanguins permettent d'exclure les causes infectieuses. Le dosage de la CRP, qui pourrait sembler intéressant puisqu'il s'agit d'un marqueur de l'inflammation chronique, n'est pas fructueux et ne permet pas d'appuyer le diagnostic. L'haptoglobine et la sérum amyloïde A semblent être des marqueurs plus pertinents. Leur concentration sérique est augmentée chez les chevaux souffrant d'ICPVR même durant les périodes de rémission mais de manière moins prononcée, ce qui permet d'effectuer un suivi de l'état inflammatoire de l'animal et de la réponse au traitement(180).

Enfin, le diagnostic de l'ICPVR peut être établi assez simplement en associant la réalisation d'un LBA à l'analyse des données de l'examen clinique et de l'anamnèse.

3.2.1.4. Traitements actuels et pronostic

Les remodelages tissulaires étant quasiment irréversibles, le traitement médical a pour seuls objectifs de limiter l'inflammation, la bronchostriction et éventuellement de modifier les caractéristiques du mucus. Cependant la prise en charge de cette affection repose avant tout sur **des mesures hygiéniques** avec un changement **d'environnement** afin de limiter l'inhalation de poussières de l'air mais les propriétaires sont souvent plus enclins à mettre en place un traitement médical plutôt qu'à modifier leurs habitudes (160).

Les mesures hygiéniques passent donc par une **diminution de la production de poussières** mais aussi une amélioration de leur **clairance**, c'est à dire que la ventilation doit être adaptée. Une des techniques de gestion de cette maladie est donc la **mise au pré** des chevaux atteints sans supplémentation en foin. L'amélioration de la fonction respiratoire peut alors parfois être visible au bout **d'une semaine**. Cependant, les fortes températures et l'humidité ambiantes sont aussi des facteurs aggravants la maladie (181). Ces paramètres doivent donc aussi être pris en compte lorsque les chevaux sont mis à la pâture. Si les conditions climatiques ne permettent pas de laisser les chevaux à l'extérieur, un **contrôle strict des conditions environnementales** doit être mis en place. C'est à dire que les chevaux doivent être maintenus sur une litière autre que de la paille comme des copeaux de bois par exemple, le foin doit être dépoussiéré ou à défaut humidifié, mais cette intervention modifie les propriétés nutritionnelles de cet aliment, ou encore la distribution de fourrage peut être complètement arrêtée et remplacée par de la luzerne, de l'herbe fraîche ou encore par une alimentation en granulés. Enfin la ventilation du milieu de vie doit être adaptée. Les chevaux atteints d'ICPVR maintenus dans un milieu peu poussiéreux ne sont cliniquement pas distinguables de chevaux sains (182). Toutefois ces chevaux présentent toujours des signes d'obstruction des voies respiratoires en raison du caractère irréversible du remodelage de l'épithélium bronchique, bronchiolaire et alvéolaire. Le LBA obtenu sur des chevaux élevés dans de telles conditions ne met pas en évidence d'inflammation neutrophilique caractéristique de la maladie. Tout ceci prouve que le contrôle des conditions environnementales est indispensable dans la prise en charge de ces animaux et peut être suffisant.

Le traitement médical qui ne devrait constituer qu'un complément de la prise en charge repose sur l'administration de **glucocorticoïdes**, éventuellement de **bronchodilatateurs** et plus rarement de **mucolytiques**. Les glucocorticoïdes sont les seules molécules du traitement médical à cibler l'inflammation des voies respiratoires qui est au cœur de la pathogénie de cette affection. Ils peuvent être administrés de manière **systémique** ou par **inhalation**. Les inhalations semblent préférables dans la mesure où elles limitent les **effets secondaires** (immunosuppression, fourbure par

exemple) et permettent une distribution directement **au site d'intérêt**. De plus chez les chevaux de sport, l'utilisation de glucocorticoïdes systémiques n'est pas recommandée. Toutefois, les inhalations nécessitent l'achat d'un matériel coûteux et peuvent devenir assez chronophages car une observance optimale consiste en deux inhalations quotidiennes qui peuvent durer jusqu'à vingt minutes chacune. Une étude a néanmoins montré que l'inhalation d'une forte dose de budésonide améliore certes la fonction respiratoire mais provoque une diminution du cortisol sanguin comparable à celle engendrée par l'administration systémique de dexaméthasone (183). La posologie est donc à considérer avec attention. L'utilisation de bronchodilatateurs en monothérapie doit être évitée puisque la bronchostriction est secondaire à l'inflammation. De plus, ils peuvent être à l'origine d'effets secondaires comme une tachycardie, des tremblements, des trémulations musculaires. Leur association avec un glucocorticoïde permet de diminuer les doses administrées pour chaque molécule et ainsi de limiter l'apparition des effets indésirables propres à chacune d'entre elles (184). Ils peuvent se révéler intéressants en cas de crises sévères et/ou en cas d'hypoxémie marquée. Leur administration sans changement des conditions environnementales n'est pas recommandée car la quantité d'antigènes atteignant les voies respiratoires profondes est alors augmentée. Les bronchodilatateurs communément utilisés sont des anticholinergiques, des β_2 -agonistes comme le clenbuterol ou des méthylxanthines. L'atropine est également efficace mais n'est que rarement utilisée en raison de ses effets secondaires gastro-intestinaux (160). Des mucolytiques peuvent être ajoutés au traitement médical mais leur efficacité dans la prise en charge de l'ICPVR reste inconstante.

Enfin, la prise en charge de cette affection repose principalement sur une gestion environnementale. Si ces modifications ne peuvent être appliquées un traitement anti-inflammatoire stéroïdien doit être mis en place. Une administration par inhalation est préférable et la voie systémique intraveineuse ne devrait être réservée qu'aux crises aiguës (185) (186).

L'espérance de vie d'un cheval atteint d'ICPVR est de **huit ans après l'établissement du diagnostic** (187). Une fois le diagnostic établi, la majorité des chevaux présente toujours un risque de développer des épisodes intermittents de détresse respiratoire lors d'une exposition à la poussière et aux aéroallergènes. Malgré les recommandations 75% des propriétaires continuent de nourrir leurs animaux avec du foin et les maintiennent en box. Il semblerait que dans 50% des cas les **performances physiques soient diminuées**. Les troubles respiratoires mènent parfois au décès de l'animal ou à son euthanasie. Malgré ces données, le pronostic vital des chevaux affectés est plutôt bon lorsque les mesures hygiéniques et environnementales appropriées et recommandées sont mises en place.

3.2.2. Intérêt d'un modèle tridimensionnel

La conception d'un modèle tridimensionnel de l'inflammation chronique des petites voies respiratoires chez le cheval pourrait donc se justifier d'une part du fait que le rôle de la matrice extracellulaire dans le développement de cette maladie est certain (188), la création d'un modèle obtenu à partir d'une matrice extracellulaire décellularisée semble donc tout à fait adapté, et d'autre part du fait que sa pathogénie reste encore sujette à controverse. Certains auteurs prônent la prédominance d'une réponse immunitaire de type T_H1 , d'autres soutiennent qu'elle répond plus au schéma d'une réponse T_H2 ou encore à un équilibre T_H1/T_H2 . Enfin pour certains, aucun de ces schémas classiques ne peut être appliqué à la pathogénie de cette affection. Il semble cependant que les hypothèses d'hypersensibilité de type I et de type III aient été abandonnées. D'autre part, le nom attribué à cette maladie a longtemps fait débat ce qui souligne encore les zones d'ombre qu'il reste à éclairer pour la caractériser définitivement (189). Par ailleurs l'ICPVR touche de nombreux chevaux et malgré des périodes de rémission clinique, il n'existe à ce jour aucun traitement efficace permettant un rétablissement complet. Le remodelage des voies respiratoires induit par l'inflammation restera toutefois une limite à la découverte d'un traitement permettant une entière guérison. En effet, le lien entre l'inflammation et les modifications histologiques est indéniable mais les mécanismes mis en jeu restent peu documentés. La connaissance de ceux-ci pourrait permettre de cibler les facteurs de l'inflammation responsables afin d'étudier un traitement les visant spécifiquement et freiner ainsi l'évolution de la maladie. De même que les nombreuses recherches effectuées ont permis la découverte des nombreuses cytokines et chémokines intervenant dans la pathogénie, leurs interactions et les facteurs déclenchant leur libération nécessitent des investigations supplémentaires. De la même manière, les raisons de la sensibilité de certains animaux sont inconnues, on n'explique pas pourquoi aujourd'hui chez plusieurs chevaux placés dans les mêmes conditions environnementales certains développeront la maladie alors que d'autres non. Une prédisposition génétique est indéniable et a déjà été soulevée mais pour l'instant le support génétique en question n'a pas été établi. Ainsi, l'élaboration de modèles pulmonaires tridimensionnels pourrait grandement aider à l'approfondissement de ces connaissances.

Une meilleure connaissance de la pathogénie permettrait ensuite d'élaborer des tests diagnostiques plus sensibles et plus précis que les techniques employées aujourd'hui qui malheureusement ne permettent pas une prise en charge précoce de la maladie, ce qui contraint souvent les propriétaires à réduire prématurément l'activité de leur animal.

De tels modèles permettraient également d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans un contexte où tous les paramètres sont contrôlés et les séquences d'expérimentation répétables à une plus grande échelle que ce qui est réalisé actuellement. En effet, les études actuelles portent en général sur un faible nombre

d'animaux et dans des conditions parfois variables d'un animal à l'autre ou d'un groupe à l'autre. Les résultats obtenus à partir de modèles *ex vivo* seraient alors plus comparables et les données statistiques plus interprétables et significatives. Ces modèles pourraient également permettre de mieux comprendre le mode d'action des glucocorticoïdes dans le traitement de l'ICPVR. Chez l'homme nous savons qu'ils se lient à leurs récepteurs intracellulaires ce qui permet de réduire l'activité du NF-kB et de AP-1 aboutissant à une réduction de la production des médiateurs de l'inflammation issus de ces voies de signalisation. Chez le cheval l'utilisation de ces molécules n'a pas montré de diminution dans l'activité de ces facteurs de transcription malgré une amélioration de l'état clinique (190). Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour étudier cette dissociation entre le niveau d'obstruction des voies respiratoires et le niveau de marqueurs de l'inflammation dans le cadre d'un traitement avec des glucocorticoïdes. Des pistes de nouveaux traitements médicaux ont été soulevées comme les inhibiteurs des MMP ou la recherche de bronchodilatateurs longue action ou encore l'utilisation d'inhibiteurs du NF-kB dont la concentration dans le LBA a pu être corrélée au degré de dysfonctionnement pulmonaire (174). Ces modèles pourraient particulièrement bien s'y prêter. Enfin, d'autres alternatives au glucocorticoïdes sont plus particulièrement à l'étude et ont déjà montré des résultats prometteurs comme l'utilisation d'une immunothérapie par inhalation à base d'une nanoparticule : la cytosine-phosphate-guanosine (CpG) (191). Chez l'homme cette molécule a montré des propriétés réductrices de la réponse T_H2 et activatrices des lymphocytes T régulateurs. Cette molécule a fait l'objet d'un travail récent chez les chevaux souffrant d'ICPVR qui montre que son administration par inhalation conduit à une amélioration significative de paramètres cliniques et de laboratoire jusqu'à huit semaines après le traitement. Après l'administration de dix inhalations réparties sur 48h, une amélioration de la courbe respiratoire, une dilatation moins marquée des naseaux, une diminution du jetage, une auscultation pulmonaire plus claire, une diminution de la pression interpleurale, une diminution de la quantité et de la viscosité des sécrétions trachéales, une réduction du nombre de neutrophiles dans le LBA largement supérieure à celle engendrée par l'utilisation des corticoïdes, ainsi qu'une diminution de l'IL-4, de l'IL-8, de l'IL-17 et IFN- γ ont été notées. Enfin les propriétaires trouvent que les performances de leurs chevaux se sont améliorées après le traitement. Par ailleurs, aucun effet secondaire n'a été mis en évidence (192). Certains auteurs ont étudié l'intérêt d'ajouter un antibiotique à la prise en charge thérapeutique de la maladie dans le cas où des bactéries auraient été mises en évidence dans le lavage trachéal (193). Ils ont obtenu une amélioration de l'état clinique des chevaux ayant reçu un antibiotique en complément du traitement stéroïdien et bronchodilatateur, sans amélioration de la neutrophilie du LBA. L'intervention des bactéries dans la pathogénie est encore inconnue. Nous ne savons pas encore si elles sont secondaires à l'affection ou si elles font partie des facteurs primaires. Toutefois, ces premiers résultats montrent l'intérêt de l'utilisation de telles molécules lorsque des bactéries sont mises en évidence. Des investigations supplémentaires sont indispensables afin de confirmer l'effet bénéfique des antibiotiques, ainsi que le rôle joué par les bactéries dans la pathogénie de l'ICPVR. Les macrolides sont aussi étudiés

car déjà utilisés chez les hommes atteints d'asthme et réfractaires au traitement conventionnel pour leurs propriétés immunomodulatrices (194). L'étude de Mainguy-Seers et al. (195) n'est pas parvenue à montrer une diminution de la neutrophilie du LBA avec un traitement à l'azithromycine malgré la mise en évidence d'une diminution de la concentration en IL-8 et IL-1 β . La fonction pulmonaire, l'accumulation de mucus et le remodelage histologique n'ont pas montré d'amélioration non plus. Cependant des études supplémentaires sur l'utilisation des macrolides comme thérapie adjuvante pour l'asthme équin devraient être conduites (posologie, durée de traitement) connaissant les résultats encourageant obtenus chez l'homme. Le développement d'un modèle *ex vivo* pourrait permettre de continuer et faciliter les essais thérapeutiques pour cette molécule et pour d'autres et proposer ainsi une alternative aux glucocorticoïdes.

Un protocole de décellularisation reproductible et adapté au poumon du cheval qui permet de conserver ses propriétés structurales et mécaniques a déjà été établi (188). Cette étude a justement été réalisée dans le but de pouvoir approfondir les connaissances des mécanismes mis en jeu dans le développement de cette maladie et pour la recherche de nouveaux traitements potentiels. Ceci prouve l'intérêt de l'utilisation et du développement de tels modèles dans l'avenir de la médecine vétérinaire.

3.3. LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE DU WEST HIGHLAND WHITE TERRIER

La fibrose pulmonaire idiopathique est une affection qui touche particulièrement les chiens de race West Highland White terrier pour une raison encore inconnue. Elle semble être comparable à l'affection incurable du même nom rencontrée chez l'homme. Proposer un modèle de cette maladie chez le chien pourrait permettre de faire progresser nos connaissances à la fois pour le chien et pour l'homme.

3.3.1. Étiologie, pathogénie, physiopathologie, diagnostic, traitements actuels et pronostic

3.3.1.1. Définition et étiologie

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une affection **chronique** et **évolutive** du tissu interstitiel pulmonaire **d'étiologie inconnue** caractérisée par une augmentation des bruits respiratoires avec des crépitements inspiratoires et une opacification interstitielle diffuse à l'examen radiographique. Elle mène à une **perte progressive et irréversible de la fonction pulmonaire**.

Cette affection diffère des autres maladies pulmonaires chroniques déjà décrites chez le chien et est particulièrement décrite chez le West Highland white terrier (WHWT) mais sa prévalence globale dans l'espèce canine reste inconnue. Certains auteurs rapportent la présence de signes cliniques similaires chez d'autres races de

chien, notamment le Jack Russel ou le Staffordshire terrier mais de manière beaucoup plus anecdotique (196). En moyenne l'âge d'apparition des signes cliniques chez le WHWT est de 9 ans et de manière générale les chiens atteints sont d'âge moyen à avancé. L'âge au moment du diagnostic varie entre 9 et 13 ans en moyenne (196) (197). Aucune prédisposition de sexe n'a été mise en évidence. La prédisposition importante des WHWT à développer cette maladie laisse supposer l'existence de facteurs génétiques (198).

Les signes cliniques qui caractérisent cette affection se développent lentement et se détériorent au cours des mois. Fréquemment les propriétaires attribuent les signes observés au processus normal de vieillissement. Ils comprennent de la toux, une tachypnée au repos ou au cours d'un exercice physique léger, une dyspnée inspiratoire et une intolérance à l'effort. La toux est souvent à l'origine de la consultation. À l'auscultation pulmonaire des crépitements, et parfois des sifflements ou des râles sont audibles bilatéralement. Une respiration abdominale est souvent présente. Il n'y a en général pas d'atteinte de l'état général (196).

3.3.1.2. Pathogénie et physiopathologie

La pathogénie de cette maladie chez le chien n'est pas encore clairement élucidée (198).

Actuellement chez l'homme souffrant de fibrose pulmonaire idiopathique, qui semble pouvoir être assimilée à l'affection canine, l'hypothèse retenue est qu'une atteinte initiale de l'épithélium alvéolaire provoque une **apoptose des pneumocytes** suivie d'un **processus de cicatrisation anormal**. Les fibroblastes et les myofibroblastes prolifèrent, s'accumulent et produisent de la matrice extracellulaire en excès. Ce processus est comparable à une cicatrisation aberrante plutôt qu'à une inflammation chronique, auparavant considérée comme prédominante. Ce phénomène évolue jusqu'au stade de **fibrose**. Plusieurs études ont montré que l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires secondaire à une lésion est suivie d'une coagulation extravasculaire, d'une activation du système immunitaire et d'une activation anormale persistante des pneumocytes. Cette cascade implique des interactions intercellulaires et cellules-matrice complexes faisant intervenir de nombreux médiateurs biochimiques comme des facteurs de croissance, des enzymes, des chemokines, des facteurs de coagulation (199). Le médiateur pro-fibrotique TGF- β impliqué dans le recrutement cellulaire, la différenciation des myofibroblastes et l'induction de la production de matrice extracellulaire, est supposé jouer un rôle central dans la pathogénie (199). Une étude (200) a été menée pour déterminer le rôle de ce médiateur dans le développement cette maladie. Elle suggère que TGF- β 1 est effectivement impliqué dans la pathogénie puisque son activité est augmentée dans l'épithélium altéré. De même, Lilja-Maula et Al. (201) ont étudié l'expression des activines A et B (qui sont des cytokines appartenant à la super famille des TGF- β) dans le tissu pulmonaire de chiens

normaux et dans le tissu pulmonaire de WHWT atteints de FPI et ont étudié la présence d'activine B dans le LBA de WHWT sains et malades. Les résultats obtenus montrent que l'activine B est fortement exprimée dans l'épithélium alvéolaire altéré alors que l'activine A n'est pas significativement retrouvée, que ce soit chez des chiens sains ou atteints de FPI. L'activine B est dès lors présumée jouer un rôle dans la fibrose et dans l'altération de l'épithélium alvéolaire. Par ailleurs l'activine B peut être détectée dans le LBA des chiens atteints de FPI.

Chez l'homme, plusieurs facteurs de risque sont suggérés comme la fumée de cigarettes ou l'aspiration de liquide gastrique. Certaines contraintes mécaniques lors de la respiration sont également supposées jouer un rôle dans la pathogénie de cette affection. Des mutations génétiques sont aussi associées au développement de la maladie (198)(202). Chez le WHWT, un questionnaire envoyé aux propriétaires a dégagé certains facteurs de risque incluant un lien de filiation avec un individu atteint, vivre dans une maison ancienne, l'absence de système de ventilation et des toilettages fréquents en salon de toilettage (199). Cette maladie semble donc être le **fruit d'une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux**.

De même, chez l'homme, la fibrose pulmonaire idiopathique familiale est associée à une mutation du gène codant pour la protéine C du surfactant, suggérant l'intervention de cette protéine dans la pathogénie de la maladie mais aucune mutation n'a été mise en évidence chez les WHWT atteint de FPI (203).

L'étude de Roels et al. (204) montre que l'intervention d'un herpèsvirus dans la pathogénie de cette affection est très peu probable. De même que l'association entre la FPI et une infection fongique est peu plausible (199).

Finalement, l'épaississement de la matrice extracellulaire mène à un élargissement de l'interface air-sang extrêmement fine en conditions physiologiques. Les échanges gazeux étant altérés, la maladie progresse lentement vers une **insuffisance respiratoire**. La fibrose modifie les **propriétés mécaniques** de l'organe, la compliance diminue et l'insufflation des alvéoles devient plus difficile.

3.3.1.3. Diagnostic

Le diagnostic de cette affection est un **diagnostic d'exclusion** et nécessite souvent soit un examen d'imagerie tomodensitométrique de bonne qualité soit un examen histologique du parenchyme pulmonaire. (198) Les données récoltées lors de l'examen clinique déjà exposées et l'évolution lente des signes cliniques sont évocatrices de la maladie. L'examen histopathologique est seul à pouvoir fournir un diagnostic de certitude. Chez le chien le diagnostic de certitude est donc souvent nécropsique car les biopsies pulmonaires ne sont pas réalisées en routine.

L'examen radiographique du thorax révèle des anomalies mais n'est ni spécifique ni sensible. Une **opacification interstitielle** est toujours mise en évidence. La sévérité des modifications observées varie mais elles sont toujours généralisées à l'ensemble du parenchyme pulmonaire. Une **opacification bronchique** peut parfois se surajouter. Une **hypertrophie cardiaque droite** peut aussi être constatée et suggère un « cœur pulmonaire » (196). Toutefois le diagnostic définitif ne peut pas reposer uniquement sur ces constatations puisqu'un tel aspect peut être associé à de nombreuses autres situations (une infiltration néoplasique ou éosinophilique, une pneumonie infectieuse ou l'exposition à certains toxiques en sont quelques exemples) et peut même être retrouvé chez des WHWT sains (196) (198) (Figure 24).

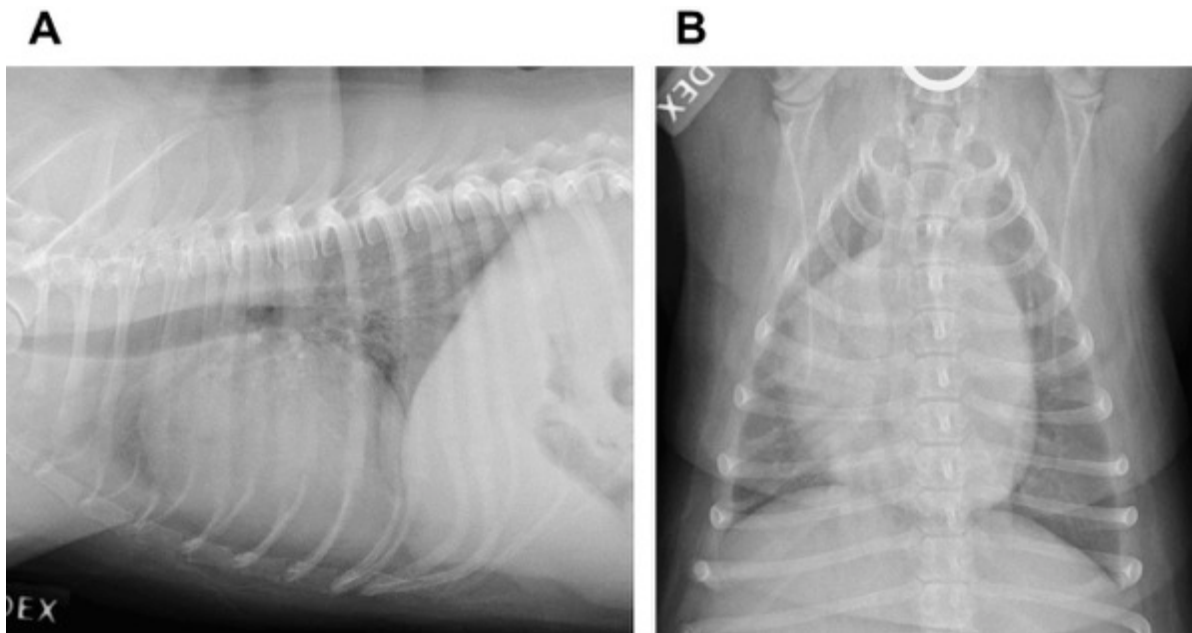


Figure 24 : Radiographies thoraciques d'un WHWT de 12 ans atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (d'après (198)). Radiographies latérale droite (A) et ventro-dorsale (B) montrant une opacification bronchique et péribronchique diffuse et une silhouette cardiaque de taille augmentée.

Un **scanner** du thorax permet d'obtenir des images avec une meilleure résolution et donc une meilleure évaluation du parenchyme pulmonaire et fait partie des examens complémentaires **de choix** chez l'homme souffrant de pneumonie interstitielle. Toutefois chez le chien, il doit être réalisé sous **anesthésie générale**, ce qui n'est **pas recommandé** chez les sujets les plus sévèrement atteints (198). Les images caractéristiques sont alors une **opacification en verre dépoli**, des images de **bronchiectasie** et des images en **nid d'abeille** dans les cas les plus sévères. Une **corrélation entre la sévérité des signes cliniques et la sévérité des anomalies** observées sur les images tomodensitométriques peut être établie et Thierry et al. (205) ont proposé une échelle de gradation de la maladie en fonction des images obtenues (Tableau V). Toutefois la valeur pronostique des images reste encore à étudier.

Tableau V : Critères utilisés pour la gradation de la sévérité des opacifications tomodynamométriques pulmonaires (d'après (205))

Grade	Aspect pulmonaire
0 (normal)	Poumon normal
1 (intensité légère)	En verre dépoli
2 (intensité modérée)	Opacification en verre dépoli en mosaïque, aspect réticulaire focal, consolidation pulmonaire, ou bronchiectasie
3 (Intensité sévère)	Aspect réticulaire généralisé, images en nid d'abeille, bronchiectasie, ou pattern nodulaire

L'examen **bronchoscopique** est intéressant mais nécessite lui aussi une **anesthésie générale** qui peut être risquée. Une supplémentation en oxygène avant, pendant et après la procédure est recommandée. Les éléments observés ne sont **pas spécifiques** et les modifications bronchiques ne permettent pas de distinguer une bronchite chronique de la fibrose pulmonaire même si l'accumulation de mucus, l'hyperhémie et les irrégularités de la muqueuse bronchique sont souvent plus marquées en cas de bronchite chronique. Les anomalies rapportées en cas de FPI sont un collapsus trachéal, des irrégularités de la muqueuse bronchique, une augmentation de la quantité de mucus bronchique, une bronchomalacie, un collapsus dynamique des voies respiratoires, et une bronchiectasie (197). D'après Corcoran et al. (206), la **combinaison de radiographies thoraciques de bonne qualité et d'une bronchoscopie donnerait une chance d'obtenir un diagnostic de FPI.**

Le **lavage bronchoalvéolaire** révèle une augmentation de la cellularité due à un enrichissement en macrophages, en neutrophiles et en mastocytes. (198) (197)

Les **examens hématologiques et biochimiques** ne révèlent pas d'anomalie (196) mais sont indiqués pour **exclure** les autres causes d'intolérance à l'effort (198).

L'examen **histopathologique post mortem** montre une **fibrose** modérée à sévère des septums inter-alvéolaires ainsi qu'une **métaplasie** squameuse de l'épithélium. La fibrose peut être diffuse, multifocale ou régionale. D'autres types de modifications peuvent être observées comme la présence d'hémosidérophages intra-alvéolaires et septaux (196) (207). Les septums inter-alvéolaires sont **épaissis** par une accumulation de **matrice extracellulaire** qui va de la superposition de quelques fibres de collagène, de type I et de type III particulièrement, parallèlement les une aux autres à l'accumulation dense de nombreuses fibres aboutissant à une couche très épaisse de matrice (207). Une disposition concentrique des fibres de collagène est également identifiable autour des vaisseaux pré et post-capillaires mais serait plutôt caractéristique d'une lésion débutante car elle n'est retrouvée que dans les cas de fibrose discrète (208). Dans tous les cas il y a mise en place d'un infiltrat cellulaire dans l'interstitium et dans la lumière alvéolaire composé de lymphocytes, de macrophages et

de cellules plasmatiques. Dans les cas les plus sévères, une **hyperplasie et des atypies des pneumocytes de type II** sont visibles (208) (Figure 25). La distribution des fibres élastiques ne semble pas modifiée. Une accentuation de la fibrose péribronchique et sub-pleurale est objectivée par certains histopathologistes (208).

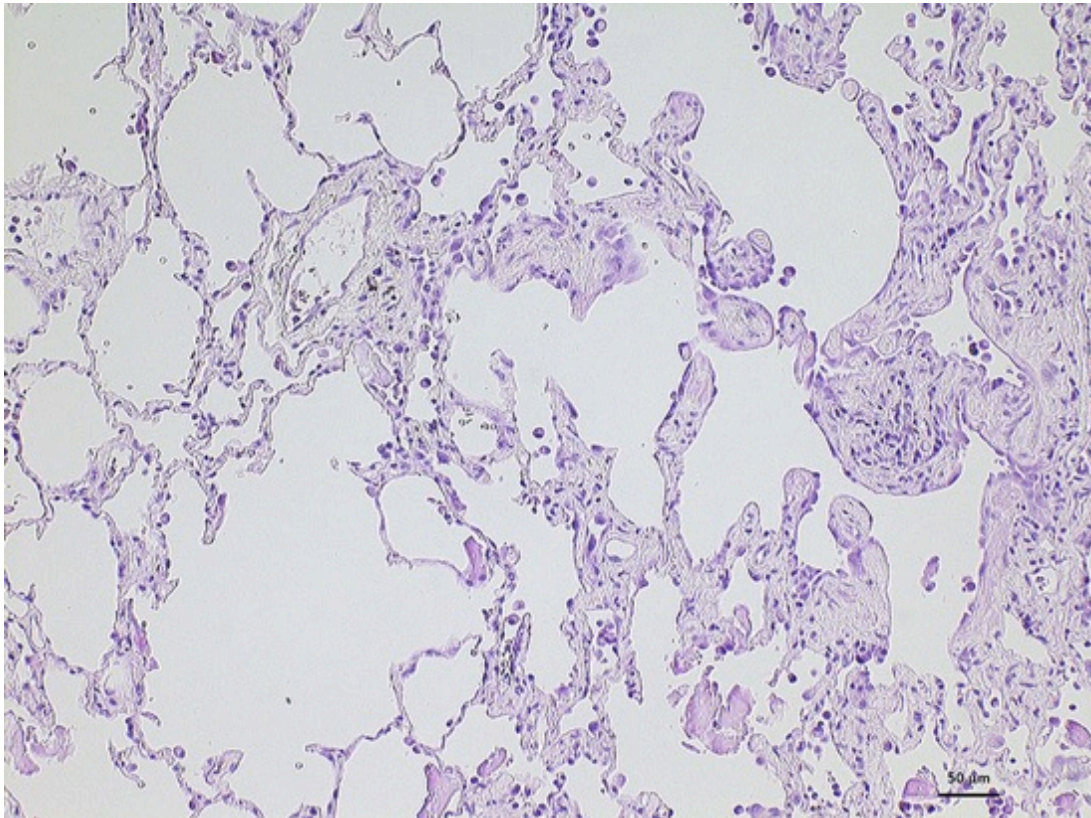


Figure 25 : épithélium alvéolaire d'un WHWT atteint de fibrose pulmonaire idiopathique (d'après(198)). Fibrose interstitielle diffuse discrète à gauche de l'image et lésions de fibrose interstitielle multifocale sévère avec atypies et hyperplasie de l'épithélium alvéolaire sur la droite de l'image.

La **mesure des gaz artériels**, même si elle n'est pas réalisée en routine, permet de mettre en évidence une **hypoxémie** modérée (PaO_2 de 60 à 80 mmHg) dans 45% des cas et une hypoxémie sévère ($\text{PaO}_2 < 60$ mmHg) dans 45% des cas également (198). Toutefois ces modifications ne sont pas spécifiques et servent le plus souvent à estimer la sévérité des lésions plutôt qu'à établir le diagnostic.

L'échocardiographie est un examen complémentaire essentiel pour **exclure une maladie cardiaque** concomitante et permet de quantifier la pression artérielle pulmonaire nécessaire pour mettre en place une prise en charge thérapeutique (199). À l'auscultation cardiaque, un souffle systolique de bas grade est parfois audible à droite en raison d'une régurgitation tricuspiddienne due à **l'hypertension pulmonaire induite** par la maladie. (198).

Des recherches sur de **potentiels biomarqueurs diagnostiques** sont réalisées. L'étude de Kraft et al. (209) avait pour but la recherche de gènes qui seraient plus ou moins exprimés chez les WHWT atteint de FPI. Ce travail a mis en évidence le fort potentiel de la **chemokine CCL2** en tant que biomarqueur sérique puisque sa concentration s'est révélée significativement plus élevée dans le sérum des WHWT affectés que dans celui des WHWT sains. Par ailleurs, la recherche de cette protéine peut également être réalisée sur le LBA.

La distinction doit être faite avec les autres maladies respiratoires chroniques retrouvées chez le chien telles que la bronchite chronique, d'autant plus que cette affection est couramment retrouvée chez les terriers. Le diagnostic de bronchite chronique est obtenu par bronchoscopie qui révèle des modifications chroniques de la muqueuse bronchique. Par ailleurs le développement de ces deux maladies simultanément est possible et l'implication de l'une dans le développement de l'autre reste à étudier (196). La réalisation d'un coproscopie permet d'éliminer les maladies parasitaires respiratoires.

3.3.1.4. Traitements actuels et pronostic

Chez l'homme les traitements par corticoïdes systémiques et par immunosuppresseurs ne sont plus indiqués depuis 2012 dans la mesure où cette maladie n'est plus considérée comme une affection inflammatoire mais comme un processus de cicatrisation aberrant (202).

Il n'existe **aucun traitement efficace** et chez le chien celui-ci repose encore sur l'administration de **glucocorticoïdes et de théophylline** qui **atténuent** les signes cliniques (198). Les glucocorticoïdes peuvent agir sur la bronchite chronique qui y est parfois associée. Les études menées chez l'homme atteint de pneumonie interstitielle idiopathique portant sur l'immunomodulation, l'administration d'anticoagulants, de vasodilatateurs, d'anti-fibrotiques, ou d'inhibiteurs de cytokines n'ont montré aucun résultat probant. La transplantation pulmonaire est la seule prise en charge qui permet d'améliorer l'espérance de vie chez l'homme dans cette situation (198).

Il s'agit d'une maladie évolutive sans traitement efficace à ce jour, qui aboutit à une insuffisance respiratoire. L'espérance de vie est **d'environ 18 mois** à partir de l'apparition des signes cliniques et souvent moins d'un an une fois que le diagnostic est établi. Toutefois il existe une grande variation entre les sujets.

3.3.2. Intérêt d'un modèle tridimensionnel

La création d'un modèle tridimensionnel de la FPI du WHWT serait profitable dans la mesure où la pathogénie de cette affection est encore extrêmement méconnue. Or tant que la pathogénie n'est pas maîtrisée il est difficile de mettre en place une prise en charge thérapeutique efficace. L'assimilation au trouble humain du même type est souvent faite mais des différences entre les maladies ont déjà été mises en évidence. Il est donc justifié de penser que la FPI humaine n'est pas un bon modèle pour celle du chien et inversement. L'obtention d'un modèle tridimensionnel est d'autant plus nécessaire que cette affection est irrémédiablement mortelle.

Des facteurs environnementaux en plus des facteurs génétiques sont fortement soupçonnés pour provoquer les premières lésions à l'origine du dérèglement du phénomène de cicatrisation. Un modèle tridimensionnel pourrait permettre la recherche de ces facteurs.

De plus, il existe une comorbidité avec la bronchite chronique, un tel modèle permettrait d'approfondir cet aspect de la maladie et peut être de mettre en évidence des facteurs de risques.

Par ailleurs, cette affection fait à priori intervenir de nombreuses interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules. C'est une réponse inappropriée des cellules de l'épithélium alvéolaire et des septums inter-alvéolaires qui aboutit à la synthèse anormale de matrice, or l'élaboration du modèle comme vu précédemment débute par l'ensemencement de cellules sur la matrice extracellulaire pulmonaire, ce qui paraît tout à fait adapter pour étudier de telles interactions.

De nombreuses études sont en cours afin de trouver des biomarqueurs à la fois diagnostiques et qui permettraient de faire progresser nos connaissances sur la pathogénie. Les inconvénients rencontrés sont le peu de cas regroupés pour chaque étude qui sont d'ailleurs souvent rétrospectives, il n'est donc pas toujours évident d'obtenir toutes les données nécessaires et leurs conditions d'obtention diffèrent parfois d'un cas à l'autre. Comme évoqué précédemment, certains marqueurs comme CCL2 (176) et TGF- β 1 (200) ont démontré leur potentiel mais des investigations supplémentaires seraient nécessaires afin d'établir la possibilité d'établir un traitement agissant sur ces voies de signalisation puisque celles-ci semblent impliquer dans la pathogénie. D'autres marqueurs sont à l'étude, comme l'endothéline-1. Il s'agit d'un peptide vasoactif, pro inflammatoire et pro fibrotique. Elle est retrouvée dans le sérum et dans le LBA chez l'homme atteint de FPI. Elle est aussi significativement élevée chez les chiens atteints de cette maladie en particulier et pourrait donc servir de test diagnostique. Du fait de ses propriétés ce peptide pourrait bien intervenir dans la pathogénie. Chez l'homme elle a montré sa capacité à initier une transition des cellules épithéliales alvéolaires en « fibroblaste-like », à favoriser la production de matrice

extracellulaire, à stimuler la production de collagène de type I et de type III. Elle ne pourrait par contre pas être utile en tant que marqueur pronostic car aucun lien n'a pu être établi entre sa concentration et la sévérité de la maladie (210). Encore une fois, des recherches supplémentaires sont essentielles pour mettre en évidence son lien avec la pathogénie et un modèle tridimensionnel s'y prêterait tout à fait. Dès lors, des antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1 pourraient être une possibilité thérapeutique à investiguer. De même, l' amino propeptide terminal du pro-collagène de type III (PIIINP) est un marqueur de l'activité des fibroblastes et est élevé chez l'homme atteint de pneumonie interstitielle idiopathique. Chez le chien, son taux est élevé dans le LBA et peut distinguer la bronchite chronique de la fibrose (198). La mise en place d'un protocole ou d'un test de mise en évidence approprié reste à étudier.

Pour ce qui est des possibilités thérapeutiques, très peu de molécules sont à l'essai chez le chien actuellement, et il n'existe toujours pas à ce jour de traitement. Par exemple, la pirfenidone chez l'homme a montré des effets antifibrotiques, anti-oxydantes et anti inflammatoires et ralentit le déclin de la fonction respiratoire mais ne guérit toutefois pas la maladie. Cette molécule pourrait être envisagée chez le WHWT mais actuellement aucune donnée n'est disponible ne serait-ce que sur son innocuité chez le chien(198).

Le manque de connaissances sur la pathogénie de la FPI du WHWT, la difficulté d'établissement du diagnostic et l'absence de possibilité thérapeutique de cette maladie mortelle montrent une fois de plus que la création de modèles tridimensionnels serait complètement profitable à l'évolution de la médecine vétérinaire.

3.4. LA MYCOSE DES POCHEs GUTTURALES CHEZ LE CHEVAL

Les poches gutturales sont des appendices spécifiques des chevaux et de certaines autres espèces. Le développement de modèles tridimensionnels paraît être l'outil le plus approprié pour les étudier au mieux.

3.4.1. Anatomie, histologie et physiologie des poches gutturales

3.4.1.1. Anatomie

Les poches gutturales correspondent à des **diverticules pairs** remplis d'**air**, d'environ 10 cm de long avec une capacité de 300 à 500 ml, provenant des conduits auditifs qui relient l'oreille moyenne au nasopharynx. Ces structures seulement présentes chez le cheval et autres Perissodactyles communiquent avec le pharynx *via*

l'orifice pharyngé du conduit auditif. Elles se situent entre la base du crâne et l'atlas dorsalement et le pharynx et la partie proximale de l'œsophage ventralement, et sont recouvertes latéralement par les muscles ptérygoïdes et les glandes mandibulaires et parotides. Médialement, les sacs droits et gauches sont séparés par les muscles longs de la tête et un fin septum médian ventralement. Elles reposent principalement sur le pharynx mais elles recouvrent aussi l'os stylohyoïdien dont une partie divise incomplètement chaque poche en un **compartiment médial** et un **compartiment latéral** (Figure 26)(211) (212) (213).

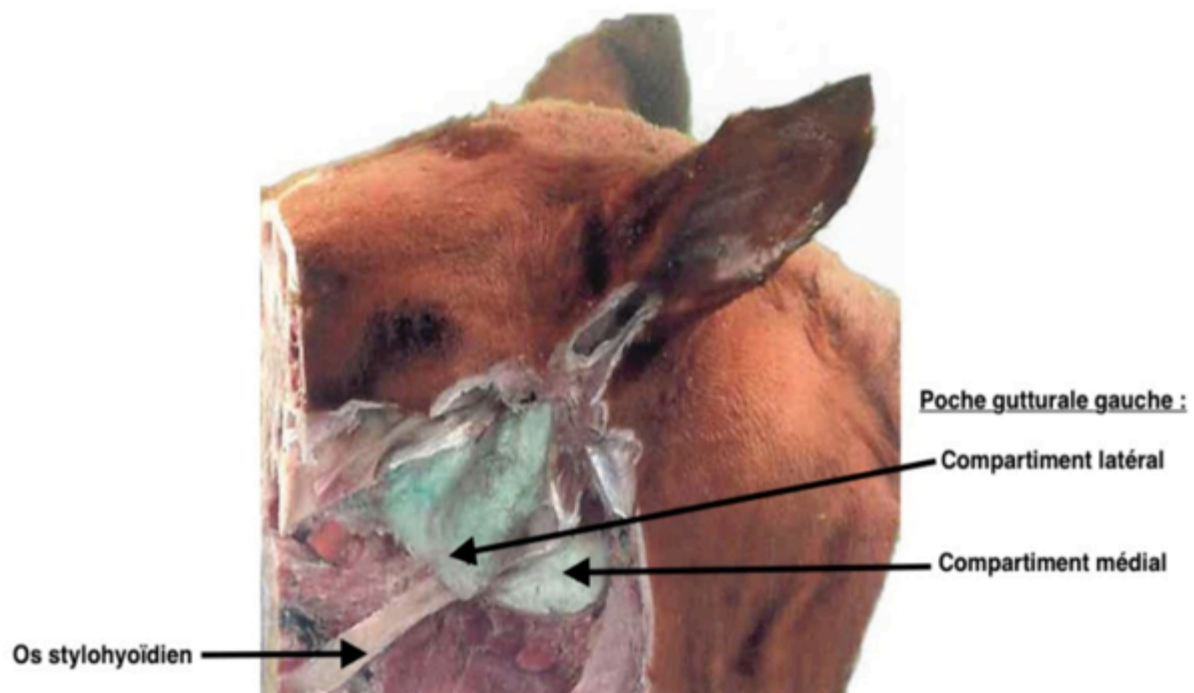


Figure 26 : Morphologie d'une poche gutturale (d'après (211))

Ces poches sont en contact avec **de nombreux nerfs crâniens et artères**. Les nerfs qui s'étendent le long de ces diverticules sont le nerf glossopharyngien, le nerf vague, le nerf accessoire, le nerf hypoglosse et le prolongement du tronc sympathique. Le nerf facial dispose d'un contact plus limité. **L'artère carotide interne** longe le compartiment médial et dessine un repli muqueux à l'intérieur de celui-ci, bien visible à l'examen endoscopique (**Figure 27**). L'artère carotide externe chemine ventralement au compartiment médial avant de rencontrer la paroi latérale puis rostrale du compartiment latéral (211). Tous ces rapports sont à l'origine de signes cliniques relativement importants lors d'une affection des poches gutturales comme l'inflammation de l'oreille moyenne par extension via les trompes auditives, une épistaxis en cas d'érosion d'une artère (l'artère carotide interne étant la plus souvent touchée), des difficultés à la déglutition en cas d'atteinte des nerfs glossopharyngien et vague, une hémiparésie laryngée en cas d'atteinte du nerf vague, le syndrome de Claude

Bernard Horner si le nerf sympathique est impliqué. Les atteintes du nerf facial sont plus rares et l'artère carotide externe semble plutôt bien protégée (211).

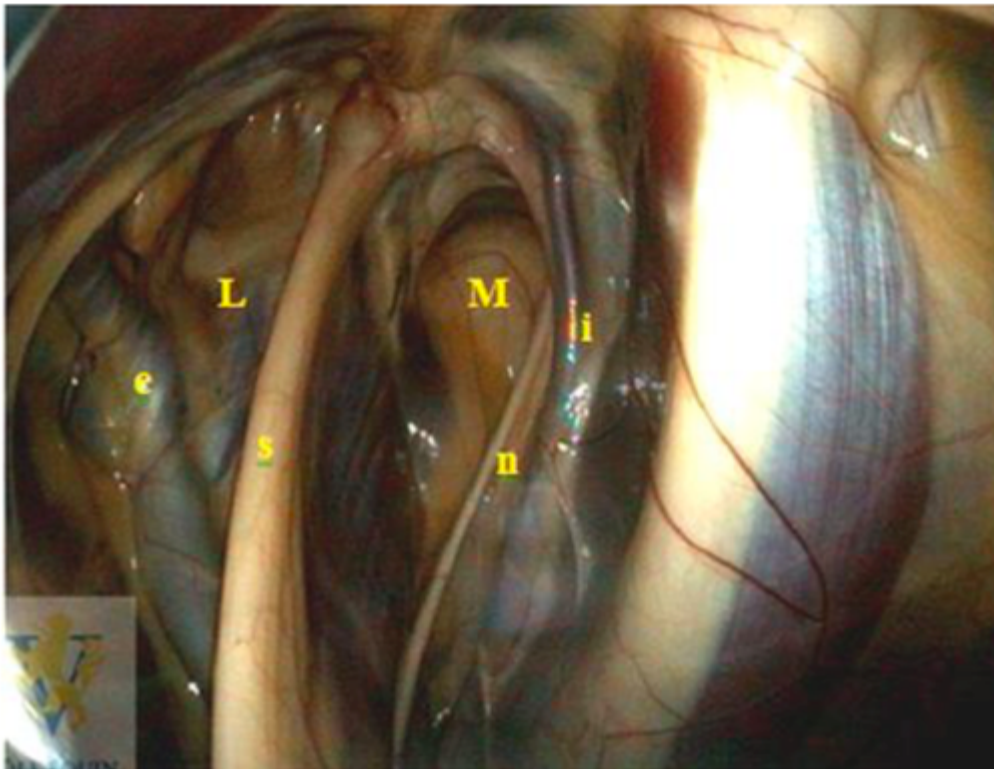


Figure 27 : Vue endoscopique d'une poche gutturale droite (Source : Pôle équin Vetagro-Sup). S : os stylohyoïde, L : compartiment latéral, M : compartiment médial, e : artère carotide externe, i : artère carotide interne, n : nerfs crâniens (IX, X, XI).

3.4.1.2. Histologie et cytologie des poches gutturales saines

Les poches gutturales sont deux réservoirs membraneux délimités par une **paroi mince** et transparente qui dérive de l'expansion membranacée des trompes d'Eustache. L'épaisseur de la paroi varie de 0,1 à 0,5mm. Cette paroi est recouverte d'une muqueuse respiratoire mince formée d'un **épithélium cilié pseudostratifié** comportant de nombreuses **cellules caliciformes** sécrétant du mucus (214) (215). Cette structure rappelle celle de l'épithélium respiratoire au niveau **trachéale** ou des **bronches** principales. D'où l'intérêt de développer un modèle tridimensionnel de ces entités pour pouvoir étudier la mycose qui les touche. La muqueuse repose sur une sous muqueuse lâche qui a la particularité de contenir une grande quantité de structures lymphoïdes pouvant intervenir dans l'immunité.

Un échantillon de cellules peut être obtenu par prélèvement percutané au travers du triangle de Viborg ou par prélèvement endoscopique. Un prélèvement cytologique normal contient **moins de 5% de neutrophiles**, une grande proportion de cellules épithéliales ciliées, quelques cellules épithéliales non ciliées, et moins de 1% de

monocytes, lymphocytes et éosinophiles. Au **delà de 25% de neutrophiles** le prélèvement est considéré comme **anormal ou pathologique** (213) (216) (217). Une flore bactérienne transitoire non pathogène peut être isolée assez fréquemment (51,8% des lavages d'après Chiesa *et al.* (217)) et la proportion de neutrophiles augmente en présence d'une croissance bactérienne. Dans cette étude, aucune croissance fongique n'est mise en évidence (217).

3.4.1.3. Physiologie

Le rôle des poches gutturales est longtemps resté sibyllin et de nombreuses propositions ont été faites notamment un rôle d'aide au dégagement des cavités nasales, ou bien d'intervention dans l'ouïe ou encore un simple moyen de remplir l'espace par exemple (218). Cependant leur implication dans la **thermorégulation** semble prépondérante. En effet les animaux athlétiques doivent maintenir la température de leur cerveau car cet organe peut être sévèrement altéré par une hyperthermie. Toutefois la façon dont procèdent les chevaux pour maintenir cette température reste un mystère. Ils disposent cependant d'une organisation anatomique singulière de leurs artères carotides internes, qui amènent le sang à l'encéphale, puisqu'elles sont enveloppées par les poches gutturales remplies d'air. Dès lors, une des hypothèses principales concernant le rôle de ces structures est leur capacité à rafraichir le sang parvenant à l'encéphale lors d'un exercice physique grâce à leur **contact étroit avec les artères carotides internes**, protégeant ainsi celui-ci de l'hyperthermie. Keith *et al.* ont pu confirmer cette hypothèse chez quatre chevaux en mesurant la température de l'air dans les poches gutturales et la température du sang dans les artères carotides internes, en amont, au milieu et en aval des poches gutturales en utilisant des thermocouples (219).

3.4.2. Étiologie, pathogénie, physiopathologie, diagnostic et traitements actuels.

3.4.2.1. Étiologie

L'agent pathogène le plus souvent mis en évidence lors de mycose des poches gutturales est *Aspergillus spp.* et en particulier *Aspergillus fumigatus*, mais *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger* ont aussi été décrit (220). Il s'agit d'un des organismes fongiques les plus communs transmis par aérosols. Ces organismes saprophytes sont largement présents dans **l'environnement**, notamment dans la terre, les végétaux en décomposition et les débris organiques. Ce sont des entités **opportunistes** qui envahissent les tissus des animaux. Les animaux en bonne santé sont résistants à l'infection sauf s'ils sont exposés à une quantité massive de conidies ou de mycéliums. (220) (221). De par leur petite taille les conidies (2 à 3 µm de diamètre) restent en suspension dans l'air sur de longues périodes, peuvent être **inhalées** et pénétrer dans l'appareil respiratoire et dans les poches gutturales (220). Des particules fongiques sont constamment inhalées mais chez des chevaux sains, les mécanismes de

défense de l'appareil respiratoire, soit l'appareil muco-ciliaire et la phagocytose par les macrophages assurent le nettoyage des muqueuses (220)(221). *Aspergillus* spp. est thermotolérant et prospère à 37°C, mais est capable de croître jusqu'à 55°C. Il est donc capable de se développer rapidement dans les tissus d'un hôte immunodéficient ou déjà fragilisé par l'utilisation prolongée de corticoïdes ou d'antibiotiques ou fragilisé par une autre affection comme une atteinte de l'appareil respiratoire haut, une lésion du tissu mou de la face ventrale de la bulle tympanique ou l'existence d'un anévrisme d'une des artères carotides ou encore une migration larvaire erratique (221). Il peut survivre dans le flux sanguin et dans les tissus grâce à sa propension à trouver et assimiler des facteurs nutritifs dans cet environnement étranger, notamment le fer, le phosphate grâce à la production de plusieurs types de sidérophores, de phosphatases et de phospholipases. *Aspergillus* spp. dispose également de certaines caractéristiques lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et est alors protégé de l'attaque par les macrophages et les neutrophiles. *Aspergillus* spp. présente aussi des propriétés anti-oxydantes et de nombreuses pompes permettant la libération de toxines (220)(221).

3.4.2.2. Pathogénie et physiopathologie

La mycose des poches gutturale est une affection **sporadique** et touche principalement les chevaux élevés en **box**. Il n'y a pas de prédisposition d'âge, de sexe ou de race rapportée et les poulains peuvent également être touchés (222). L'infection est le plus souvent **unilatérale** mais peut **devenir bilatérale** si le septum médian est érodé. Elle est présumée débiter par **l'inhalation de spores provenant de foin moisi**. L'infection peut être asymptomatique, il est donc difficile d'obtenir des données épidémiologiques précises de l'infection (222)(221).

La surface de la muqueuse des parois médiale et dorsale est dans un premier temps recouverte par des **plaques d'exsudat fibronécrotique** arrondies surélevées et **focales** qui peuvent évoluer et **confluer** en une grande masse fibronécrotique (223). Cette répartition **dorsomédiale** des premières lésions reste inexplicée. Microscopiquement les lésions correspondent à une **inflammation nécrotique sévère** de la muqueuse et de la sous-muqueuse associée à une **vascularite** généralisée et des **hyphes fongiques** intralésionnels. La nécrose de la paroi des poches peut s'étendre jusqu'à la **paroi de l'artère carotide interne** adjacente ce qui provoque une **hémorragie** dans la lumière de la poche gutturale et une **épistaxis** récurrente (Figure 28). L'artère carotide externe et ses ramifications peuvent également être touchées et l'artère maxillaire est atteinte dans environ un tiers des cas. Le signe clinique le plus communément observé est donc une **épistaxis modérée à sévère** (213). L'envahissement de l'artère carotide interne provoque une artérite, qui peut également mener à la formation d'un **anévrisme** et une **hémorragie fatale**. Dans d'autres cas, le champignon peut directement infiltrer l'artère carotide interne, menant à la **libération d'embolus mycosiques** puis généralement à de multiples **infarctus cérébraux**. La

dysphagie, parfois observée lors de cette affection, est associée à une atteinte de la branche pharyngée des **nerfs vagues et glossopharyngien** qui cheminent ventralement à la poche gutturale. Le syndrome de **Claude Bernard-Horner** fait suite à des lésions du ganglion crano-cervical et des fibres sympathiques localisés caudo-dorsalement à la poche et se manifeste par une ptose palpébrale, un myosis et une enophtalmie, ainsi que des plages de sudation au niveau cervical et une congestion de la muqueuse nasale. Enfin, **l'hémiplégie laryngée** résulte d'une atteinte du **nerf laryngée**. Dans les cas d'affection prolongée, une **pneumonie par aspiration** peut se développer (223)(213)(224). Un cas d'hémorragie rétropharyngée lié à une mycose des poches gutturales a déjà été décrit et fait donc partie des complications possibles à surveiller (225).

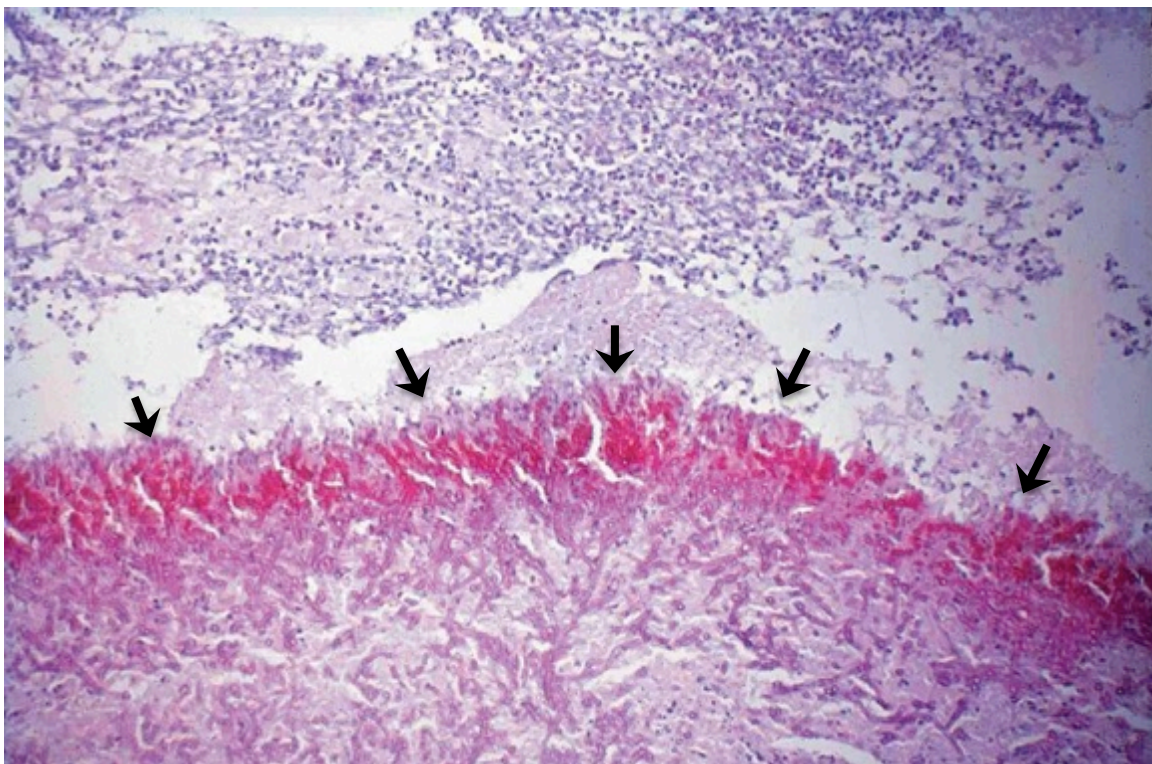


Figure 28 : Coupe histologique de la carotide interne montrant l'invasion de la paroi vasculaire par les hyphes fongiques (→)(d'après (226))

3.4.2.3. Diagnostic

Les signes cliniques et en particulier **l'épistaxis récurrente et abondante** et/ou l'atteinte **des nerfs crâniens** sont fortement évocateurs d'une mycose des poches gutturales. Les autres signes cliniques qui peuvent être observés sont un écoulement nasale unilatéral ou bilatéral séreux à muco-purulent, une dysphagie et de la toux (227). Le diagnostic doit cependant être confirmé par un **examen endoscopique** de la région qui révèle la présence de **plages nécrotiques et de tapis fongiques** (Figure 29). La réalisation de cet examen doit être précautionneuse car le passage de l'endoscope

peut déloger un caillot sanguin et mener à de nouveaux saignements abondants. Le développement de l'échographie de cette zone pour le diagnostic de cette affection permettrait de palier ces risques (228). Il n'existe pas de relation apparente entre la sévérité des signes cliniques et la taille des lésions observées (224). Le diagnostic définitif est obtenu par examen histologique qui met en évidence l'invasion du tissu par un hyphe fongique et permet d'isoler et d'identifier l'agent pathogène (229), cependant la réalisation de biopsies peut provoquer une hémorragie et est donc à éviter (230). Le diagnostic différentiel principal d'une hémorragie sévère des poches gutturales regroupe l'avulsion du muscle long de la tête de l'os basi-sphénoïde après un traumatisme, le développement d'une néoplasie dans les poches ou la présence d'un corps étranger (230).

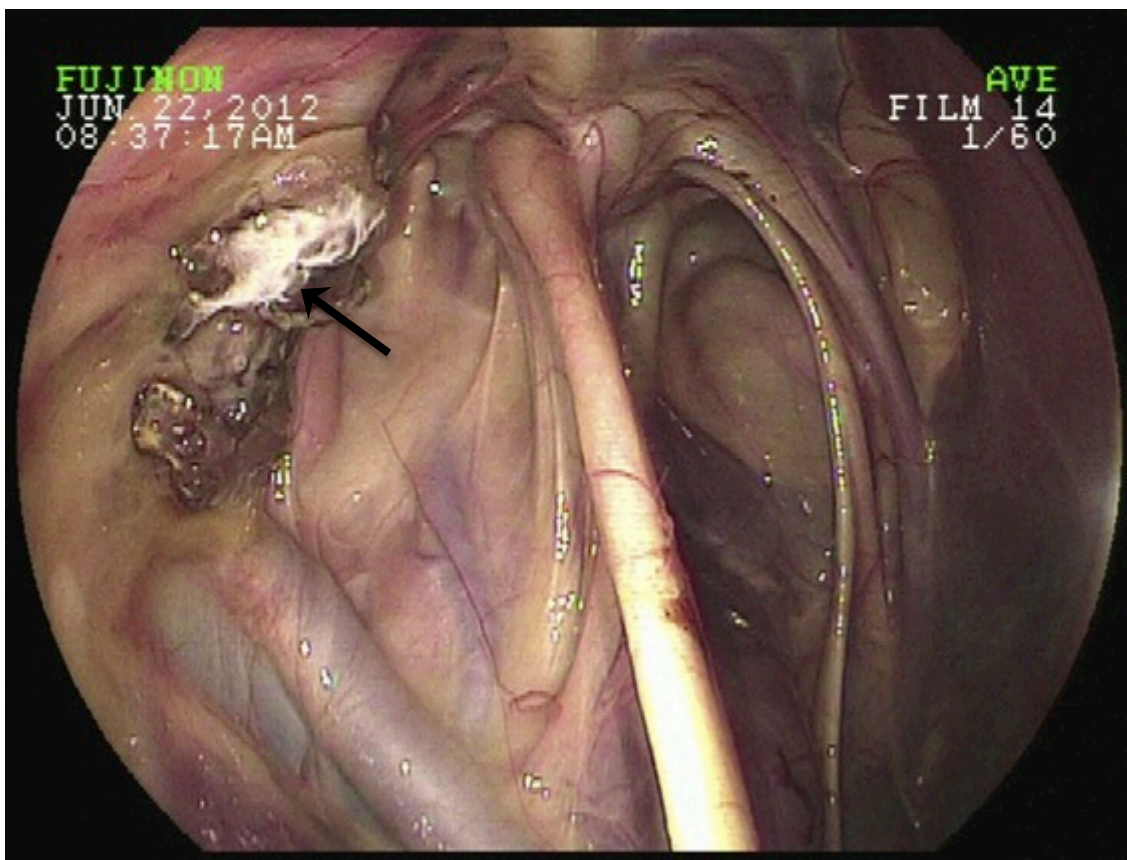


Figure 29 : Image endoscopique d'une plaque mycosique sur la paroi d'une poche gutturale droite (→) (d'après (224))

3.4.2.4. *Traitements actuels*

Le traitement peut être **chirurgical ou non chirurgical**. Le traitement médical peut être réalisé si le propriétaire refuse l'alternative chirurgicale et si les lésions n'ont pas encore provoqué de saignements et qu'il n'y a pas de risques apparents de saignements imminents, c'est à dire que les lésions ne sont pas localisées le long d'une

artère. Il consiste en l'application d'un **traitement topique** parfois associée à un **traitement systémique**, est généralement **lent** et donne des **résultats inconstants** (227). Des **lavages** peuvent être réalisés quotidiennement et les plaques de nécroses peuvent être décollées grâce à la pince à biopsie et à la brosse de cytologie de l'endoscope. L'utilisation de la povidone iodée ou du thiabendazole donnent des résultats mitigés (227). La nystatine, la natamycine, le ketoconazole, l'enilconazole et le miconazole n'ont qu'une activité réduite sur *Aspergillus* spp. En revanche l'amphotéricine B est effective contre cet organisme mais son utilisation systémique chez le cheval est limitée en raison de sa néphrotoxicité. De plus la distribution des molécules administrées par voie systémique jusqu'aux poches gutturales reste inconnue. L'oxygénation des poches est également décrite comme moyen thérapeutique (227). L'administration topique au site typique d'infection au plafond de la poche gutturale peut être réalisée grâce à une préparation liquide acheminée grâce à un endoscope ou grâce à une poudre déposée par insufflation via un cathéter de Neilson relié à une poire à lavement. Toutefois la régression des lésions mycosiques doit être interprétée avec précaution car **l'amélioration spontanée des lésions** avec le temps est fréquente. De plus, malgré la régression spontanée un **tissu cicatriciel** se met en place avec une **fibrose** de la muqueuse. Enfin les chevaux atteints de saignements abondants doivent recevoir une **perfusion de solutés** intraveineuse voire une **transfusion** sanguine et les chevaux souffrant de **dysphagie** doivent être alimentés par **sonde nasogastrique** ou par une sonde **d'oesophagostomie** et recevoir des anti inflammatoires non stéroïdiens afin de réduire la névrite (213). Dans le cas du **traitement chirurgical**, les plaques de nécroses peuvent être décollées délicatement à l'aide d'un écouvillon et de lavages réalisés au travers d'un abord de Whitehouse modifié qui permet d'accéder au plafond des poches, le plus souvent affecté, et permet également d'accéder aux deux poches gutturales par une seule incision. D'autres types d'abords sont décrits et utilisables. En cas d'épistaxis, l'artère atteinte doit être identifiée par endoscopie avant d'être **occluse chirurgicalement**. Une occlusion du côté cardiaque et une occlusion du côté cérébral permettent de prévenir les hémorragies. S'il y a trop de sang pour pouvoir l'identifier, toutes les artères en contact avec la poche doivent être obstruées. L'occlusion peut être réalisée à titre préventif. Différentes procédures d'occlusion existent et peuvent être utilisées voire combinées. On retiendra la ligature de l'artère carotide commune, l'utilisation d'un cathéter à ballonnet pour occlure l'artère carotide interne ou externe, l'utilisation d'un système de cathéter avec ballonnet détachable ou encore l'embolisation transartérielle. Il semblerait que l'occlusion du vaisseau touché accélérerait la résolution des lésions mycosiques rendant le traitement médical non indispensable, mais cette hypothèse reste controversée (213) (230) (222).

Une étude récente propose la création d'une **fistule entre le pharynx et la poche gutturale** à l'aide d'un laser afin de créer un **environnement ventilé** moins propice au développement de la mycose (231). En effet, physiologiquement la poche et le pharynx communiquent par un orifice qui s'ouvre par un mécanisme actif faisant

intervenir les muscles de la tête. Cette communication reste le plus souvent fermée ce qui favorise un environnement chaud et humide. Les premiers résultats obtenus sont encourageants pour favoriser la régression du champignon mais ne permettent pas de traiter une hémorragie (231).

3.4.3. Pronostic

Environ **50% des chevaux souffrant d'hémorragie décèdent** des suites de cette complication mais ce risque peut être éliminé ou du moins considérablement diminué par **l'occlusion de l'artère atteinte**. La procédure d'occlusion doit être réalisée le plus rapidement possible après le début d'un saignement afin de limiter au maximum les pertes de sang qui fragiliserait l'animal et rendent l'anesthésie et la chirurgie d'autant plus risquée. De plus, bien que les lésions mycosiques régressent, ce processus est lent et les signes neurologiques peuvent persister après la disparition du champignon. En cas de dysphagie, le rétablissement est possible mais très long, de 6 à 18 mois, et parfois incomplet. La paralysie laryngée est quant à elle le plus souvent permanente. Enfin le syndrome de Claude-Bernard Horner et la paralysie faciale disparaissent progressivement le plus souvent (213).

3.4.4. Intérêt d'un modèle tridimensionnel

L'élaboration d'un modèle tridimensionnel des poches gutturales selon les mêmes techniques employées pour le poumon paraît envisageable dans la mesure où ces appendices sont en continuité avec l'appareil respiratoire supérieur des équidés et sont constitués d'un épithélium semblable à celui retrouvé dans les bronches. Comme pour le poumon, les poches gutturales acquises artificiellement pourraient être obtenues après la récupération de ces organes sur des cadavres de chevaux puis décélularisés afin de récupérer la matrice extracellulaire adéquate puis maintenues dans des bioréacteurs etensemencées avec des cellules dérivées des poches gutturales ou des bronches, afin de recréer l'épithélium qui les constitue physiologiquement.

Une étude menée en 2017 (222), avait pour objet l'induction de plaques mycosiques dans les huit poches gutturales de quatre chevaux. Aucun des équidés n'a souffert de séquelles et les lésions ont régressé spontanément mais connaissant les risques hémorragiques et les risques de lésions nerveuses liés cette affection, le développement d'un modèle tridimensionnel de ces appendices pour l'étude de cette maladie permettrait des recherches à plus grande échelle et serait également éthiquement plus correct en limitant l'expérimentation animale.

Par ailleurs, l'intérêt de la création d'un tel modèle pour l'étude de la mycose des poches guttural réside dans le fait que cette affection reste encore occulte et sporadique. Il est donc difficile de regrouper des cas permettant de mettre en place différents

protocoles de traitement et de les comparer. De plus, la conformation et la topographie des poches rendent le traitement d'autant plus complexe. Enfin cette affection reste mortelle dans de très nombreux cas à cause de ses complications hémorragiques et nécessite souvent une intervention chirurgicale sur des animaux déjà affaiblis par des pertes sanguines abondantes. Un modèle tridimensionnel permettrait d'approfondir les connaissances acquises sur la pathogénie, l'évolution et les traitements possibles de cette affection.

Une des difficultés à surmonter serait la création de l'environnement particulier de cet organe, puisque dans le cas particulier de la mycose des poches gutturales, *Aspergillus* spp. semble montrer un tropisme particulier pour les artères qui cheminent le long de la paroi de l'organe. De plus la température, l'humidité et la ventilation qui y règnent ont été décrites comme de potentiels facteurs favorisant le développement de l'agent infectieux, d'où l'importance de parvenir à recréer des conditions identiques. Même si ces dernières affirmations sont parfois controversées et n'ont pas fait l'objet de réelles études pour les confirmer ou les infirmer, la création d'un tel modèle pourrait justement permettre de juger de leur réelle implication dans le développement de cette maladie. Par ailleurs, les études menées jusqu'à présent tendent à montrer que la maladie ne se développe et n'est à l'origine de signes cliniques que chez des animaux immunodéprimés ou débilisés ou encore en cas d'infestation massive par des spores. Ces modèles devraient donc permettre d'étudier les mécanismes immunitaires intervenant dans cette organe afin d'imiter cette fragilité immunitaire caractéristique du développement de la maladie et pouvoir ensuite jouer sur cet aspect de l'affection pour la prévenir et/ou la traiter. Ils pourraient également permettre d'établir un seuil de quantité de spores dans l'air à partir duquel il existe un risque avéré d'infection des poches.

En outre, l'obtention d'un modèle des poches pourrait permettre d'approfondir l'étiologie de cette affection. En effet, *Aspergillus fumigatus* semble être l'agent pathogène le plus représenté mais certaines autres espèces fongiques sont parfois mises en évidence, la création d'un modèle artificiel répétable à grande échelle pourrait révéler les conditions qui favorisent tel ou tel agent infectieux.

Après avoir obtenues toutes ces données, la recherche d'un traitement efficace pourrait être entreprise. Actuellement il est difficile de juger de l'efficacité d'un traitement mis en place dans la mesure où les lésions seraient capables de régresser spontanément et où l'opportunité de l'agent pathogène ne permet pas de regrouper un grand nombre de cas et de mettre en place des traitements rigoureux pour comparer les résultats obtenus. Les cas répertoriés dans la littérature ne donnent que peu d'information sur l'efficacité des traitements médicaux, qui sont le plus souvent associés entre eux ou bien combinés à une intervention chirurgicale, ce qui ne permet pas d'établir quelle partie du traitement s'est finalement révélée effective. Au delà de l'efficacité de la molécule, la distribution de celle-ci jusqu'aux lésions doit être optimisée.

Actuellement les lavages successifs et les administrations topiques ne permettent pas toujours d'assurer un temps de pose adéquate en raison de la conformation spécifique des poches et de la répartition particulière des lésions qui se situent le plus souvent sur leur plafond. De plus, récemment des résistances aux antifongiques ont été décrites mettant en cause l'utilisation massive des azoles dans l'agriculture (229). Il est donc primordial d'accentuer les recherches sur les traitements envisageables afin de les utiliser au mieux et de réduire la progression de la résistance des agents pathogènes.

Enfin, il existe une réelle marge de progression dans la prise en charge de la mycose des poches gutturales. Le peu de données sur l'efficacité des traitements topiques et le fait que le traitement mis en place relève le plus souvent de la gestion des complications qu'elle génère en font une bonne candidate pour la création d'un modèle tridimensionnel.

CONCLUSION

Le poumon est un organe fragile et complexe composé d'une multitude de types cellulaires et dont les atteintes sont souvent responsables de lésions irréversibles qui mettent en jeu l'intégrité de l'organisme. Avec le développement de l'ingénierie tissulaire des modèles de tissu pulmonaire sont apparus. Des cellules de l'épithélium des différents étages du poumon issues de cellules souches ont pu être obtenues sur des supports en deux dimensions puis en trois dimensions. Actuellement, les supports sous forme de matrice extracellulaire de poumons entiers décellularisés sont au cœur de la recherche. L'utilisation d'un tel support permet de maintenir l'architecture et le réseau qui supporte la vascularisation de l'organe. Les protocoles de décellularisation et de recellularisation sont désormais établis. Le défi consiste maintenant à obtenir des modèles de poumons capables d'assurer la ventilation, la perfusion et les échanges gazeux sur le long terme. En médecine humaine l'objectif final serait de parvenir à réaliser une transplantation viable. En ce moment ces techniques sont utilisées pour modéliser des maladies afin de mieux appréhender leur pathogénie et ainsi améliorer leur prise en charge. Ce travail avait alors pour objectif de souligner les perspectives qu'offrirait le développement de tels modèles en médecine vétérinaire au travers de quatre exemples de pathologie de l'appareil respiratoire rencontrée chez les mammifères domestiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. LETOURNEUR D, BORDENAVE L. Ingénierie tissulaire - Une approche multidisciplinaire. *médecine/sciences*. 2017; 33(1):46-51.
2. MACCHIARINI P, JUNGBLUTH P, GO T, ASNAGHI MA, REES LE, COGAN TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008; 372(9655):2023-30.
3. BHOWMICK R, DERAKHSHAN T, LIANG Y, RITCHEY J, LIU L, GAPPA-FAHLENKAMP H. A Three-Dimensional Human Tissue-Engineered Lung Model to Study Influenza A Infection. *Tissue Engineering Part A*. 2018;24 (19-20):1468-80.
4. HERRIGES M, MORRISEY EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*. 2014;141 (3):502-13.
5. GOSS AM, TIAN Y, TSUKIYAMA T, COHEN ED, ZHOU D, LU MM, et al. Wnt2/2b and β -catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Developmental Cell*. 2009; 17(2):290-8.
6. HENDERSON DJ, LONG DA, DEAN CH. Planar cell polarity in organ formation. *Current Opinion In Cell Biology*. 2018; 55:96-103.
7. CHEN J, KRASNOW MA. Integrin Beta 1 Suppresses Multilayering of a Simple Epithelium. *PLoS ONE*. 2012; 7(12).
8. TOMPKINS DH, BESNARD V, LANGE AW, KEISER AR, WERT SE, BRUNO MD, et al. Sox2 Activates Cell Proliferation and Differentiation in the Respiratory Epithelium. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*. 2011; 45(1):101-10.
9. RAWLINS EL, CLARK CP, XUE Y, HOGAN BLM. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development*. 2009; 136(22):3741-5.
10. SHANNON JM. Induction of Alveolar Type II Cell Differentiation in Fetal Tracheal Epithelium by Grafted Distal Lung Mesenchyme. *Developmental Biology*. 1994; 166(2):600-14.
11. MORRISEY EE, IP HS, LU MM, PARMACEK MS. GATA-6: A Zinc Finger Transcription Factor That Is Expressed in Multiple Cell Lineages Derived from Lateral Mesoderm. *Developmental Biology*. 1996; 177(1):309-22.
12. WAN H, DINGLE S, XU Y, BESNARD V, KAESTNER KH, ANG S-L, et al. Compensatory Roles of Foxa1 and Foxa2 during Lung Morphogenesis. *Journal Of Biological Chemistry*. 2005; 280(14):13809-16.
13. ZHOU S, DEGAN S, POTTS EN, FOSTER WM, SUNDAY ME. NPAS3 is a trachealess homolog critical for lung development and homeostasis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2009; 106(28):11691-6.

14. WANG Y, TIAN Y, MORLEY MP, LU MM, DEMAYO FJ, OLSON EN, et al. Development and regeneration of Sox2+ endoderm progenitors is regulated by a HDAC1/2-Bmp4/Rb1 regulatory pathway. *Developmental Cell*. 2013; 24(4):345-58.
15. LONDHE VA, SUNDAR IK, LOPEZ B, MAISONET TM, YU Y, AGHAI ZH, et al. Hyperoxia impairs alveolar formation and induces senescence through decreased histone deacetylase activity and upregulation of p21 in neonatal mouse lung. *Pediatric Research*. 2011; 69(5 Pt 1):371-7.
16. LÜ J, QIAN J, CHEN F, TANG X, LI C, CARDOSO WV. Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 2005; 334(2):319-23.
17. HARRIS KS, ZHANG Z, MCMANUS MT, HARFE BD, SUN X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2006; 103(7):2208-13.
18. BLANPAIN C, FUCHS E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*. 2014; 344(6189):1242281.
19. ROCK JR, GAO X, XUE Y, RANDELL SH, KONG Y-Y, HOGAN BL. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011; 8(6):639-48.
20. ROCK JR, ONAITIS MW, RAWLINS EL, LU Y, CLARK CP, XUE Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 2009; 106(31):12771-5.
21. KUMAR PA, HU Y, YAMAMOTO Y, HOE NB, WEI TS, MU D, et al. Distal Airway Stem Cells Render Alveoli in Vitro and During Lung Regeneration Following H1N1 Influenza Infection. *Cell*. 2011; 147(3):525-38.
22. TATA PR, MOU H, PARDO-SAGANTA A, ZHAO R, PRABHU M, PRABHU M, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 2013; 503(7475):218-23.
23. RAWLINS EL, OKUBO T, XUE Y, BRASS DM, AUTEN RL, HASEGAWA H, et al. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(6):525-34.
24. BARKAUSKAS CE, CRONCE MJ, RACKLEY CR, BOWIE EJ, KEENE DR, STRIPP BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2013; 123(7):3025-36.
25. DESAI TJ, BROWNFIELD DG, KRASNOW MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*. 2014; 507(7491):190-4.
26. NOBLE PW, BARKAUSKAS CE, JIANG D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2012; 122(8):2756-62.

27. HOGAN BLM, BARKAUSKAS CE, CHAPMAN HA, EPSTEIN JA, JAIN R, HSIA CCW, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2014; 15(2):123-38.
28. WIRTZ HR, DOBBS LG. The effects of mechanical forces on lung functions. *Respiration Physiology*. 2000; 119(1):1-17.
29. DANE DM, YILMAZ C, ESTRERA AS, HSIA CCW. Separating in vivo mechanical stimuli for postpneumonectomy compensation: physiological assessment. *Journal Of Applied Physiology*. 2013; 114(1):99-106.
30. KAZA AK, KRON IL, LEUWERKE SM, TRIBBLE CG, LAUBACH VE. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation*. 2002; 106(12 Suppl 1):120-4.
31. KAZA AK, LAUBACH VE, KERN JA, LONG SM, FISER SM, TEPPER JA, et al. Epidermal growth factor augments postpneumonectomy lung growth. *The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery*. 2000; 120(5):916-21.
32. EL AGHA E, HEROLD S, ALAM DA, QUANTIUS J, MACKENZIE B, CARRARO G, et al. Fgf10-positive cells represent a progenitor cell population during lung development and postnatally. *Development*. 2014; 141(2):296-306.
33. VOLCKAERT T, DILL E, CAMPBELL A, TIOZZO C, MAJKA S, BELLUSCI S, et al. Parabronchial smooth muscle constitutes an airway epithelial stem cell niche in the mouse lung after injury. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2011; 121(11):4409-19.
34. BREATNACH E, ABBOTT G, FRASER R. Dimensions of the normal human trachea. *American Journal Of Roentgenology*. 1984; 142(5):903-6.
35. MIECZKOWSKI B, SEAVEY BF. Anatomy, Neck, Trachea. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018
36. SAFSHEKAN F, TAFAZZOLI-SHADPOUR M, ABDOUSS M, SHADMEHR MB. Mechanical Characterization and Constitutive Modeling of Human Trachea: Age and Gender Dependency. *Materials*. 2016; 9(6).
37. KING AS. Trachea and Lungs. In: *The Cardiorespiratory System: Integration of Normal and Pathological Structure and Function*. Oxford: Blackwell Science. 1999. p. 101-18.
38. BALL M, BHIMJI SS. Anatomy, Airway. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
39. WU Y, LUO N, TAN L, FANG B, LI Y, XIE B, et al. Three-Dimensional Reconstruction of Thoracic Structures: Based on Chinese Visible Human. *Computational And Mathematical Methods In Medicine*. 2013; 2013.

40. HYDE DM, HAMID Q, IRVIN CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: Emphasis on the distal airways. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. 2009; 124(6):72-7.
41. BOERS JE, AMBERGEN AW, THUNNISSEN FBJM. Number and Proliferation of Clara Cells in Normal Human Airway Epithelium. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 1999; 159(5):1585-91.
42. REYNOLDS SD, MALKINSON AM. Clara Cell: Progenitor for the Bronchiolar Epithelium. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*. 2010; 42(1):1-4.
43. BEDETTI CD, SINGH J, SINGH G, KATYAL SL, WONG-CHONG ML. Ultrastructural localization of rat Clara cell 10 KD secretory protein by the immunogold technique using polyclonal and monoclonal antibodies. *The Journal Of Histochemistry And Cytochemistry: Official Journal Of The Histochemistry Society*. 1987; 35:789-94.
44. ROKICKI W, ROKICKI M, WOJTACHA J, DŻELJILI A. The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Polish Journal Of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016; 13(1):26-30.
45. FEHRENBACH H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*. 2001; 2(1):33-46.
46. CRAPO JD, BARRY BE, GEHR P, BACHOFEN M, WEIBEL ER. Cell Number and Cell Characteristics of the Normal Human Lung. *American Review Of Respiratory Disease*. 1982; 126(2):332-7.
47. ZHAO L, YEE M, O'REILLY MA. Transdifferentiation of alveolar epithelial type II to type I cells is controlled by opposing TGF- β and BMP signaling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 15 sept 2013;305(6):409-18.
48. Willis BC, Kim K-J, Li X, Liebler J, Crandall ED, Borok Z. Modulation of ion conductance and active transport by TGF- β 1 in alveolar epithelial cell monolayers. *American Journal Of Physiology - Lung Cellular And Molecular Physiology*, 2003; 285(6):1192-200.
49. KING AS. Airways of the Lungs. In: *The Cardiorespiratory System: Integration of Normal and Pathological Structure and Function*. Oxford: Blackwell Science. 1999. p. 119-56.
50. GANESAN S, COMSTOCK AT, SAJJAN US. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers*. 2013; 1(4).
51. KING AS. Defence of the Lung. In: *The Cardiorespiratory System: Integration of Normal and Pathological Structure and Function*. Oxford: Backwell Science. 1999. p. 156-77.
52. ZSCHEPPANG K, BERG J, HEDTRICH S, VERHEYEN L, WAGNER DE, SUTTORP N, et al. Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnology Journal*. 2018; 13(1).

53. PETERSEN TH, CALLE EA, ZHAO L, LEE EJ, GUI L, RAREDON MB, et al. Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation. *Science*. 2010; 329(5991):538-41.
54. GJOREVSKI N, RANGA A, LUTOLF MP. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. *Development*. 2014; 141(9):1794-804.
55. STOLTZ J-F, DE ISLA N, LI YP, BENSOUSSAN D, ZHANG L, HUSELSTEIN C, et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem Cells International*. 2015; 2015.
56. CHOI J, IICH E, LEE J-H. Organogenesis of adult lung in a dish: Differentiation, disease and therapy. *Developmental Biology*. 2016; 420(2):278-86.
57. HEGAB AE, ARAI D, GAO J, KURODA A, YASUDA H, ISHII M, et al. Mimicking the niche of lung epithelial stem cells and characterization of several effectors of their in vitro behavior. *Stem Cell Research*. 2015; 15(1):109-21.
58. CORAUX C, NAWROCKI-RABY B, HINNRSKY J, KILEZTKY C, GAILLARD D, DANI C, et al. Embryonic Stem Cells Generate Airway Epithelial Tissue. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*. 2005; 32(2):87-92.
59. TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006; 126(4):663-76.
60. SCARRITT ME, PASHOS NC, BUNNELL BA. A Review of Cellularization Strategies for Tissue Engineering of Whole Organs. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology* 2015; 3.
61. JENSEN T, ROSZELL B, ZANG F, GIRARD E, MATSON A, THRALL R, et al. A Rapid Lung De-cellularization Protocol Supports Embryonic Stem Cell Differentiation In Vitro and Following Implantation. *Tissue Engineering Part C Methods*. 2012; 18(8):632-46.
62. DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.
63. RICE CM, SCOLDING NJ. Autologous bone marrow stem cells--properties and advantages. *Journal Of Neurological Sciences*. 2008; 265(1-2):59-62.
64. SUEBLINVONG V, LOI R, EISENHAUER PL, BERNSTEIN IM, SURATT BT, SPEES JL, et al. Derivation of Lung Epithelium from Human Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 2008; 177(7):701-11.
65. BERGER MJ, ADAMS SD, TIGGES BM, SPRAGUE SL, WANG X-J, COLLINS DP, et al. Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytotherapy*. 2006; 8(5):480-7.

66. GONG X, SUN Z, CUI D, XU X, ZHU H, WANG L, et al. Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells. *Cell Biology International*. 2014; 38(4):405-11.
67. MARTIN J, HELM K, RUEGG P, VARELLA-GARCIA M, BURNHAM E, MAJKA S. Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential. *Cytotherapy*. 2008; 10(2):140-51.
68. CHISTIakov DA. Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation. *Journal Of Biomedical Science*. 2010; 17(1):92.
69. GHAEDI M, NIKLASON LE, WILLIAMS J. Development of Lung Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Transplantation Reports*. 2015; 2(1):81-9.
70. GHAEDI M, CALLE EA, MENDEZ JJ, GARD AL, BALESTRINI J, BOOTH A, et al. Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2013; 123(11):4950-62.
71. GHAEDI M, MENDEZ JJ, BOVE PF, SIVARAPATNA A, RAREDON MSB, NIKLASON LE. Alveolar epithelial differentiation of human induced pluripotent stem cells in a rotating bioreactor. *Biomaterials*. 2014; 35(2):699-710.
72. HUANG SXL, GREEN MD, DE CARVALHO AT, MUMAU M, CHEN Y-W, D'SOUZA SL, et al. The in vitro generation of lung and airway progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. 2015; 10(3):413-25.
73. HUANG SXL, ISLAM MN, O'NEILL J, HU Z, YANG Y-G, CHEN Y-W, et al. Highly efficient generation of airway and lung epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 2014; 32(1):84-91.
74. SAMADIKUCHAKSARAEI A, COHEN S, ISAAC K, RIPPON HJ, POLAK JM, BIELBY RC, et al. Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Engineering*. 2006; 12(4):867-75.
75. ALI NN, EDGAR AJ, SAMADIKUCHAKSARAEI A, TIMSON CM, ROMANSKA HM, POLAK JM, et al. Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering*. 2002;8(4):541-50.
76. KADZIK RS, MORRISEY EE. Lessons from development for directing lung endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(4):355-61.
77. SURENDRAN H, RAJAMOORTHY M, PAL R. Differentiating Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Into Lung Epithelial Cells. *Current Protocols In Stem Cell Biology* 2019; 49(1).
78. SHAFa M, IONESCU LI, VADIVEL A, COLLINS JJP, XU L, ZHONG S, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived lung progenitor and alveolar epithelial cells attenuate hyperoxia-induced lung injury. *Cytotherapy*. 2018; 20(1):108-25.

79. VAN VRANKEN BE, ROMANSKA HM, POLAK JM, RIPPON HJ, SHANNON JM, BISHOP AE. Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme: a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium. *Tissue Engineering*. 2005; 11(7-8):1177-87.
80. RIPPON HJ, POLAK JM, QIN M, BISHOP AE. Derivation of Distal Lung Epithelial Progenitors from Murine Embryonic Stem Cells Using a Novel Three-Step Differentiation Protocol. *Stem Cells*. 2006; 24(5):1389-98.
81. MOU H, ZHAO R, SHERWOOD R, AHFELDT T, LAPEY A, WAIN J, et al. Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(4):385-97.
82. WANG D, HAVILAND DL, BURNS AR, ZSIGMOND E, WETSEL RA. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings Of the Natlional Academy Of Sciences Of The United States Of America* 2007; 104(11):4449-54.
83. DYE BR, HILL DR, FERGUSON MA, TSAI Y-H, NAGY MS, DYAL R, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife*. 2015; 4.
84. ANVERSA P, PERRELLA MA, KOUREMBANAS S, CHOI AMK, LOSCALZO J. Regenerative Pulmonary Medicine: Potential and Promise, Pitfalls and Challenges. *European Journal Of Clinical Investigation*. 2012; 42(8):900-13.
85. KURTIS KASPER, SINGH M, MIKOS AG. Tissue Engineering Scaffolds. In: *Biomaterials Science*. 3^e Edition. Houston: Academic Press; 2013. p.1138-59
86. JIANG D, SCHAEFER N, CHU HW. Air-Liquid Interface Culture of Human and Mouse Airway Epithelial Cells. *Methods In Molecular Biology*. 2018; 1809:91-109.
87. WHITCUTT MJ, ADLER KB, WU R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal Of The Tissue Culture Association*, 1988; 24(5):420-8.
88. BARKAUSKAS CE, CHUNG M-I, FIORET B, GAO X, KATSURA H, HOGAN BLM. Lung organoids: current uses and future promise. *Development*. 2017;1 44(6):986-97.
89. AUFDERHEIDE M, FÖRSTER C, BESHAY M, BRANSCHIED D, EMURA M. A new computer-controlled air-liquid interface cultivation system for the generation of differentiated cell cultures of the airway epithelium. *Experimental And Toxicologic Pathology*. 2016; 68(1):77-87.
90. BURDICK JA, VUNJAK-NOVAKOVIC G. Engineered Microenvironments for Controlled Stem Cell Differentiation. *Tissue Engineering Part A*. 2009; 15(2):205-19.

91. BURGSTALLER G, OEHRLE B, GERCKENS M, WHITE ES, SCHILLER HB, EICKELBERG O. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *European Respiratory Journal*, 2017; 50(1).
92. LI Q, UYGUN BE, GEERTS S, OZER S, SCALF M, GILPIN SE, et al. Proteomic Analysis of Naturally-Sourced Biological Scaffolds. *Biomaterials*. 2016; 75:37-46.
93. HUGHES CS, POSTOVIT LM, LAJOIE GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. 2010; 10(9):1886-90.
94. HWANG NS, VARGHESE S, ELISSEEFF J. Controlled differentiation of stem cells. *Advanced Drug Delivery Review*. 2008; 60(2):199-214.
95. PHILP D, CHEN SS, FITZGERALD W, ORENSTEIN J, MARGOLIS L, KLEINMAN HK. Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2005; 23(2):288-96.
96. BADYLAK SF, BROWN BN, GILBERT TW. Tissue Engineering with Decellularized Tissues. In: *Biomaterials Science*, 3^e Edition. Houston: Academic Press; 2013. p. 1316-31.
97. BADYLAK SF, TAYLOR D, UYGUN K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual Review Of Biomedical Engineering*. 2011; 13:27-53.
98. HOSOKAWA T, BETSUYAKU T, NISHIMURA M, FURUYAMA A, KATAGIRI K, MOCHITATE K. Differentiation of Tracheal Basal Cells to Ciliated Cells and Tissue Reconstruction on the Synthesized Basement Membrane Substratum In Vitro. *Connective Tissue Research*. 2007; 48(1):9-18.
99. PRICE AP, ENGLAND KA, MATSON AM, BLAZAR BR, PANOSKALTSIS-MORTARI A. Development of a Decellularized Lung Bioreactor System for Bioengineering the Lung: The Matrix Reloaded. *Tissue Engineering Part A*. 2010; 16(8):2581-91.
100. NICHOLS JE, NILES J, RIDDLE M, VARGAS G, SCHILAGARD T, MA L, et al. Production and Assessment of Decellularized Pig and Human Lung Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*. 2013; 19(17-18):2045-62.
101. BAPTISTA PM, ORLANDO G, MIRMALEK-SANI S-H, SIDDIQUI M, ATALA A, SOKER S. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conference Proceedings: Annual International Conference Of The IEEE Engineering In Medicine And Biology Societ* 2009; 2009:6526-9.
102. CRAPO PM, GILBERT TW, BADYLAK SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32(12):3233-43.

103. GILPIN SE, GUYETTE JP, GONZALEZ G, REN X, ASARA JM, MATHISEN DJ, et al. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *The Journal Of Heart And Lung Transplantation: The Official Publication Of The International Society For Heart Transplantation* 2014; 33(3):298-308.
104. BONENFANT NR, SOKOCEVIC D, WAGNER DE, BORG ZD, LATHROP M, Lam YW, et al. The Effects of Storage and Sterilization on De-Cellularized and Re-Cellularized Whole Lung. *Biomaterials*. 2013; 34(13):3231-45.
105. GILBERT TW, SELLARO TL, BADYLAK SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27(19):3675-83.
106. WAGNER DE, BONENFANT NR, SOKOCEVIC D, DESARNO M, BORG Z, PARSONS C, et al. Three-dimensional scaffolds of acellular human and porcine lungs for high throughput studies of lung disease and regeneration. *Biomaterials*. 2014; 35(9):2664-79.
107. PETERSEN TH, CALLE EA, COLEHOUR MB, NIKLASON LE. Matrix Composition and Mechanics of Decellularized Lung Scaffolds. *Cells, Tissues, Organs*. 2012; 195(3):222-31.
108. GUYETTE JP, GILPIN SE, CHAREST JM, TAPIAS LF, REN X, OTT HC. Perfusion decellularization of whole organs. *Nature Protocols*. 2014; 9(6):1451-68.
109. BALESTRINI JL, NIKLASON LE. Extracellular matrix as a driver for lung regeneration. *Annals Of Biomedical Engineering*. 2015; 43(3):568-76.
110. WALLIS JM, BORG ZD, DALY AB, DENG B, BALLIF BA, ALLEN GB, et al. Comparative Assessment of Detergent-Based Protocols for Mouse Lung De-Cellularization and Re-Cellularization. *Tissue Engineering Part C Methods*. 2012; 18(6):420-32.
111. LEVENBERG S, HUANG NF, LAVIK E, ROGERS AB, ITSKOVITZ-ELDOR J, LANGER R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2003; 100(22):12741-6.
112. WAGNER DE, BONVILLAIN RW, JENSEN TJ, GIRARD ED, BUNNELL BA, FINCK CM, et al. Can Stem Cells be Used to Generate New Lungs? Ex Vivo Lung Bioengineering with Decellularized Whole Lung Scaffolds. *Respirology*. 2013; 18(6).
113. BONVILLAIN RW, DANCHUK S, SULLIVAN DE, BETANCOURT AM, SEMON JA, EAGLE ME, et al. A Nonhuman Primate Model of Lung Regeneration: Detergent-Mediated Decellularization and Initial In Vitro Recellularization with Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*. 2012; 18(23-24):2437-52.
114. OTT HC, CLIPPINGER B, CONRAD C, SCHUETZ C, POMERANTSEVA I, IKONOMOU L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature Medicine*. 2010; 16(8):927-33.

115. MURPHY SV. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 2014; 32(8):773-85.
116. MIRONOV V, VISCONTI RP, KASYANOV V, FORGACS G, DRAKE CJ, MARKWALD RR. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*. 2009; 30(12):2164-74.
117. XU T, ZHAO W, ZHU J-M, ALBANNA MZ, YOO JJ, ATALA A. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*. 2013; 34(1):130-9.
118. XU T, KINCAID H, ATALA A, YOO JJ. High-throughput production of single-cell microparticles using an inkjet printing technology. *Journal Of Manufacturing Science And Engineering, Transactions Of The ASME*, 2008; 130(2).
119. GAO G, HUANG Y, SCHILLING AF, HUBBELL K, CUI X. Organ Bioprinting: Are We There Yet? *Advanced Healthcare Materials*. 2018; 7(1).
120. GOLDMANN T, GONZALEZ JS. DNA-printing: utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports. *Journal Of Biochemical And Biophysical Methods*. 2000; 42(3):105-10.
121. XU T, JIN J, GREGORY C, HICKMAN JJ, BOLAND T. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials*. 2005; 26(1):93-9.
122. TASOGLU S, DEMIRCI U. Bioprinting for stem cell research. *Trends In Biotechnology*. 2013; 31(1):10-9.
123. COLINA M, SERRA P, FERNÁNDEZ-PRADAS JM, SEVILLA L, MORENZA JL. DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosensors And Bioelectronic*. 2005; 20(8):1638-42.
124. RINGEISEN BR, KIM H, BARRON JA, KRIZMAN DB, CHRISEY DB, JACKMAN S, et al. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Tissue Engineering*. 2004; 10(3-4):483-91.
125. GUILLEMOT F, SOUQUET A, CATROS S, GUILLOTIN B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine*. 2010; 5(3):507-15.
126. ZOPF DA, HOLLISTER SJ, NELSON ME, OHYE RG, GREEN GE. Bioresorbable Airway Splint Created with a Three-Dimensional Printer. *New England Journal Of Medicine*. 2013; 368(21):2043-5.
127. NICHOLS JE, NILES JA, VEGA SP, ARGUETA LB, EASTAWAY A, CORTIELLA J. Modeling the lung: Design and development of tissue engineered macro- and micro-physiologic lung models for research use. *Experimental Biology And Medicine*. 2014; 239(9):1135-69.

128. MURPHY SV, ATALA A. Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *BioEssays*. 2013; 35(3):163-72.
129. PETERSEN TH, CALLE EA, COLEHOUR MB, NIKLASON LE. Bioreactor for the Long-Term Culture of Lung Tissue. *Cell Transplantation*. 2011; 20(7):1117-26.
130. TANDON N, CIMETTA E, BHUMIRATANA S, GODIER-FURNEMONT A, MAIDHOF R, VUNJAK-NOVAKOVIC G. Bioreactors for Tissue Engineering. In: *Biomaterials Science*. 3^e Edition. Houston: Academic Press; 2013. p. 1178-94.
131. HUH D, MATTHEWS BD, MAMMOTO A, MONTOYA-ZAVALA M, HSIN HY, INGBER DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*. 2010; 328(5986):1662-8.
132. CARON I, CARIOTO L. L'asthme félin... une maladie à vous couper le souffle! *Canadian Veterinary Journal*. 2003; 44(8):654-6.
133. TRZIL JE, REINERO CR. Update on Feline Asthma. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice*. 2014; 44(1):91-105.
134. HILL J. Diseases of the respiratory organs. In: *The Diseases of the cat*. New York, NY: Jenkins WR; 1906. p. 11-21.
135. BAY JD, JOHNSON LR. Feline Bronchial Disease/ Asthma. In: *Textbook of respiratory diseases in dogs and cats*. St Louis: Saunders; 2004. p. 388-99.
136. HERNANDEZ J. Maladies bronchiques félines/ Asthme félin. In: *Maladies respiratoires du chien et du chat*. Rueil-Malmaison: Les Éditions du Point Vétérinaire; 2012. p. 216-23.
137. PADRID P. Feline Asthma: Diagnosis and Treatment. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice*. 2000; 30(6):1279-93.
138. MCCARTHY GM, QUINN PJ. Bronchoalveolar lavage in the cat: cytological findings. *Canadian Journal Of Veterinary Research*. 1989; 53(3):259-63.
139. ADAMAMA-MORAITOU KK, PATSIKAS MN, KOUTINAS AF. Feline lower airway disease: A retrospective study of 22 naturally occurring cases from Greece. *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2004; 6(4):227-33.
140. MOSES BL, SPAULDING GL. Chronic Bronchial Disease of the Cat. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice*. 1985; 15(5):929-48.
141. CORCORAN BM, FOSTER DJ, FUENTES VL. Feline asthma syndrome: A retrospective study of the clinical presentation in 29 cats. *Journal Of Small Animal Practice*. 1995; 36(11):481-8.
142. FOSTER SF, ALLAN GS, MARTIN P, ROBERTSON ID, MALIK R. Twenty-five cases of feline bronchial disease (1995–2000). *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2004; 6(3):181-8.

143. JOHNSON LR, VERNAU W. Bronchoscopic Findings in 48 Cats with Spontaneous Lower Respiratory Tract Disease (2002–2009). *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2011; 25(2):236-43.
144. FOSTER SF, MARTIN P, BRADDOCK JA, MALIK R. A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology (1995–2000). *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2004; 6(3):189-98.
145. VENEMA CM, WILLIAMS KJ, GERSHWIN LJ, REINERO CR, CAREY SA. Histopathologic and morphometric evaluation of the nasal and pulmonary airways of cats with experimentally induced asthma. *International Archives Of Allergy And Immunology*. 2013; 160(4):365-76.
146. BARNOSKI J, LEE-FOWLER TM, BOOTHE DM, BEHREND EN. Serum theophylline after multiple dosing with transdermal gels in cats. *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2019; 21(4):329-34.
147. REINERO CR, BYERLY JR, BERGHAUS RD, BERGHAUS LJ, SCHELEGLE ES, HYDE DM, et al. Rush immunotherapy in an experimental model of feline allergic asthma. *Veterinary Immunology And Immunopathology*. 2006; 110(1):141-53.
148. NAFE LA, LEACH SB. Treatment of feline asthma with ciclosporin in a cat with diabetes mellitus and congestive heart failure. *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2015; 17(12):1073-6.
149. ALLERTON FJW, LEEMANS J, TUAL C, BERNAERTS F, KIRSCHVINK N, CLERCX C. Correlation of bronchoalveolar eosinophilic percentage with airway responsiveness in cats with chronic bronchial disease. *Journal Of Small Animal Practice*. 2013; 54(5):258-64.
150. LEEMANS J, KIRSCHVINK N, CLERCX C, SNAPS F, GUSTIN P. Effect of short-term oral and inhaled corticosteroids on airway inflammation and responsiveness in a feline acute asthma model. *The Veterinary Journal*. 2012; 192(1):41-8.
151. REINERO CR, DECILE KC, BYERLY JR, BERGHAUS RD, WALBY WF, BERGHAUS LJ, et al. Effects of drug treatment on inflammation and hyperreactivity of airways and on immune variables in cats with experimentally induced asthma. *Am J Vet Res*. 1 juill 2005;66(7):1121-7.
152. Schooley EK, McGee Turner JB, Jiji RD, Spinka CM, Reiner CR. Effects of cyproheptadine and cetirizine on eosinophilic airway inflammation in cats with experimentally induced asthma. *American Journal Of Veterinary Research*. 2007; 68(11):1265-71.
153. SZELENYI I. Animal models of bronchial asthma. *Inflammation Research*. 2000; 49(12):639-54.
154. COCAYNE CG, REINERO CR, DECLUE AE. Subclinical airway inflammation despite high-dose oral corticosteroid therapy in cats with lower airway disease. *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2011; 13(8):558-63.

155. LEE-FOWLER TM, GUNTUR V, DODAM J, COHN LA, DECLUE AE, REINERO CR. The Tyrosine Kinase Inhibitor Masitinib Blunts Airway Inflammation and Improves Associated Lung Mechanics in a Feline Model of Chronic Allergic Asthma. *International Archives Of Allergy And Immunology*. 2012; 158(4):369-74.
156. GOODWIN M, SUEBLINVONG V, EISENHAUER P, ZIATS NP, LECLAIR L, POYNTER ME, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Th2-Mediated Allergic Airways Inflammation in Mice. *Stem Cells*. 2011; 29(7):1137-48.
157. OU-YANG H-F, HUANG Y, HU X-B, WU C-G. Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model of asthma by exogenous mesenchymal stem cells. *Experimental Biology And Medicine*. 2011; 236(12):1461-7.
158. HIRT RA, GALLER A, SHIBLY S, BILEK A. Airway hyperresponsiveness to adenosine 5'-monophosphate in feline chronic inflammatory lower airway disease. *The Veterinary Journal*. 2011; 187(1):54-9.
159. REINERO CR, LEE-FOWLER TM, DODAM JR, COHN LA, DECLUE AE, GUNTUR VP. Endotracheal nebulization of N-acetylcysteine increases airway resistance in cats with experimental asthma. *Journal Of Feline Medicine And Surgery*. 2011; 13(2):69-73.
160. LÉGUILLETTE R. Recurrent airway obstruction—heaves. *Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice*. 2003; 19(1):63-86.
161. BOND S, LÉGUILLETTE R, RICHARD EA, COUETIL L, LAVOIE J, MARTIN JG, et al. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2018; 32(6):2088-98.
162. ROBINSON NE, DERKSEN FJ, OLSZEWSKI MA, BUECHNER-MAXWELL VA. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *British Veterinary Journal*. 1996; 152(3):283-306.
163. ROBINSON NE, CHAIRPERSON W. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Veterinary Journal*. 2001; 33(1):5-19.
164. LAVOIE J-P, MAGHNI K, DESNOYERS M, TAHA R, MARTIN JG, HAMID QA. Neutrophilic Airway Inflammation in Horses with Heaves Is Characterized by a Th2-type Cytokine Profile. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 2001; 164(8):1410-3.
165. MORAN G, FOLCH H. Recurrent airway obstruction in horses - an allergic inflammation: a review. *Veterinarni Medicina*. 2011; 56(1):1-13.
166. KAUP F-J, DROMMER W, DAMSCH S, DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Veterinary Journal*. 1990; 22(5):349-55.

167. KAUP F-J, DROMMER W, DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I: alterations of the larger conducting airways. *Equine Veterinary Journal*. 1990; 22(5):343-8.
168. MORAN G, BUECHNER-MAXWELL VA, FOLCH H, HENRIQUEZ C, GALECIO JS, PEREZ B, et al. Increased apoptosis of CD4 and CD8 T lymphocytes in the airways of horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Research Communications*. 2011; 35(7):447.
169. BARTON AK, GEHLEN H. Pulmonary Remodeling in Equine Asthma: What Do We Know about Mediators of Inflammation in the Horse? *Mediators Of Inflammation*. 2016; 2016(2016)
170. FRANCHINI M, GILL U, FELLEBERG R VON, BRACHER VD. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *American Journal Of Veterinary Research*. 2000; 61(11):1369-74.
171. TESSIER L, CÔTÉ O, CLARK ME, VIEL L, DIAZ-MÉNDEZ A, ANDERS S, et al. Impaired response of the bronchial epithelium to inflammation characterizes severe equine asthma. *BMC Genomics*. 2017; 18(1):708.
172. MONTGOMERY JB, HUSULAK ML, KOSOLOFSKI H, DOS SANTOS S, BURGESS H, MEACHEM MD. Tumor necrosis factor-alpha protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with severe equine asthma. *Veterinary Immunology And Immunopathology*. 2018; 202:70-3.
173. RAULO SM, SORSA TA, MAISI PS. Concentrations of elastolytic metalloproteinases in respiratory tract secretions of healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal Of Veterinary Research*. 2000; 61(9):1067-73.
174. SANDERSEN C, BUREAU F, TURLEJ R, FIÉVEZ L, DOGNÉ S, KIRSCHVINK N, et al. p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves. *Veterinary Immunology And Immunopathology*. 2001; 80(3):315-26.
175. COUËTIL LL, ART T, DE MOFFARTS B, BECKER M, MÉLOTTE D, JASPAR F, et al. DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology And Immunopathology*. 2006; 113(1):11-20.
176. HERSZBERG B, RAMOS-BARBÓN D, TAMAOKA M, MARTIN JG, LAVOIE J-P. HEAVES, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. 2006; 118(2):382-8.
177. JEFCOAT AM, HOTCHKISS JA, GERBER V, HARKEMA JR, BASBAUM CB, ROBINSON NE. Persistent mucin glycoprotein alterations in equine recurrent airway obstruction. *American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology*. 2001; 281(3):704-12.

178. BULLONE M, JOUBERT P, GAGNÉ A, LAVOIE J-P, HÉLIE P. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Veterinary Journal*. 2018; 50(5):609-15.
179. BARTON AK, SCHULZE T, DOHERR MG, GEHLEN H. Influence of bronchoalveolar lavage on thoracic radiography in the horse. *Journal Of Veterinary Science*. 2018; 19(4):563-9.
180. LAVOIE-LAMOUREUX A, LECLERE M, LEMOS K, WAGNER B, LAVOIE J-P. Markers of Systemic Inflammation in Horses with Heaves. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2012; 26(6):1419-26.
181. BULLONE M, MURCIA RY, LAVOIE JP. Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Veterinary Journal*. 2016; 48(5).
182. MISKOVIC M, COUËTIL LL, THOMPSON CA. Lung Function and Airway Cytologic Profiles in Horses with Recurrent Airway Obstruction Maintained in Low-Dust Environments. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2007; 21(5):1060-6.
183. LAVOIE JP, LECLERE M, RODRIGUES N, LEMOS KR, BOURZAC C, LEFEBVRE-LAVOIE J, et al. Efficacy of inhaled budesonide for the treatment of severe equine asthma. *Equine Veterinary Journal*. 2019; 51(3):401-7.
184. CALZETTA L, CRUPI R, RONCADA P, PISTOCCHINI E, CAVE D di, ROSSI I, et al. Clinical efficacy of bronchodilators in equine asthma: Looking for minimal important difference. *Equine Veterinary Journal*. 2019; (in press).
185. CALZETTA L, ROGLIANI P, PAGE C, RONCADA P, PISTOCCHINI E, SOGGIU A, et al. Clinical effect of corticosteroids in asthma-affected horses: A quantitative synthesis. *Equine Veterinary Journal*. 2018; 50(5):594-601.
186. JOCELYN NA. In an Adult Horse With Severe Asthma (Previously Recurrent Airway Obstruction) Does Using Inhaled Corticosteroids Result in an Equal Improvement in Clinical Signs When Compared to Systemic Corticosteroids? *Veterinary Evidence*. 2018; 3(2).
187. AVIZA GA, AINSWORTH DM, EICKER SW, SANTIAGO MA, DIVERS TJ, PERKINS GA. Outcome of horses diagnosed with and treated for heaves (recurrent airway obstruction). *Equine Veterinary Education*. 2001; 13(5):243-6.
188. DA PALMA RK, FRATINI P, SCHIAVO MATIAS GS, CERETA AD, GUIMARÃES LL, ANUNCIAÇÃO AR de A, et al. Equine lung decellularization: a potential approach for in vitro modeling the role of the extracellular matrix in asthma. *Journal Of Tissue Engineering*. 2018; 9.
189. PIRIE RS, COUËTIL LL, ROBINSON NE, LAVOIE J-P. Equine asthma: An appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine Veterinary Journal*. 2016; 48(4):403-5.

190. COUËTIL LL, ART T, DE MOFFARTS B, BECKER M, MÉLOTTE D, JASPAR F, et al. Effect of Beclomethasone Dipropionate and Dexamethasone Isonicotinate on Lung Function, Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology, and Transcription Factor Expression in Airways of Horses with Recurrent Airway Obstruction. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2006; 20(2):399-406.
191. KLIER J, GEIS S, STEUER J, GEH K, REESE S, FUCHS S, et al. A comparison of nanoparticulate CpG immunotherapy with and without allergens in spontaneously equine asthma-affected horses, an animal model. *Immunity, Inflammation And Disease*. 2017; 6(1):81-96.
192. KLIER J, BARTL C, GEUDER S, GEH KJ, REESE S, GOEHRING LS, et al. Immunomodulatory asthma therapy in the equine animal model: A dose-response study and evaluation of a long-term effect. *Immunity, Inflammation And Disease*. 2019; 7(3):130-49.
193. HUSULAK ML, MANNING ST, MEACHEM MD, BURGESS HJ, EPP TY, MONTGOMERY JB. Does antimicrobial therapy improve outcomes in horses with severe equine asthma and a positive tracheal wash bacterial culture? *Canadian Journal Of Veterinary Research*. 2018; 82(3):184-91.
194. MONTGOMERY JB. Beyond steroids and bronchodilators - investigating additional therapies for horses with severe equine asthma. *The Veterinary Record*. 2019; 185(5):140-2.
195. MAINGUY-SEERS S, VARGAS A, LABRECQUE O, BÉDARD C, HÉLIE P, LAVOIE J-P. Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses. *The Veterinary Record*. 2019; 185(5):143.
196. CORCORAN BM, COBB M, MARTIN MW, DUKES-MCEWAN J, FRENCH A, FUENTES VL, et al. Chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *The Veterinary Record*. 1999;144 (22):611-6.
197. HEIKKILÄ HP, LAPPALAINEN AK, DAY MJ, CLERCX C, RAJAMÄKI MM. Clinical, Bronchoscopic, Histopathologic, Diagnostic Imaging, and Arterial Oxygenation Findings in West Highland White Terriers with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2011; 25(3):433-9.
198. HEIKKILÄ-LAURILA HP, RAJAMÄKI MM. Idiopathic Pulmonary Fibrosis in West Highland White Terriers. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice*. 2014; 44(1):129-42.
199. CLERCX C, FASTRÈS A, ROELS E. Idiopathic pulmonary fibrosis in West Highland white terriers: An update. *Veterinary Journal*. 2018;242 ,:53-8.
200. KRAFFT E, LYBAERT P, ROELS E, LAURILA HP, RAJAMÄKI MM, FARNIR F, et al. Transforming Growth Factor Beta 1 Activation, Storage, and Signaling Pathways in Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Dogs. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2014; 28(6):1666-75.

201. LILJA-MAULA L, SYRJÄ P, LAURILA HP, SUTINEN E, PALVIAINEN M, RITVOS O, et al. Upregulation of Alveolar Levels of Activin B, but not Activin A, in Lungs of West Highland White Terriers with Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Diffuse Alveolar Damage. *Journal Of Comparative Pathology*. 2015; 152(2):192-200.
202. PETITPIERRE N, BEIGELMAN C, LETOVANEC I, NICOD LP, LAZOR R. Fibrose pulmonaire idiopathique: nouveautés diagnostiques et thérapeutiques. *Revue Médicale Suisse*. 2014; 10:2208-13.
203. ERIKSSON M, EULER HV, EKMAN E, NORDLING K, HÄGGSTRÖM J, JOHANSSON J. Surfactant Protein C in Canine Pulmonary Fibrosis. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2009; 23(6):1170-4.
204. ROELS E, DOURCY M, HOLOPAINEN S, RAJAMÄKI MM, GILLET L, EHLERS B, et al. No Evidence of Herpesvirus Infection in West Highland White Terriers With Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Veterinary Pathology*. 2016; 53(6):1210-2.
205. THIERRY F, HANDEL I, HAMMOND G, KING LG, CORCORAN BM, SCHWARZ T. Further characterization of computed tomographic and clinical features for staging and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in West Highland white terriers. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2017; 58(4):381-8.
206. CORCORAN BM, KING LG, SCHWARZ T, HAMMOND G, SULLIVAN M. Further characterisation of the clinical features of chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *Veterinary Record*. 2011; 168(13):355-355.
207. NORRIS AJ, NAYDAN DK, WILSON DW. Interstitial Lung Disease in West Highland White Terriers. *Veterinary Pathology*. 2005; 42(1):35-41.
208. SYRJÄ P, HEIKKILÄ HP, LILJA-MAULA L, KRAFFT E, CLERCX C, DAY MJ, et al. The Histopathology of Idiopathic Pulmonary Fibrosis in West Highland White Terriers Shares Features of Both Non-specific Interstitial Pneumonia and Usual Interstitial Pneumonia in Man. *Journal Of Comparative Pathology*. 2013; 149(2):303-13.
209. KRAFFT E, LAURILA HP, PETERS IR, BUREAU F, PEETERS D, DAY MJ, et al. Analysis of gene expression in canine idiopathic pulmonary fibrosis. *Veterinary Journal*. 2013; 198(2):479-86.
210. KRAFFT E, HEIKKILÄ HP, JESPER S, PEETERS D, DAY MJ, RAJAMÄKI MM, et al. Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Endothelin-1 Concentrations as Diagnostic Biomarkers of Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 2011; 25(5):990-6.
211. DYCE KM, SACK WO, WENSING CJG. The guttural pouch. In: *Textbook of veterinary anatomy*. 4^e Edition. St-Louis: Elsevier; 2010. p. 522-5.
212. BUDRAS K-D, SACK WO, RÖCK S. Pharynx, Guttural Pouch and Larynx. In: *Anatomy of the horse*. 5^e Edition. Hannovre: Schlütersche; 2009. p. 46.
213. FREEMAN DE, HARDY J. Guttural Pouch. In: *Equine Surgery*. 4^e Edition. Saint Louis: W.B. Saunders; 2012. p. 623-42.

214. DIETER DELLMANN H, EURELL J. Ear. In: *Textbook of veterinary histology*. 5^e Edition. Paris: Williams & Wilkins; 1998. p. 346.
215. COLLIN B. Organe vestibulo-cochléaire. In: *Anatomie du cheval*. 2^e Edition. Liège: Derouaux Ordina; 2010.
216. DOBESOVA O, BEZDEKOVA B. Cytological and bacteriological evaluation of transendoscopic guttural pouch lavages in clinically healthy horses. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2016; 64(2):179-88.
217. CHIESA OA, VIDAL D, DOMINGO M, CUENCA R. Cytological and bacteriological findings in guttural pouch lavages of clinically normal horses. *Veterinary Record*. 1999; 144(13):346-9.
218. BAPTISTE KE. A preliminary study on the role of the equine guttural pouches in selective brain cooling. *Veterinary Journal*. 1998; 155(2):139-48.
219. BAPTISTE KE, NAYLOR JM, BAILEY J, BARBER EM, POST K, THORNHILL J. A function for guttural pouches in the horse. *Nature*. 2000; 403(6768):382-3.
220. SELTON DC, KOHN C. Aspergillosis. In: *Equine infectious diseases*. 2^e Edition. St-Louis: Elsevier; 2014. p. 421-32.
221. LUDWIG A, GATINEAU S, REYNAUD M-C, CADORÉ J-L, BOURDOISEAU G. Fungal isolation and identification in 21 cases of guttural pouch mycosis in horses (1998–2002). *Veterinary Journal*. 2005; 169(3):457-61.
222. GREPPI MC, GUILLOT J, MELLOUL E, BOURDOISEAU G, LEPAGE O, CADORÉ J-L. Experimental induction of mycotic plaques in the guttural pouches of horses. *Medical Mycology*. 2017; 55(3):308-13.
223. ZACHARY JF. Respiratory System, Mediastinum, and Pleurae. In: *Pathologic basis of veterinary disease*. 6^e Edition. St-Louis: Elsevier; 2017. p. 500-1.
224. FREEMAN DE. Update on Disorders and Treatment of the Guttural Pouch. *Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice*. 2015; 31(1):63-89.
225. COLEMAN MC, HARDY J. Suspected retropharyngeal haemorrhage as a complication of guttural pouch mycosis. *Equine Veterinary Education*. 2019; 31(2):71-4.
226. EDWARDS GB, GREET T. Disorders of the Guttural Pouches (Auditory Tube Diverticuli). In: *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. 1^{re} Edition. Edinburgh: Saunders Elsevier; 2007. p. 419-36.
227. DOBESOVA O, SCHWARZ B, VELDE K, JAHN P, ZERT Z, BEZDEKOVA B. Guttural pouch mycosis in horses: a retrospective study of 28 cases. *Veterinary Record*. 2012; 171(22):561.

228. CADORÉ J-L, TORTEREAU A, BELLUCO S, SEGARD É, LEROUX C. Guttural pouch mycosis in horses: An intriguing and mysterious disease. *Equine Veterinary Education*. 2019; 31(2):75-9.
229. ELAD D, SEGAL E. Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis. *Frontiers In Microbiology*. 2018; 9.
230. HARDY J, LÉVEILLÉ R. Diseases of the guttural pouches. *Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice*. 2003; 19(1):123-58.
231. WATKINS AR, PARENTE EJ. Salpingopharyngeal fistula as a treatment for guttural pouch mycosis in seven horses. *Equine Veterinary Journal*. 2018; 50(6):781-6.

CHAZOUILLÈRES Sibylle

**MODÈLES CELLULAIRES EN PATHOLOGIE RESPIRATOIRE
COMPARÉE**

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 17 décembre 2019

RESUME :

Le développement de l'ingénierie tissulaire a permis de passer de simples cultures cellulaires en deux dimensions à des cultures tridimensionnelles qui permettent de recréer l'organisation architecturale d'organes entiers. Le poumon fait partie des organes pour lesquels ces modèles sont en plein essor.

Dans ce travail sont présentées les étapes d'élaboration de modèle de poumon *in vitro*. Puis quatre exemples de maladie de l'appareil respiratoire de mammifères domestiques sont exposés (la bronchite asthmatique du chat, l'inflammation chronique des petites voies respiratoires chez le cheval, la fibrose pulmonaire idiopathique du West Highland white terrier et la mycose des poches gutturales chez le cheval) afin de souligner l'intérêt du développement de modèles tridimensionnels de ces maladies pour améliorer leur prise en charge.

MOTS CLES :

- Poumon
- Pathologie comparée
- Cellules
- Appareil respiratoire -- Maladies

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Jean-François MORNEX
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur Jean-Luc CADORÉ
2ème Assesseur :	Madame le Docteur Sara BELLUCO
Membre invité :	Madame le Docteur Caroline LEROUX

DATE DE SOUTENANCE : 17 décembre 2019