

RAPPORT FINAL
PROGRAMME PRIMEQUAL 2

TITRE DU PROJET

Rôle des interactions particules diesel-fumée de cigarette dans la physiopathologie des remodelages bronchique et alvéolaire de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

RESPONSABLE

Professeur Michel Aubier

1. INTRODUCTION

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie pulmonaire invalidante, caractérisée par un remodelage bronchique et alvéolaire. La fumée de cigarette est le principal facteur de risque pour développer une BPCO. Des études épidémiologiques suggèrent que la pollution atmosphérique pourrait aggraver l'évolution de cette maladie. Cependant, les mécanismes à l'origine de cet effet ne sont pas connus actuellement.

L'objectif de ce projet de recherche est d'investiguer le rôle de la pollution particulaire dans la physiopathologie de la BPCO, en regardant son effet propre et associé à la fumée de cigarette sur le remodelage pulmonaire caractéristique de cette maladie. La place du stress oxydant en tant que mécanisme responsable des effets de la pollution particulaire sera également évaluée.

Le remodelage alvéolaire a été évalué à travers l'analyse de la balance protéases/antiprotéases (métalloprotéases de la matrice, leurs inhibiteurs et α 1-antitrypsine) dans les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires et le remodelage bronchique à travers l'étude de la prolifération du muscle lisse bronchique. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées.

2. ETUDES IN VITRO

Ce rapport comporte le résultat d'expériences réalisées sur la lignée A549, lignée représentative des pneumocytes de type II humains, sur des macrophages murins et sur des cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire. Par ailleurs, l'effet de la fumée de cigarette a été comparé à celui de particules diesel, car ces particules représentent des composants majeurs de la pollution atmosphérique urbaine.

2.a. Matériel et Méthodes

Les cellules ont été exposées pendant des durées variables, de 3 à 24 heures, à des concentrations croissantes de condensat de fumée de cigarette (10 à 100 $\mu\text{g/ml}$), avec et sans exposition concomitante à une concentration fixe de particules diesel (20 $\mu\text{g/cm}^2$). Cette concentration est représentative de la concentration de particules de la pollution atmosphérique trouvée dans l'atmosphère des grands villes de pays développés.

- La viabilité cellulaire a été évaluée par l'activité lactate-déshydrogénase (LDH) du milieu de culture.
- L'expression des HO (HO-1, isoforme inductible en réponse à différents stimuli générateurs de stress oxydant, et HO-2, isoforme d'expression constitutive) a été appréciée au niveau de l'ARNm par RT-PCR, et de la protéine par immunoempreinte.
- Le stress oxydant a été mesuré par la détection de résidus 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), marqueur spécifique de la peroxydation lipidique. Ceci a été effectué par immunohistochimie.
- L'expression des différents acteurs de la balance protéases/anti-protéases a été évaluée par RT-PCR.
- La prolifération de cellules musculaires lisses a été quantifiée par l'incorporation de thymidine tritiée.

2.b. Résultats

I. Cellules A549

Viabilité cellulaire. L'exposition des cellules à 100 $\mu\text{g/ml}$ de condensat de fumée de cigarette pendant 24 heures entraîne une augmentation de l'activité LDH, témoin d'un certain degré de toxicité cellulaire (Figure 1). Des concentrations plus faibles de condensat et des concentrations de particules diesel de l'ordre de 20 $\mu\text{g/cm}^2$ n'entraînent pas d'effet significatif sur l'activité LDH (Figure 1). L'essentiel des expériences sur le contrôle de la balance protéases/antiprotéases a été effectué en utilisant les concentrations non-cytotoxiques de condensat de fumée de cigarette et des particules diesel, c'est à dire 10 $\mu\text{g/l}$ et 20 $\mu\text{g/cm}^2$ respectivement.

Expression de métalloprotéases de la matrice (MMPs). Nous avons axé notre étude sur l'expression de la MMP-1, car cette protéase a été récemment impliquée dans la physiopathologie de l'emphysème post-tabagique (1,2). L'utilisation de la RT-PCR semi-

quantitative nous a permis d'observer une induction dose-dépendante de l'expression de l'ARNm de la MMP-1 par le condensat de la fumée de cigarette et les particules diesel (Figure 2a). Cet effet a été confirmé par RT-PCR quantitative (Figure 2b). L'augmentation d'expression est détectée dès 6 heures d'incubation avec les particules et elle est également observée après 24 heures. En contraste avec ces résultats, aucun effet des particules diesel ni de la fumée de cigarette n'est observé ni sur la MMP-2, ni sur les inhibiteurs endogènes des MMP, les TIMPs, ni sur la cytokine pro-fibrosante, TGF- β (Figure 3).

Afin d'évaluer les mécanismes impliqués dans l'induction de la MMP-1 par les particules diesel nous avons incubé les cellules avec un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC). Les résultats de ces expériences montrent que la NAC prévient l'augmentation de l'expression de la MMP-1 induite par les particules diesel, ce qui souligne le rôle des oxydants dans l'induction de cette protéase (Figure 4). Ce résultat est conforté par l'apparition d'un marquage positif pour le 4-HNE, un marqueur de stress oxydant, dans les cellules exprimant la MMP-1 (Figure 4, cellules en rouge).

La NADPH oxydase est une source importante d'oxydants dans les cellules épithéliales, et il a été récemment démontré que les particules diesel peuvent activer cette enzyme (3). Nous avons incubé les cellules A549 avec un inhibiteur de la NADPH oxydase, le diphenylene iodinium (DPI) afin d'évaluer le rôle de la NADPH oxydase dans l'induction de la MMP-1. Ces expériences montrent que le DPI inhibe l'induction de la MMP-1 par le condensat de fumée de cigarette et les particules diesel, ce qui suggère un rôle des oxydants synthétisés par la NADPH oxydase dans cette induction (Figure 5). Plusieurs isoformes de la NADPH oxydase, appelées NOX, ont été mises en évidence récemment (4) (5). Nos résultats montrent l'expression de la NOX4 dans les cellules A549, et son induction par la fumée de cigarette et les particules diesel (Figure 5). Ceci suggère que cette protéine pourrait être impliquée dans l'induction de l'expression de la MMP-1.

Ayant montré que les oxydants endogènes jouent un rôle dans l'induction de la MMP-1 par les particules diesel, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation impliquées dans ce phénomène. Nous avons commencé par regarder le rôle des «Mitogen activated protein kinases» (MAPK), protéine impliquée dans les réponses adaptatives cellulaires aux agressions exogènes. Nous avons évalué le rôle de 2 voies de MAPK, la voie des «Extracellular regulated kinases» (ERK) et celle de la MAPK de 38 kD de poids moléculaire, appelée p38. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces 2 voies montre une diminution significative de l'effet des particules diesel avec l'inhibiteur d'ERK, mais pas avec celui de

p38 (Figure 6). Ceci suggère que la voie NOX4-ERK serait impliquée dans l'induction de l'expression de la MMP-1 par les particules diesel.

Nous sommes en train d'effectuer des expériences de western blot afin de confirmer ces résultats et d'examiner le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans l'activation de la NOX4 oxydase par la fumée de cigarette et les particules diesel.

Expression de l'alpha-1 antitrypsine (AAT). Une démarche similaire à celle utilisée avec la MMP-1 a été entreprise afin d'évaluer l'effet de la fumée de cigarette et des particules diesel sur l'expression de l'α-1 antitrypsine (AAT), principale antiprotéase impliquée dans la neutralisation de l'élastase du neutrophile et dont le déficit est un facteur de risque pour développer une BPCO (6). Des expériences de RT-PCR semi-quantitative effectuées sur la lignée A549 ont montré une diminution de l'expression de cette antiprotéase lors de l'incubation avec les particules diesel, mais non avec la fumée de cigarette. Ces résultats ont été confirmés et approfondis par des expériences de RT-PCR quantitative, qui ont montré une diminution profonde et soutenue de l'expression de l'ARNm de l'AAT après 6 et 24 heures d'incubation avec les particules diesel (Figure 7). Cette diminution est supprimée par la NAC, ce qui suggère un rôle des oxydants (Figure 8). Des études sont en cours pour mieux caractériser ce phénomène.

Effet de l'HO-1. Nous avons commencé par évaluer l'expression de l'HO-1 dans les cellules exposées à la fumée de cigarette et aux particules diesel. Il existe une induction de l'HO-1 dépendante de la dose de fumée de cigarette, avec un effet maximal à 100 µg/ml, que ce soit en termes d'ARNm ou de protéine (Figures 9 et 10). L'exposition des cellules aux particules diesel, à la concentration de 20 µg/cm² induit également l'expression de l'HO-1 (Figure 9). Il existe d'autre part un effet synergique entre la fumée de cigarette et les particules diesel. L'expression de l'ARNm de l'HO-2, isoforme constitutive de l'hème oxygénase, n'est pas modifiée par une exposition à différentes doses de fumée de cigarette (résultats non-montrés).

Après avoir montré l'induction de l'HO-1 par la fumée de cigarette et les particules diesel nous avons évalué si la surexpression de cette protéine prévient l'induction de la MMP-1. Pour cela, nous avons incubé les cellules A549 avec un inducteur de la HO-1, la cobalt-protoporphyrine-IX (CoPP) (7).

Cette molécule entraîne bien l'induction de l'expression de l'HO-1 dès 3 heures d'incubation, ainsi qu'une diminution de l'activité LDH du surnageant en réponse à la fumée de cigarette (résultats non montrés), mais, de façon surprenante, elle induit aussi *per se* une augmentation

importante de l'ARNm de la MMP-1 (Figure 10). Ceci pourrait être dû à sa structure protoporphyrrique car il a été décrit dans la littérature que l'uroporphyrine, qui possède une structure analogue au CoPP, potentialise l'induction de la MMP-1 dans des fibroblastes de peau en réponse à une irradiation UV (8). Afin de nous affranchir des effets du CoPP sur la MMP-1, nous avons utilisé un autre inducteur de l'HO-1, le curcumin, épice qui a été démontrée comme induisant l'HO-1 dans des cellules endothéliales (9).

Nous avons d'abord effectué une étude d'effet dose et effet-temps du curcumin sur l'expression de la protéine HO-1. Les résultats de ces expériences montrent une induction de l'HO-1 dès 6 heures d'incubation avec le curcumin, avec un plateau jusqu'à 18 heures et une diminution ultérieure. L'effet maximal est observé pour une concentration de $15\mu\text{M}$ (Figure 11). Nous avons donc utilisé 18 heures d'incubation à $15\mu\text{M}$ pour traiter les cellules avant une incubation pendant 24 heures avec la fumée de cigarette plus ou moins les particules diesel.

Les résultats de ces expériences montrent que le curcumin atténue l'augmentation de l'activité LDH et de l'expression de la MMP-1 par la fumée de cigarette (Figures 12 et 13). Ceci pourrait jouer en faveur d'un rôle protecteur de l'hème oxygénase face aux altérations de la balance protéases/antiprotéases entraînées par la combinaison fumée de cigarette/particules diesel.

Le(s) mécanisme(s) impliqués dans ce phénomène ainsi que l'effet du curcumin sur l'expression de l' α -1 antitrypsin sont en cours d'évaluation.

II. Macrophages murins

Effet de la co-exposition fumée de cigarette-particules diesel

Dans les cas des macrophages murins, nous avons représenté les résultats obtenus avec les particules de noir de carbone, car elles ont parfois des effets propres.

L'exposition des cellules à la fumée de cigarette de même qu'aux particules diesel n'entraîne pas d'augmentation significative de l'activité LDH du surnageant de culture (Figure 14). Les particules de noir de carbone n'ont aucun effet. Cette absence d'effet cytotoxique de la fumée de cigarette et des particules de la pollution est visible aussi par évaluation de la viabilité cellulaire après exposition aux différents composés (Figure 15). En effet, la fumée de cigarette, de même que les particules diesel et de noir de carbone n'entraînent pas des

modifications statistiquement significatives de la viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles après 3 et 24 heures d'exposition.

Ni condensât de fumée de cigarette, utilisé à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$, ni les particules diesel (20 $\mu\text{g/cm}^2$) n'induisent une expression de l'HO-1, en termes d'ARNm (Figure 16). Il existe une induction statistiquement significative de l'HO-1 avec la combinaison de la fumée et les particules diesel, ce qui traduit un effet synergique entre ces 2 composés.

L'exposition des cellules au condensât de fumée de cigarette n'entraîne pas d'augmentation significative de la peroxydation lipidique, évaluée à travers la détection du 4-HNE par technique d'immunohistochimie (les cellules positives apparaissent marquées en rouge). Les particules diesel en revanche induisent une augmentation claire du marquage par l'anticorps anti 4-HNE, et cet effet est potentialisé par la co-exposition à la fumée de cigarette (Figure 17).

En ce qui concerne la balance protéases/antiprotéases, on n'observe pas d'effet statistiquement significatif du condensât de fumée de cigarette et/ou des particules diesel sur l'expression de l'ARNm de la MMP-9 (activité gélatinolytique, Figure 18). Il existe une tendance à l'augmentation, mais elle n'atteint pas le seuil de significativité. En revanche, il existe une augmentation statistiquement significative de l'expression de la MMP-12 (activité élastolytique) avec les particules diesel, qui est potentialisée par la co-exposition avec le condensat de fumée de cigarette. (Figure 18). On n'observe pas de modification de l'expression des TIMPs (Figure 19). Les premiers résultats d'évaluation d'activité gélatinolytique du surnageant de culture par zymographie montre que la fumée de cigarette entraîne une augmentation de l'activité gélatinolytique attribuable à la MMP-9 après 24 heures d'exposition (résultats non-montrés).

Effet de l'hème oxygénase

Nous avons d'abord vérifié, comme pour les cellules A549, l'inductibilité de l'HO-1 par le curcumin sur les macrophages murins. Les résultats de ces expériences montrent une induction de l'expression protéique de l'HO-1 dès 6 heures d'incubation avec le curcumin, avec un plateau jusqu'au 24 heures. L'effet maximal est observé pour une concentration de 25 μM (Figure 20). Nous avons donc utilisé 24 heures d'incubation à 25 μM pour prétraiter les cellules avant une incubation pendant 3 heures avec la fumée de cigarette plus ou moins les particules diesel.

Comme pour les cellules épithéliales, ce prétraitement a un effet protecteur vis-à-vis de la cytotoxicité induite par les particules de la pollution atmosphérique en termes d'activité LDH dans le surnageant de culture et de mortalité cellulaire, tout en sachant que l'augmentation de la LDH est moins importante dans les macrophages que dans les cellules épithéliales (Figure 21).

De façon paradoxale, l'expression de l'ARN messager de la MMP-12, évaluée par RT-PCR, est augmentée de façon consécutive au prétraitement des macrophages par le curcumin (Figure 22). À l'opposé, dans ces expériences on observe une augmentation de l'expression de la MMP-12 par le condensât de fumée de cigarette, que n'est plus présent lors que les cellules sont pré-traitées par le curcumin. Ces résultats correspondent à 2 et non 3 ou 4 expériences, comme pour les autres données et vont être vérifiés.

III. Cellules musculaires lisses

Des résultats similaires à ceux obtenus sur les cellules A549 ont été observés en ce qui concerne la viabilité cellulaire et l'expression de l'HO-1 (résultats non-montrés).

L'incubation des cellules musculaires avec le condensat de fumée de cigarette diminue la prolifération musculaire induite après stimulation par un mitogène (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) (Figure 23). Ce dernier effet n'est pas réversé par l'incubation avec un antioxydant (la N-acetylcystéine, NAC) (Figure 24). L'incubation avec les particules diesel ne modifie pas significativement la prolifération musculaire. Cet effet anti proliféraitif de la fumée de cigarette est inattendu et il est contraire à notre hypothèse initiale. Des études sont en cours pour mieux le caractériser.

3.ETUDES IN VIVO

Nous avons commencé par la mise au point du modèle de BPCO chez la souris exposée à la fumée de cigarette afin d'examiner l'interaction fumée-diesel et le rôle de l'HO.

Nous avons évalué 2 souches de souris □ Balb/C et C57/B16 car elles sont fréquemment utilisées en physiopathologie pulmonaire. Des modèles de BPCO ont été décrits dans les 2 souches, bien que majoritairement chez les souris C57/B16.

Les résultats de nos expériences montrent que les souris Balb/C ont une réponse inflammatoire moindre que celle de souris C57/B16, évaluée à travers la cellularité totale du LBA et la balance MMPs/TIMPs pulmonaire. En effet, nous avons dû enfumer les souris Balb/C 1 mois pour obtenir des modifications équivalentes à celles observées chez les souris

C57/Bl6 au bout de 5 jours d'enfumage. La figure 25 montre la cellularité totale du LBA dans les 2 souches de souris. La figure 26 montre le profil d'expression de l'ARNm de l'HO-1 et des différentes protéases et antiprotéases au bout d'un mois d'exposition des souris Balb/C. Des résultats similaires ont été observés au bout d'une semaine chez les souris C57/Bl6 (résultats non montrés). Ces données montrent une induction de l'HO-1, témoignant d'un certain degré de stress oxydant, et une induction des MMP-9, -12 et -14, ce qui permet en quelque sorte de valider le modèle, car un profil similaire a été rapporté dans la littérature et chez des patients emphysémateux.

Des études sont en cours pour évaluer l'effet de la modulation de l'expression de l'HO-1 sur la balance protéases/antiprotéases

4. CONCLUSION

Les principaux résultats des études sur les cellules, en utilisant des concentrations non-toxiques du condensat de fumée de cigarette et des particules diesel, montrent que

1. Les particules diesel potentialisent l'effet de la fumée de cigarette sur le stress oxydant (évalué à travers la peroxydation lipidique et l'expression de l'HO-1) et sur le déséquilibre protéases/antiprotéases.
2. L'effet sur la balance protéases/antiprotéases est différent selon le type cellulaire examiné : au niveau des cellules A549 les particules diesel augmentent l'expression de l'ARNm de la MMP-1 et diminuent celui de l' α 1 antitrypsine ; mais au niveau des macrophages ces particules augmentent l'expression de la MMP-12.
3. Le curcumin protège les cellules vis-à-vis de l'augmentation du relargage de LDH et du déséquilibre MMPs/TIMPs des cellules A549. Par contre, il aurait un effet inducteur propre sur la MMP-12 des macrophages.

Les résultats des expériences *in vivo* chez la souris montrent la mise au point progressive du modèle d'enfumage.

Les études sur les cellules répondent globalement aux objectifs que nous nous sommes fixés en démarrant ce travail. Certains résultats étaient plus ou moins prévisibles (effets sur les MMPs), alors que d'autres sont plutôt inattendus (diminution de l'expression de l' α -1 antitrypsine et de la prolifération du muscle lisse bronchique).

Des études sont en cours pour mieux comprendre ces résultats. Quoi qu'il en soit, ces résultats suggèrent que les particules de la pollution atmosphérique peuvent potentialiser les effets de la fumée de cigarette sur l'appareil respiratoire et aggraver ainsi la BPCO post-tabagique. Cet effet serait en rapport avec les propriétés oxydatives des particules.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Selman, M., Cisneros-Lira, J., Gaxiola, M., Ramirez, R., Kudlacz, E. M., Mitchell, P. G., and Pardo, A. Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in Guinea pigs. *Chest* 2003; 123: 1633-1641
2. Foronjy, R. F., Okada, Y., Cole, R., and D'Armiento, J. Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L727-737
3. Arimoto, T., Kadiiska, M. B., Sato, K., Corbett, J., and Mason, R. P. Synergistic production of lung free radicals by diesel exhaust particles and endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 379-387
4. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269: 131-140
5. Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J. C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., O'Dowd, Y., Bens, M., Vandewalle, A., Gougerot-Pocidallo, M. A., Lizard, G., and Ogier-Denis, E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10703-10717
6. Eden, E., Mitchell, D., Mehlman, B., Khouli, H., Nejat, M., Grieco, M., and Turino, G. Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe α -1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 68-74
7. Taille, C., Almolki, A., Benhamed, M., Zedda, C., Megret, J., Berger, P., Leseche, G., Fadel, E., Yamaguchi, T., Marthan, R., Aubier, M., and Boczkowski, J. Heme oxygenase inhibits human airway smooth muscle proliferation via a bilirubin-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 27160-27168
8. Herrmann, G., Wlaschek, M., Bolsen, K., Prenzel, K., Goerz, G., and Scharffetter-Kochanek, K. Photosensitization of uroporphyrin augments the ultraviolet A-induced

synthesis of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 398-403

9. Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J., and Motterlini, R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 2003; 371: 887-895

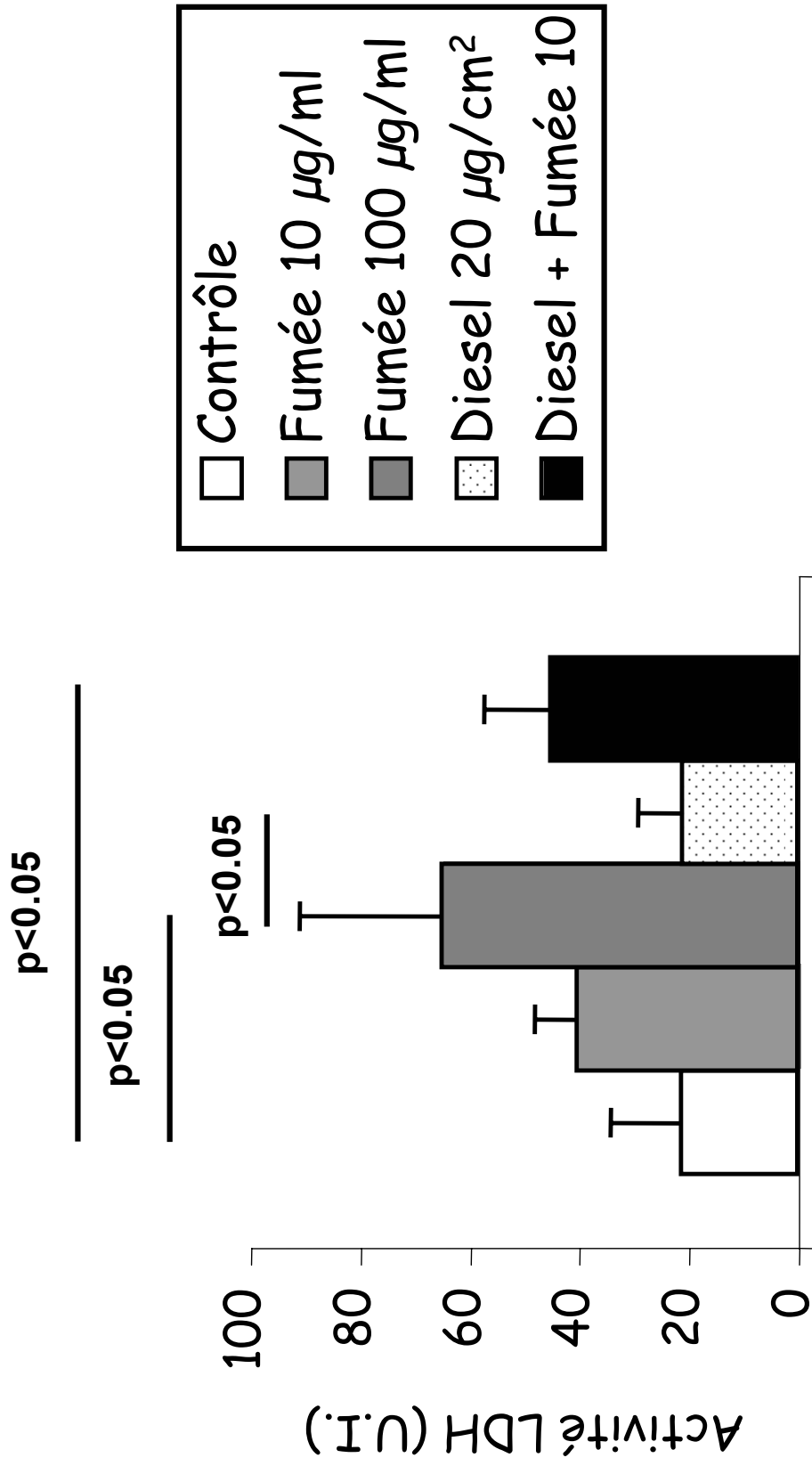
-Résultats *in vitro*-

Lignée A549

Figure 1

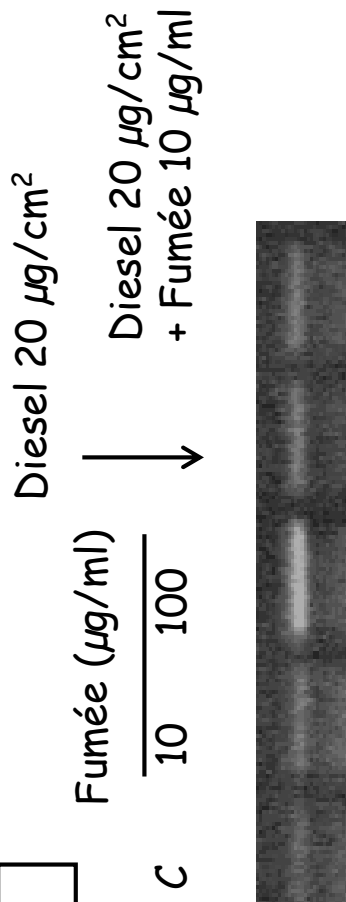
Cellules A549

Effet de la fumée et des particules diesel sur l'activité LDH

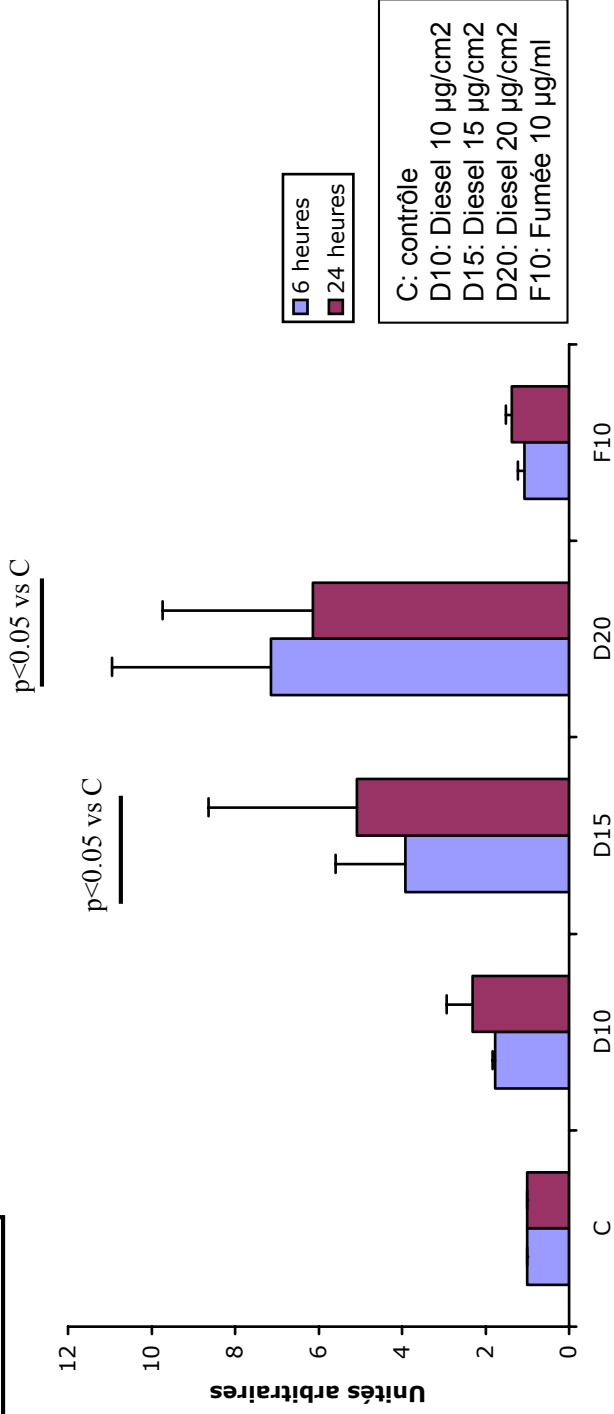


Cellules A549
Effet de la fumée de cigarette et des particules diesel sur l'expression de l'ARNm de MMP-1

2 a. RT-PCR sémi-quantitative



2 b. RT-PCR quantitative

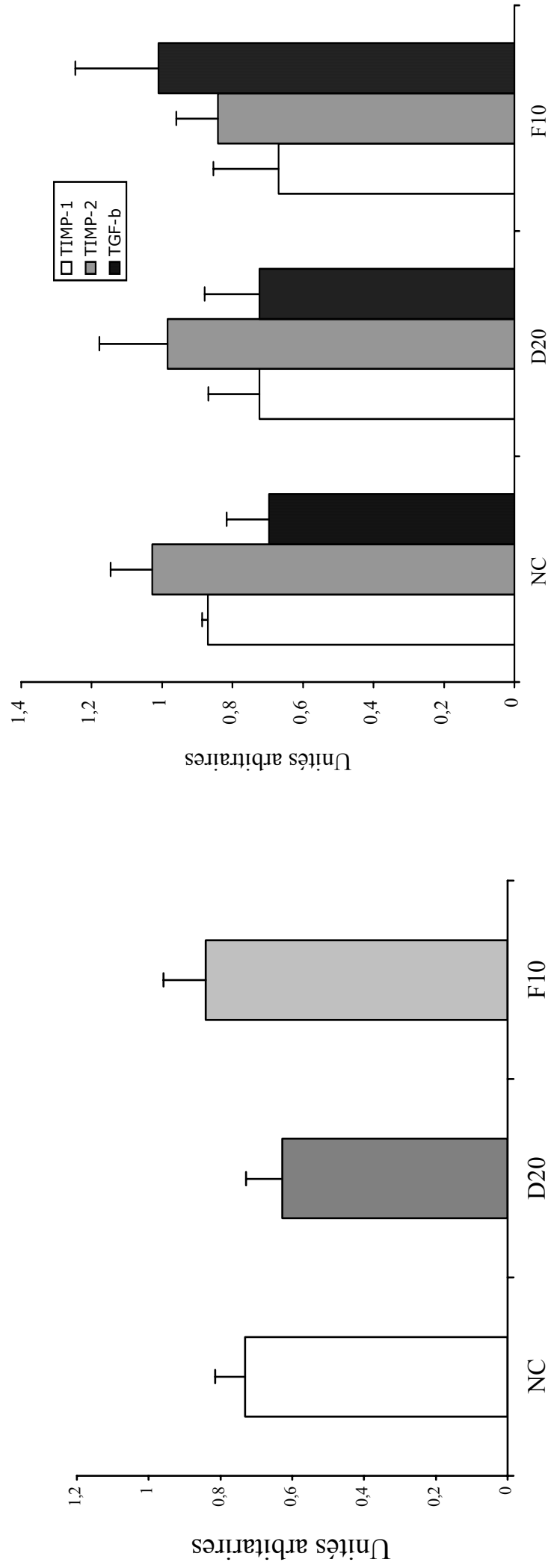


Cellules A549

Effet de la fumée de cigarette et des particules diesel sur l'expression de l'ARNm de MMP-2, TIMP-1 et -2 et TGF- β

MMP-2

TIMP-1, TIMP-2, TGF- β



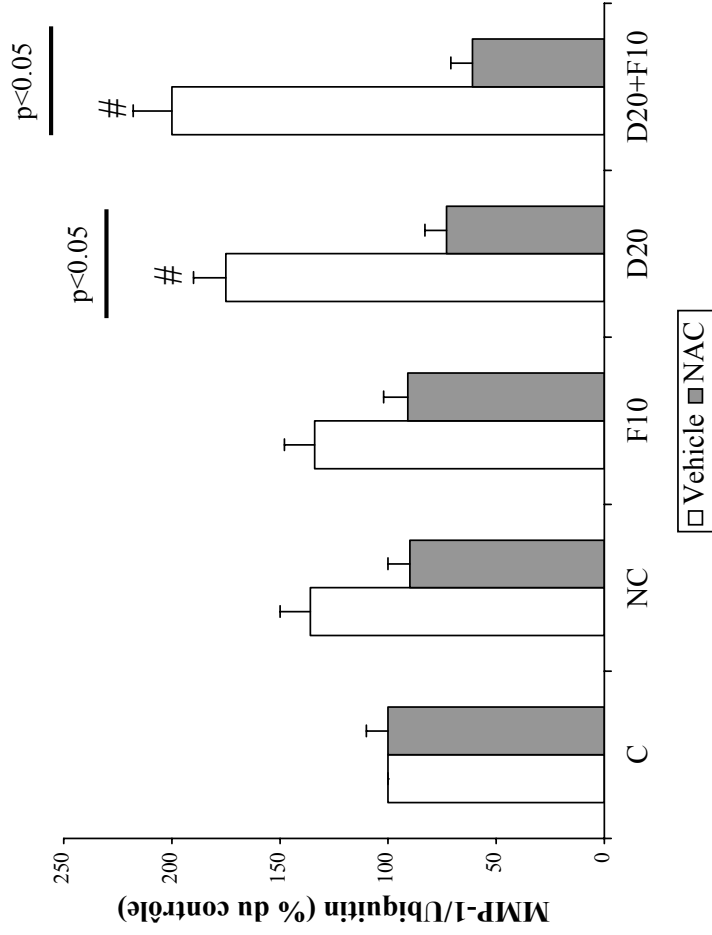
NC: particules de noir de carbone
 D20: Diesel 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
 F10: Fumée 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Cellules A549

Rôle du stress oxydant dans l'induction de la MMP-1

Effet de la N-acetyl cystéine (NAC)
sur l'expression de la MMP-1

Expression du 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)



C: contrôle
NC: particules de noir de carbone
D20: Diesel 20 µg/cm²
F10: Fumée 10 µg/ml

#: p < 0,05 vs C

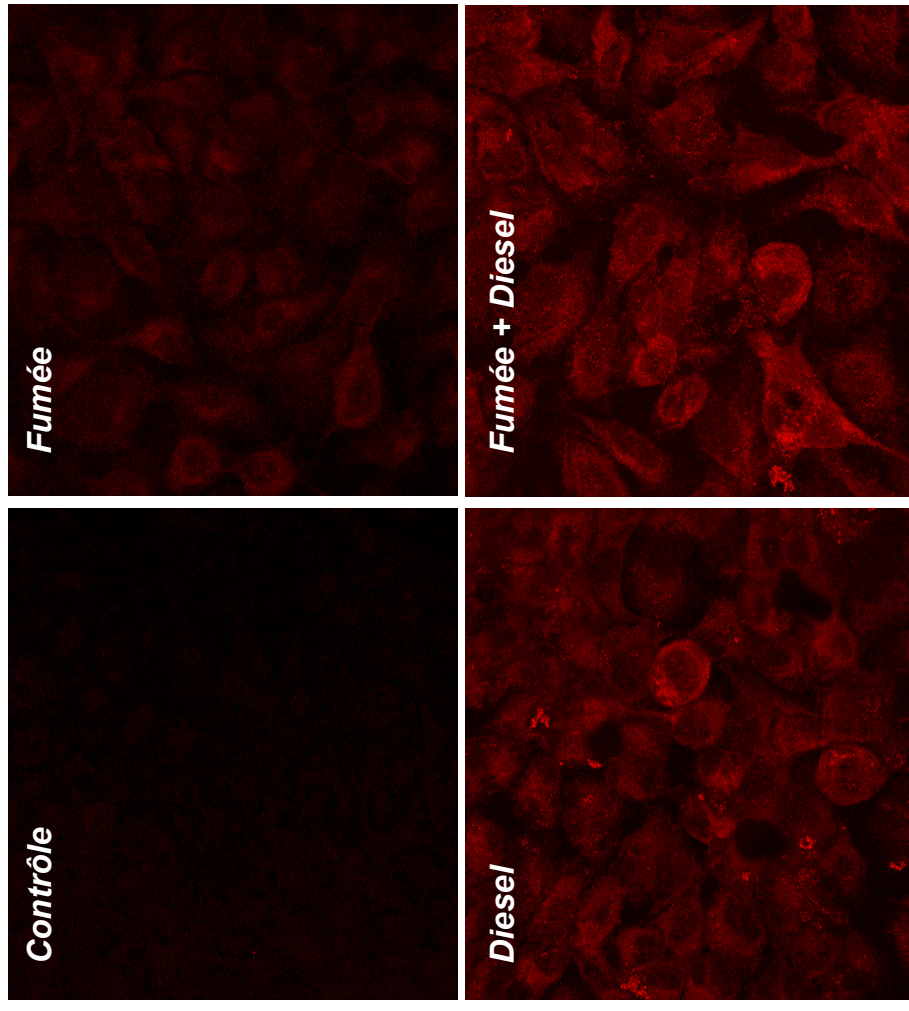
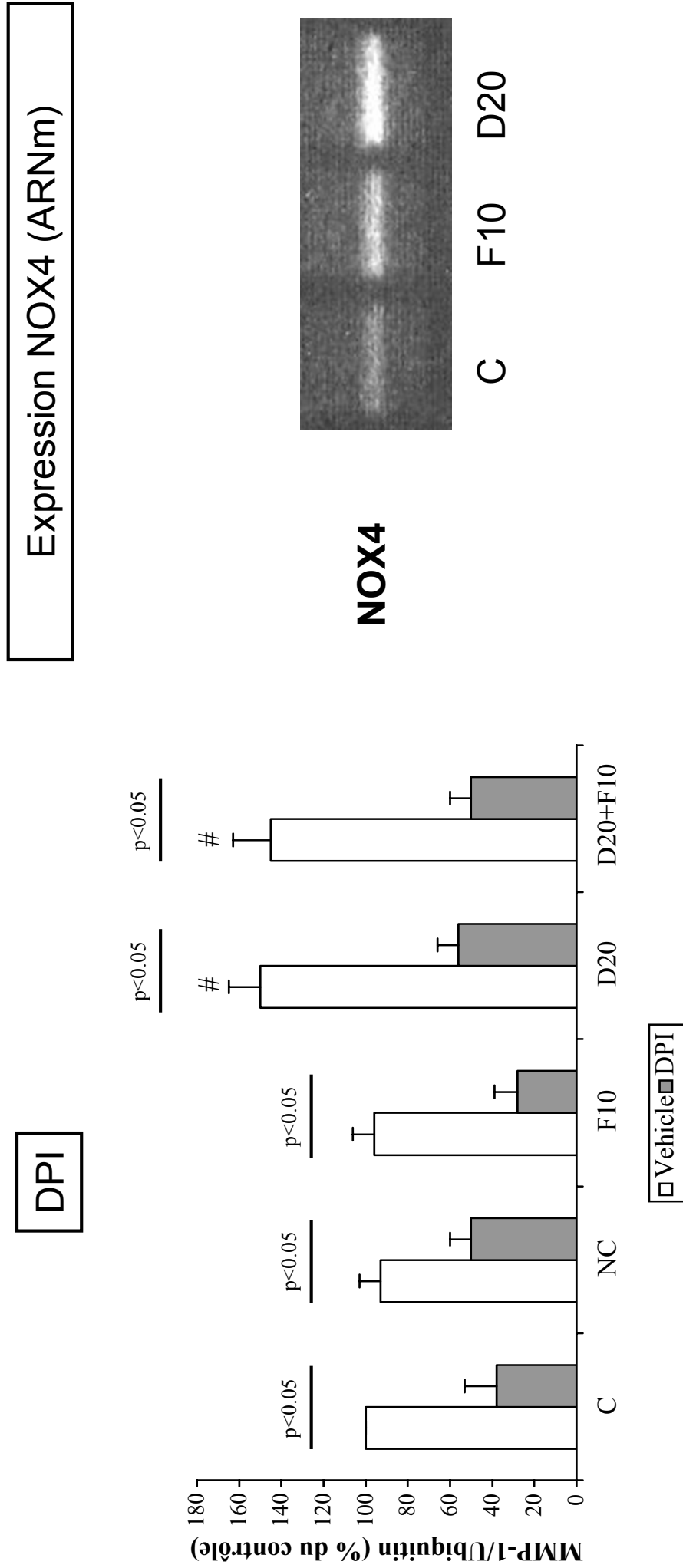


Figure 5

Cellules A549

Rôle de la NADPH-oxydase NOX4 dans l'induction de la MMP-1



C: contrôle
NC: particules de noir de carbone
D20: Diesel 20 µg/cm²
F10: Fumée 10 µg/ml

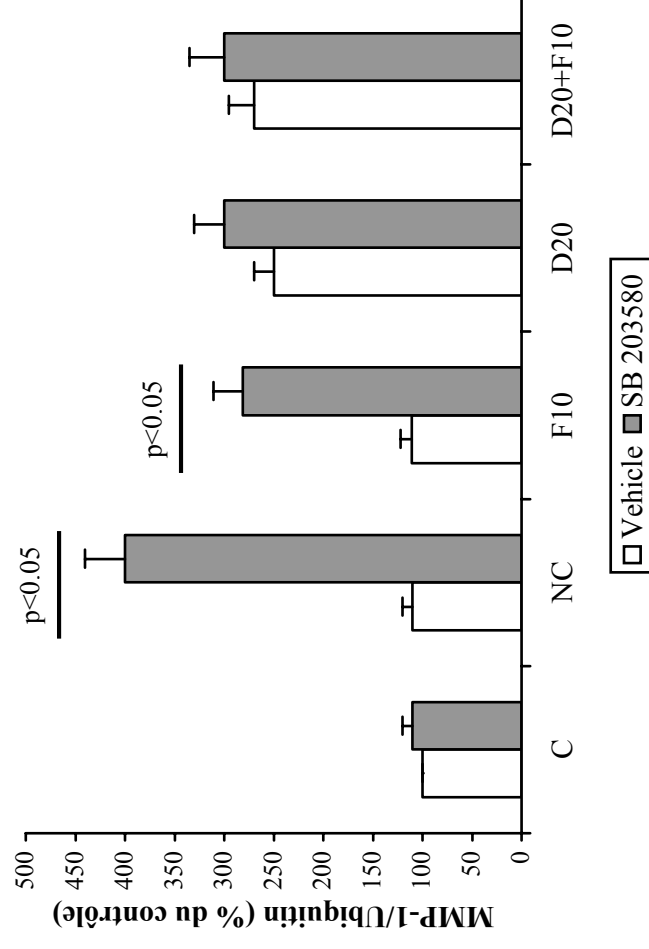
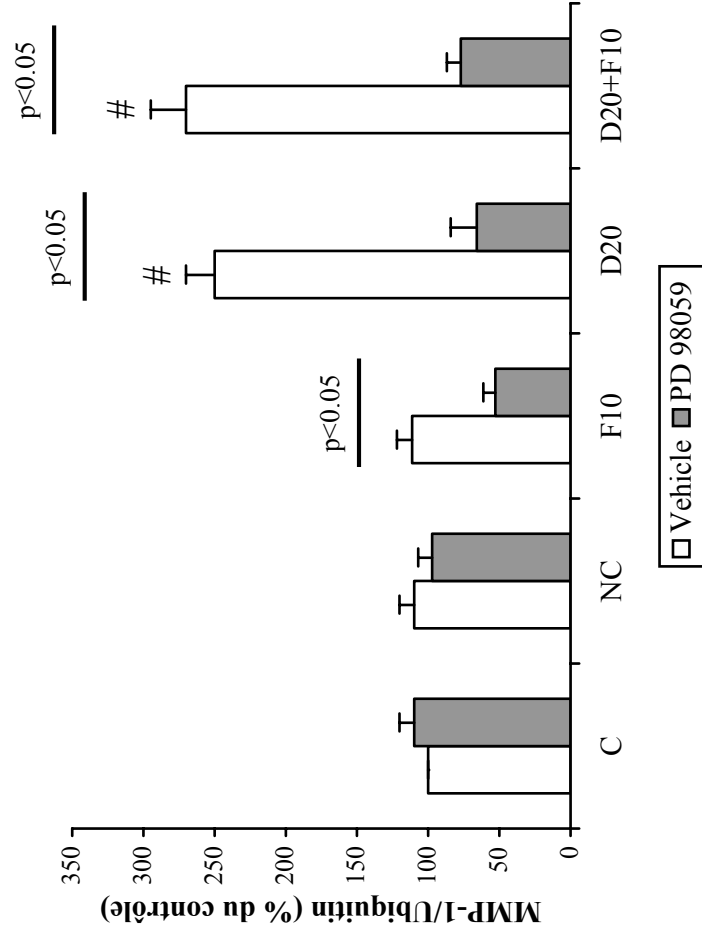
#: p<0,05 vs C

Cellules A549

Effet des inhibiteurs d'ERK 1/2 et de la p38 MAPK sur l'expression de la MMP-1 induite par la fumée de cigarette et les particules diesel

Inhibiteur d'ERK

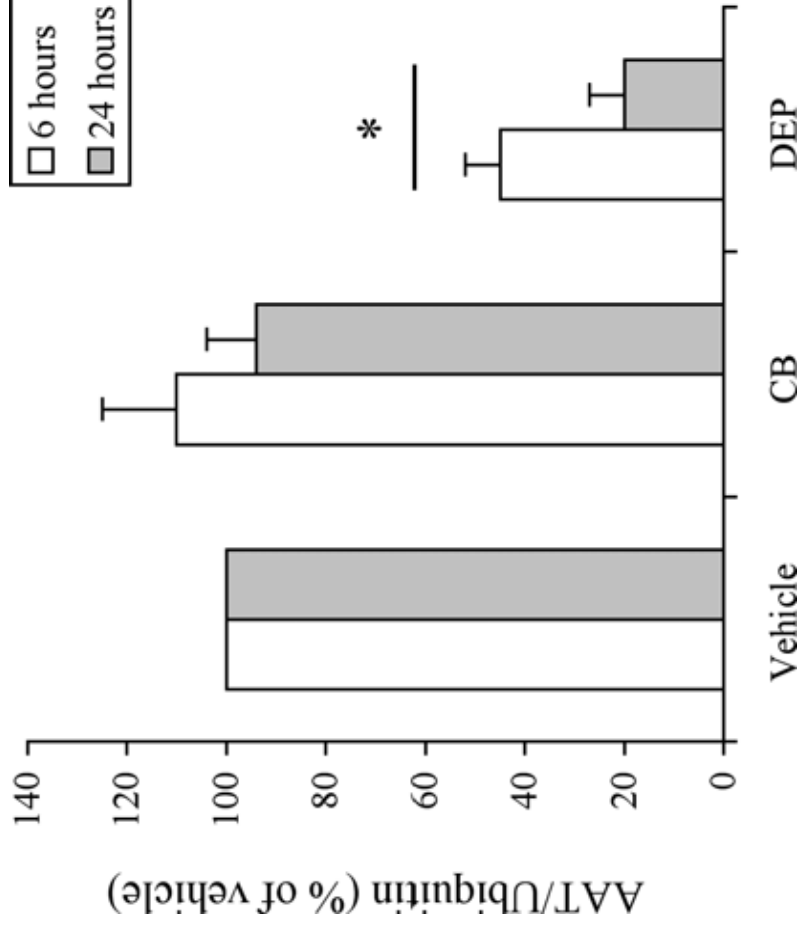
Inhibiteur de p38



C: contrôle
 NC: particules de noir de carbone
 D20: Diesel 20 µg/cm²
 F10: Fumée 10 µg/ml

#: $p < 0,05$ vs C

Cellules A549
Effet de la fumée de cigarette et des particules diesel sur l'expression de l'ARNm de l'a1-antitrypsine

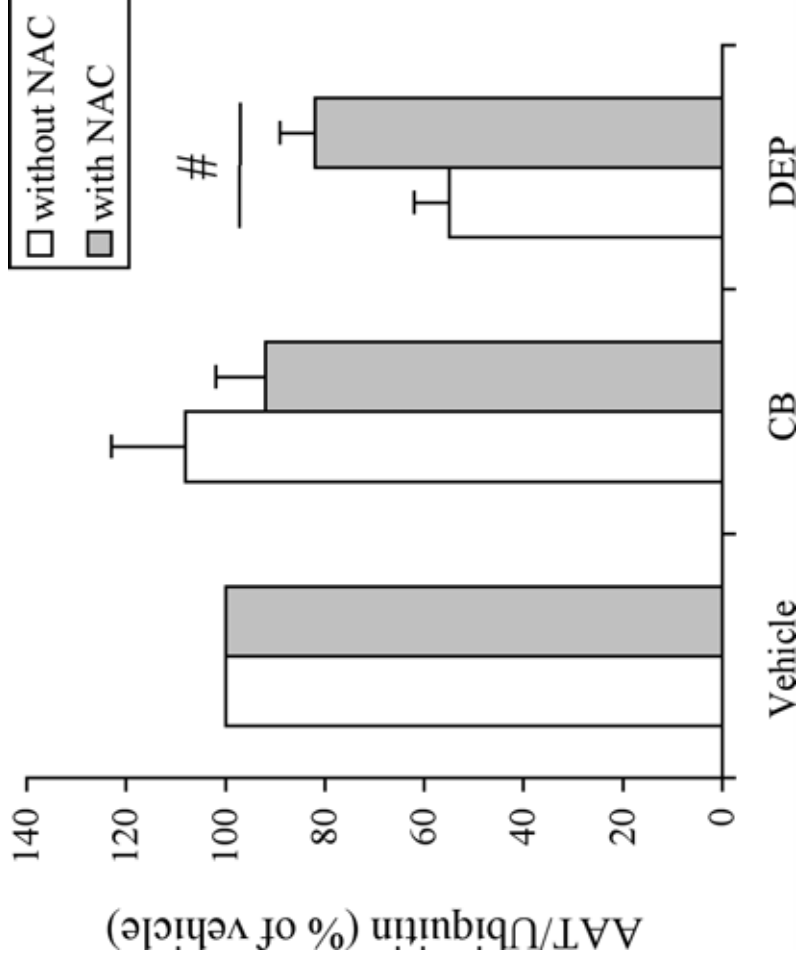


C: contrôle
 CB: particules de noir de carbone
 DEP: Diesel 20 µg/cm²

#: p<0,05 vs Vehicle

Cellules A549

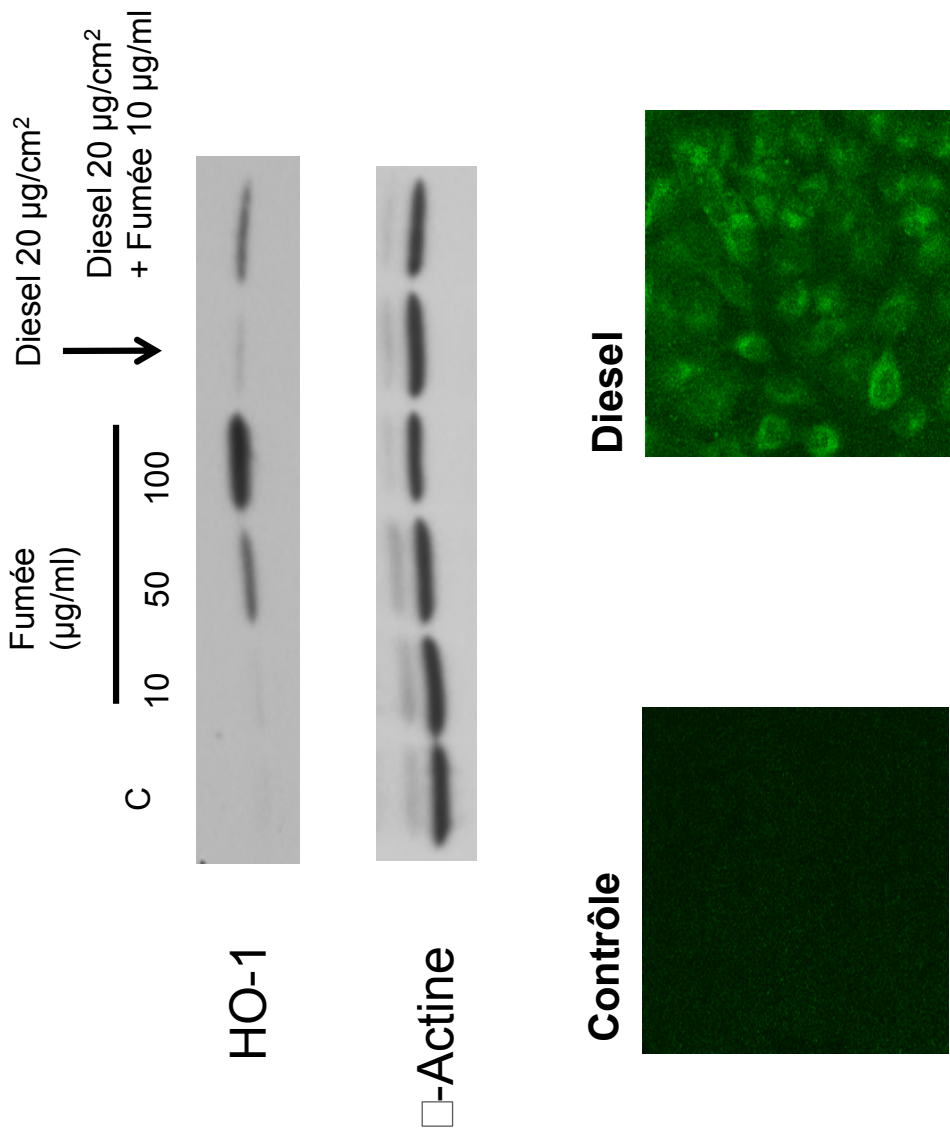
Effet de la N-acetyl cystéine (NAC) sur l'expression de l' α 1-antitrypsine induite par la fumée de cigarette et les particules diesel



C: contrôle
CB: particules de noir de carbone
DEP: Diesel 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

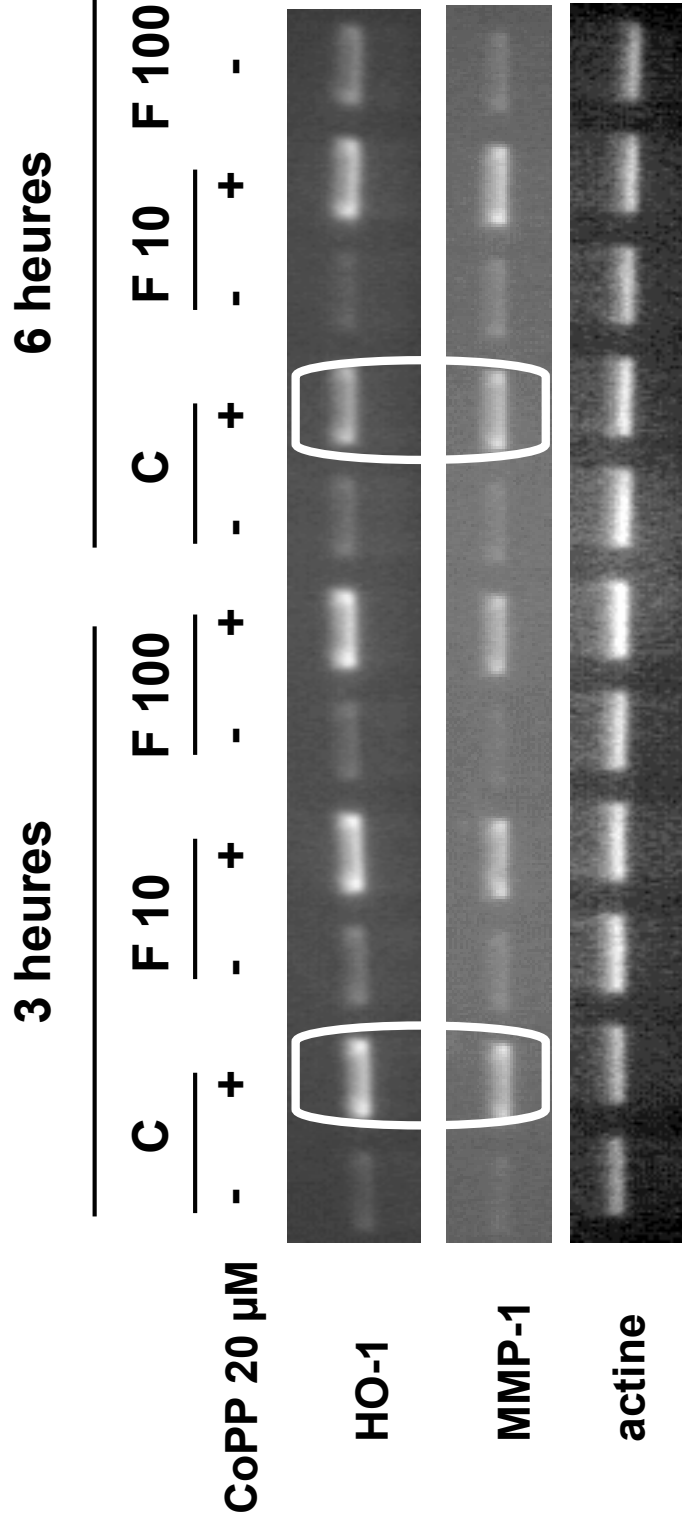
Cellules A549

Effet de la fumée de cigarette et des particules diesel sur l'expression de l'HO-1



Cellules A549

Effet de la cobalte protoporphyrin IX (CoPP) sur l'expression de l'ARNm de l'HO-1 et de la MMP-1



C: contrôle
 F10: Fumée 10 µg/ml
 F100: Fumée 100 µg/ml

Figure 11

Cellules A549
Effet du curcumin sur l'expression de la HO-1 (protéine)

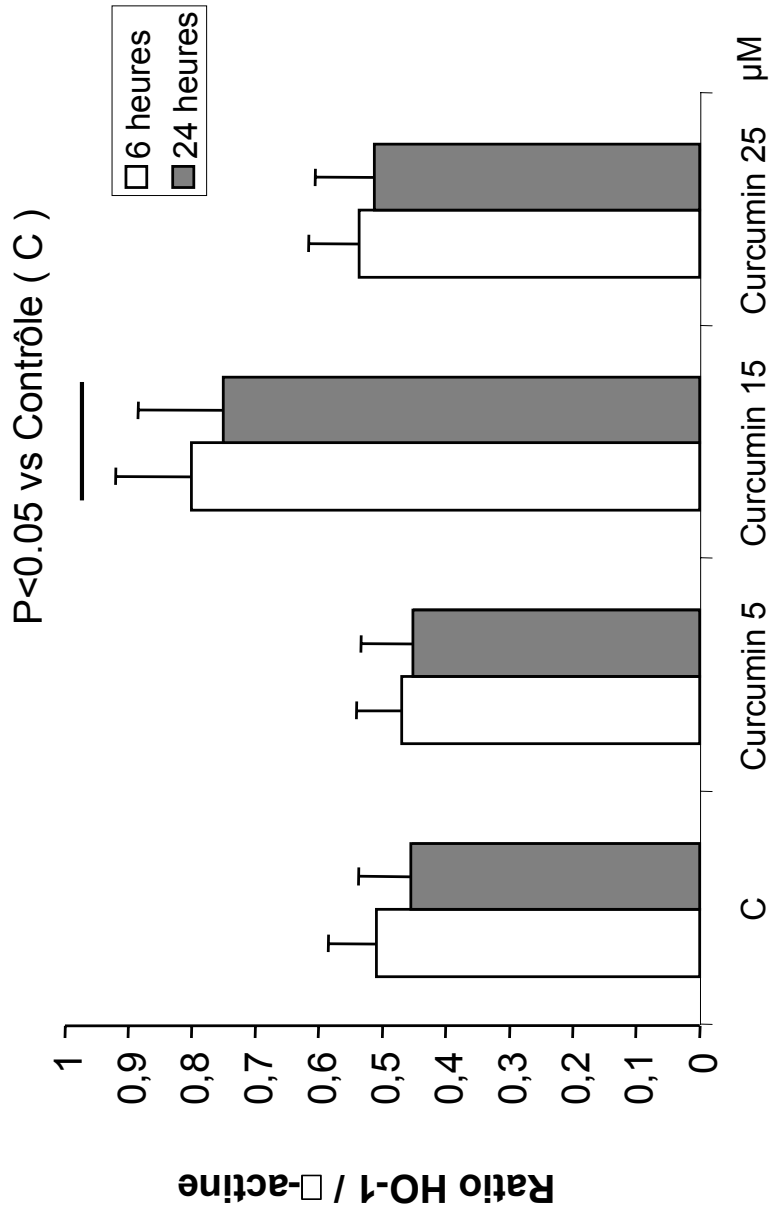


Figure 12

Cellules A549
Effet du curcumin sur l'activité LDH

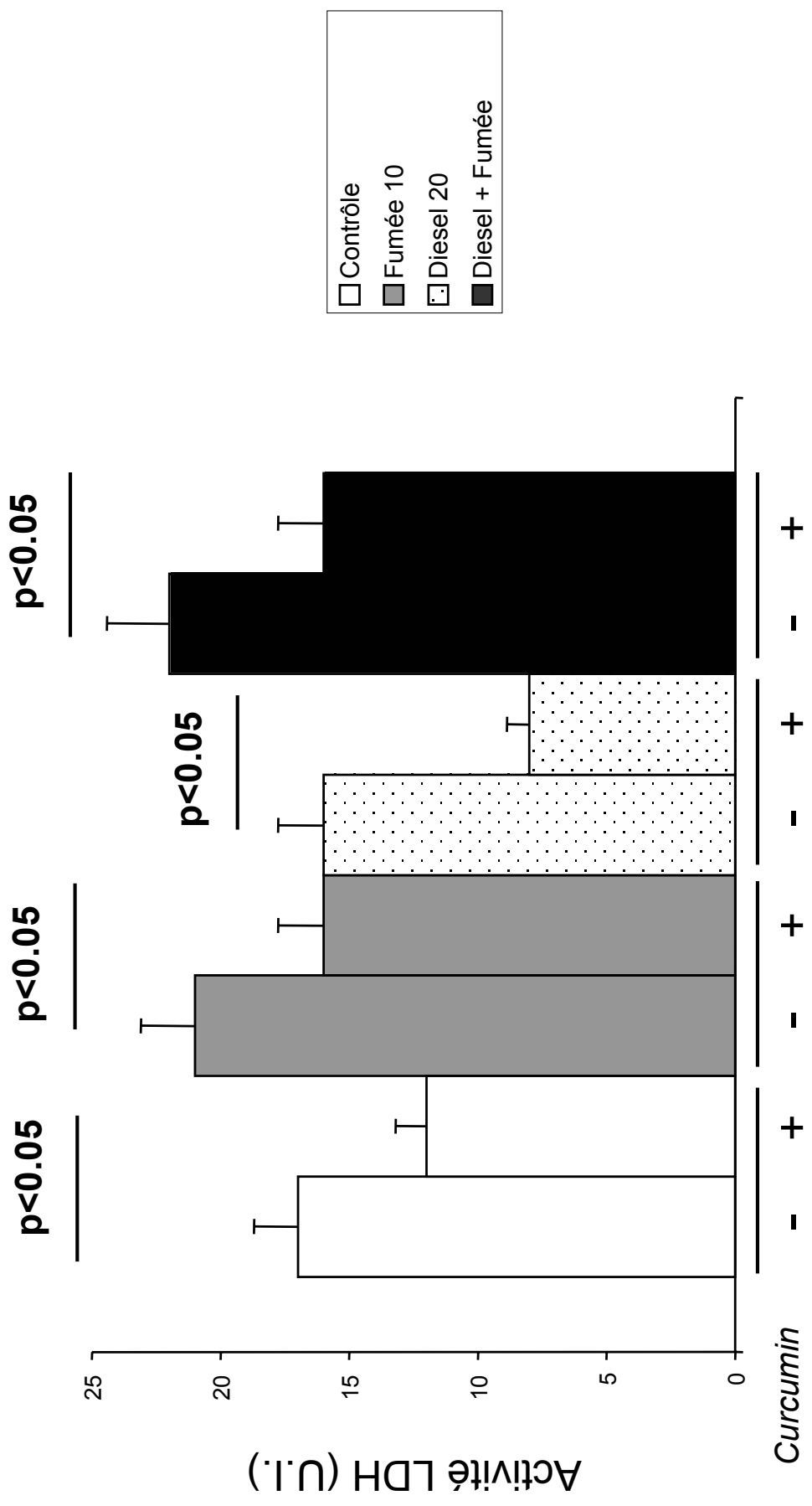
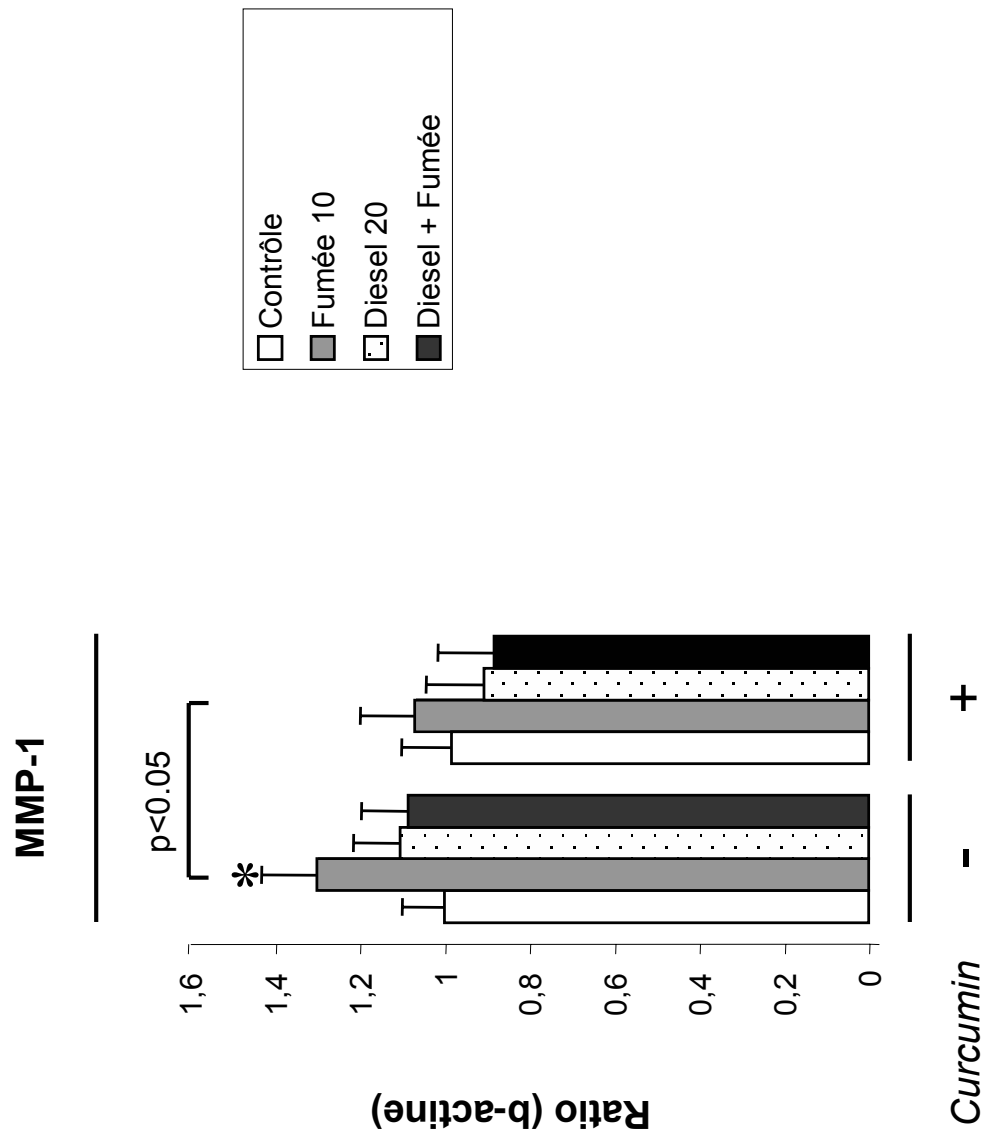


Figure 13

Cellules A549
Effet du curcumin sur l'expression de la MMP-1

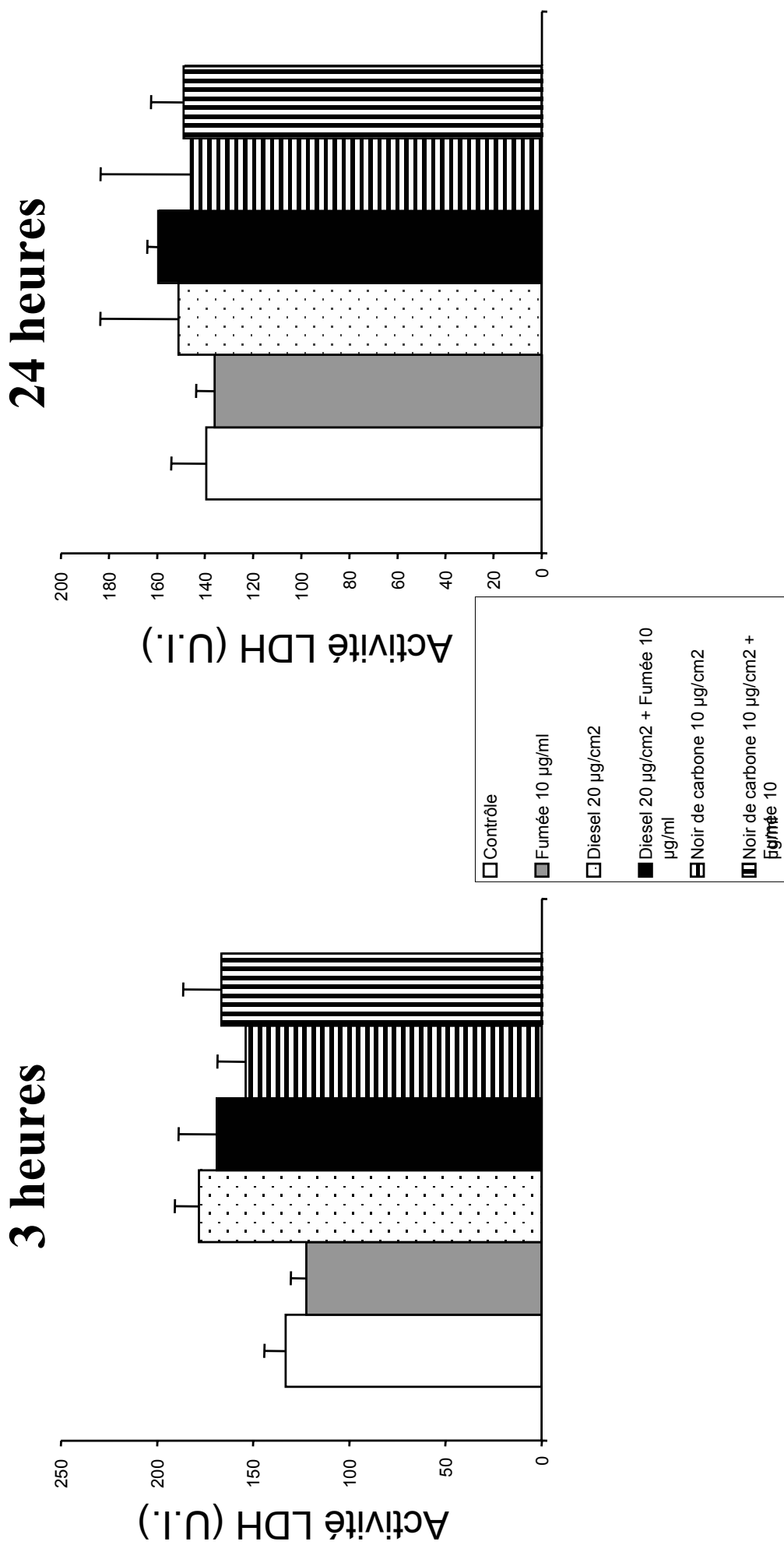


-Résultats In Vitro-

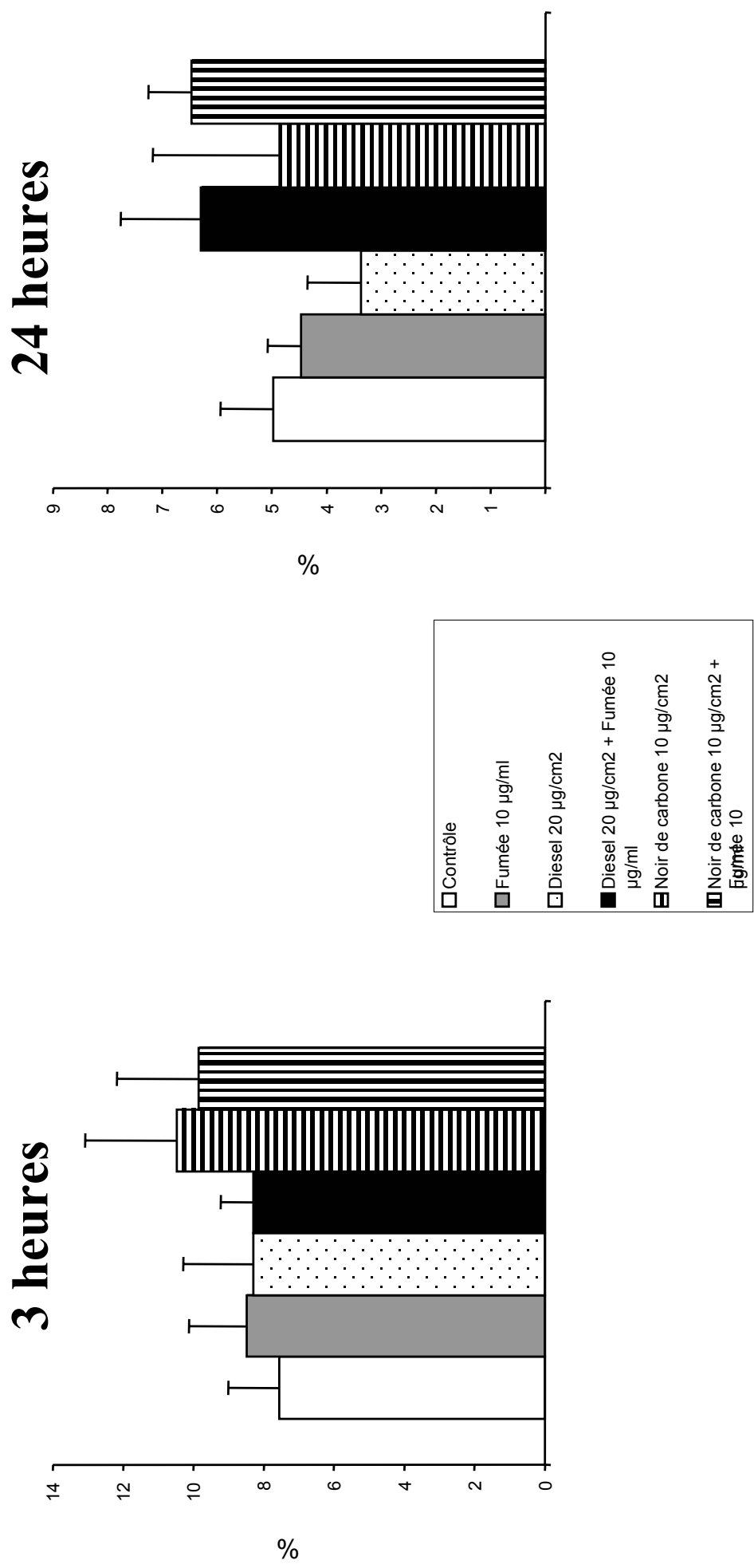
Macrophages murins

Figure 14

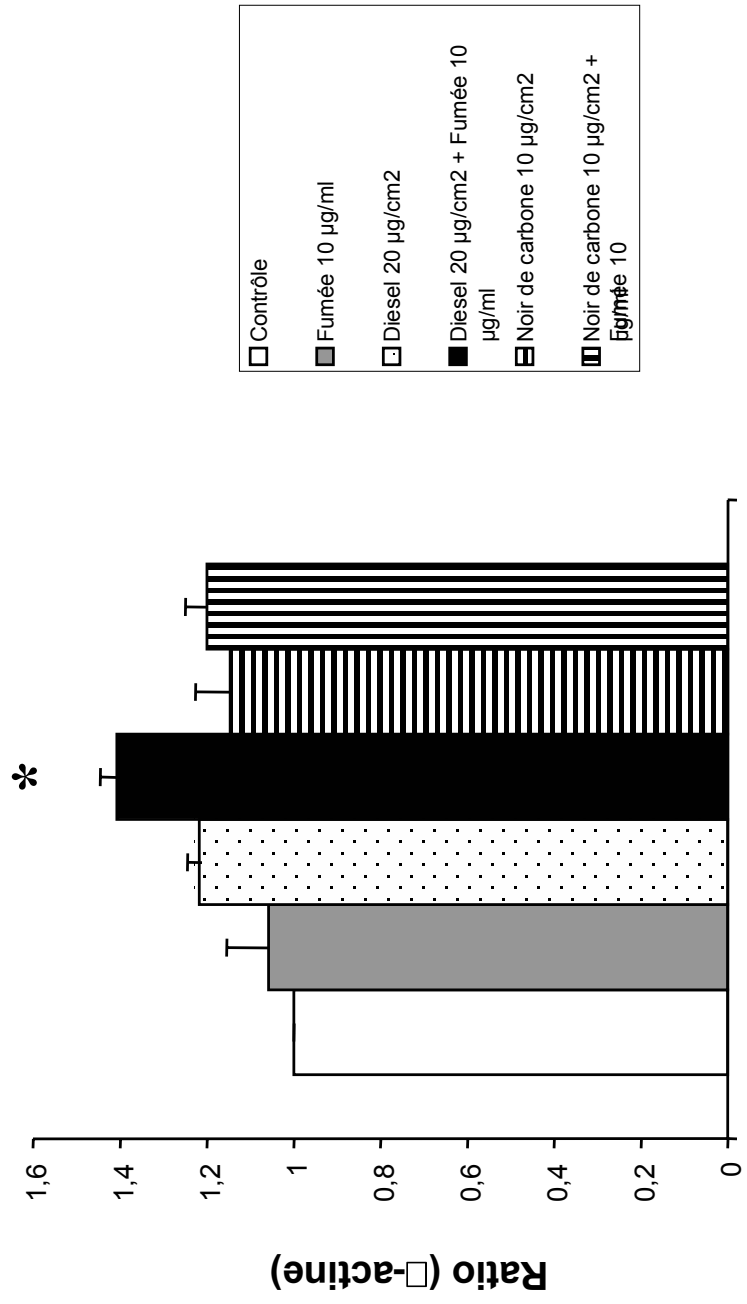
Macrophages murins
Effet de la fumée et des particules diesel sur l'activité LDH



Macrophages murins
Effet de la fumée et des particules diesel sur la viabilité cellulaire



Macrophages murins
Effet de la fumée de cigarette et des particules diesel
sur l'expression de l'HO-1 (ARNm)

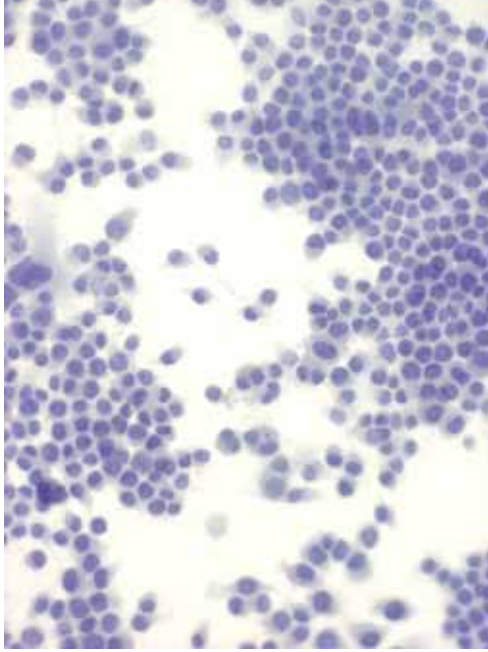


* p<0.05 vs Contrôle

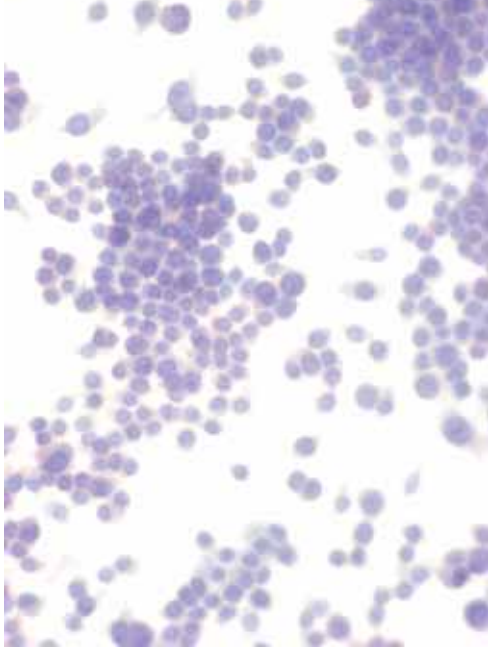
Macrophages murins

Effet du la fumée de cigarette et des particules diesel sur la peroxydation lipidique

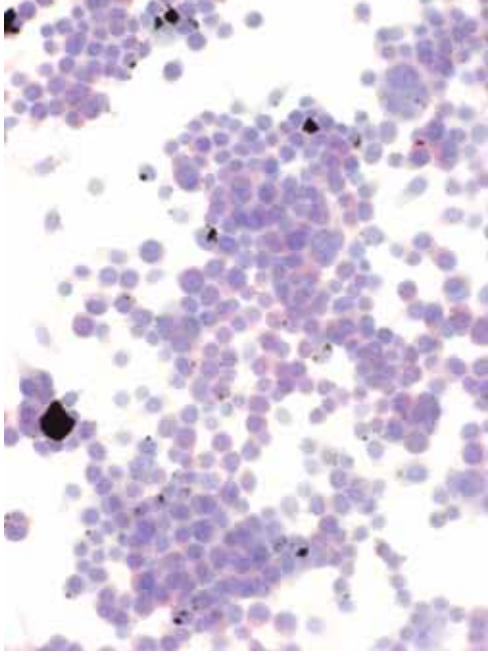
Contrôle



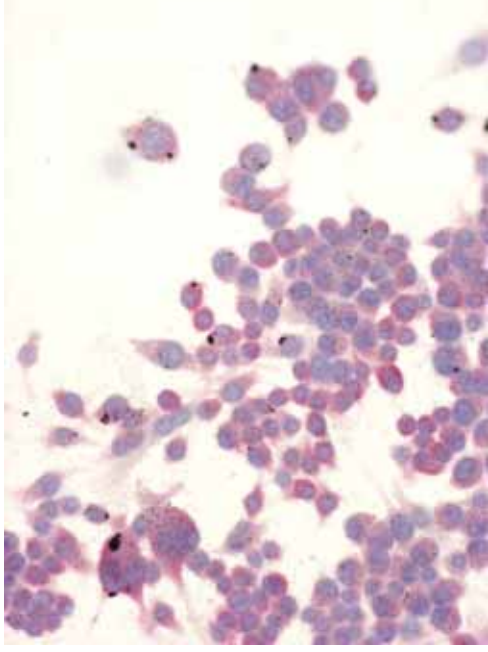
Fumée 10



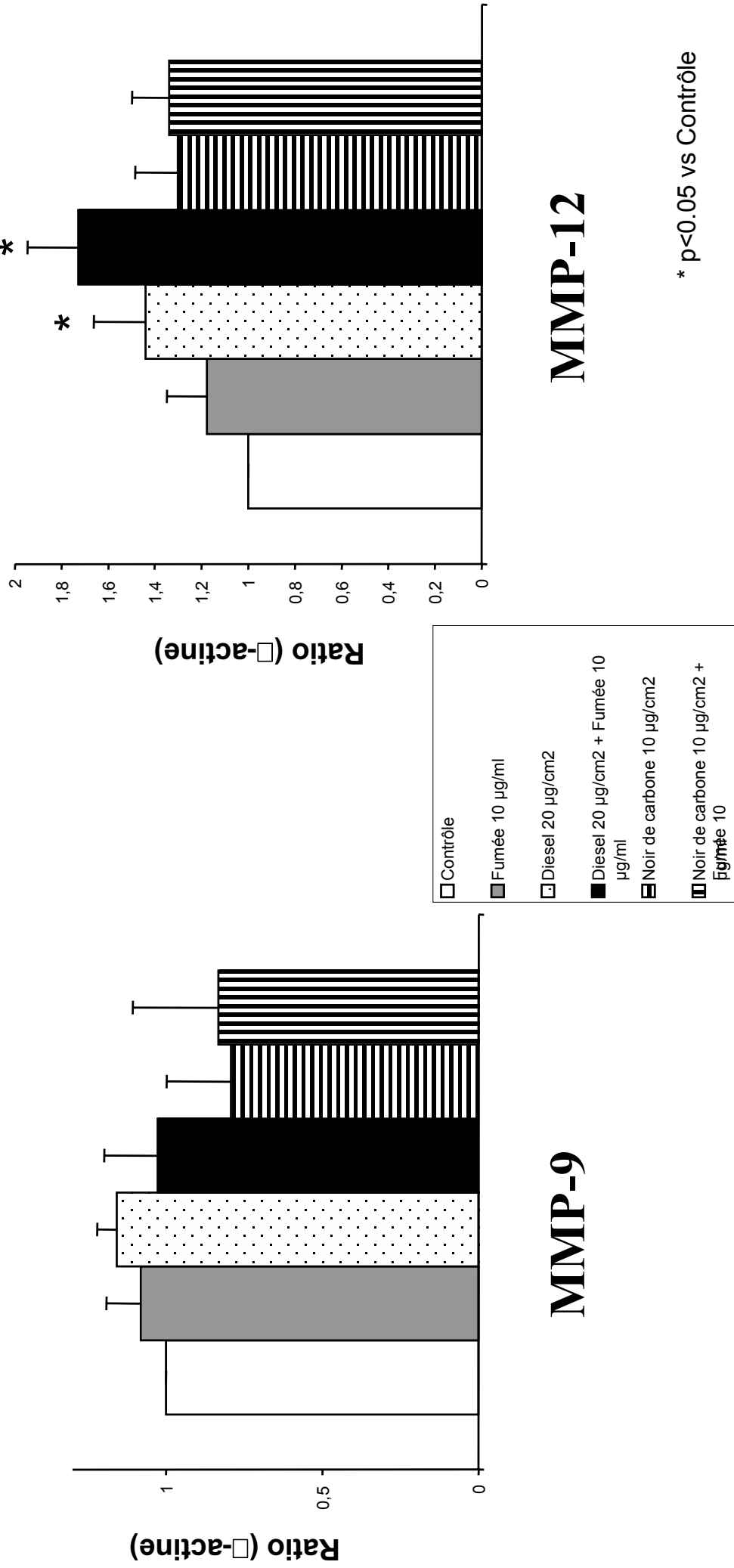
Diesel



Fumée + Diesel



Macrophages murins
Effet du la fumée de cigarette et des particules diesel sur
la balance MMP/TIMP (1)



* p<0.05 vs Contrôle

Figure 19

Macrophages murins
Effet de la fumée de cigarette et des particules diesel sur
la balance MMP/TIMP (2)

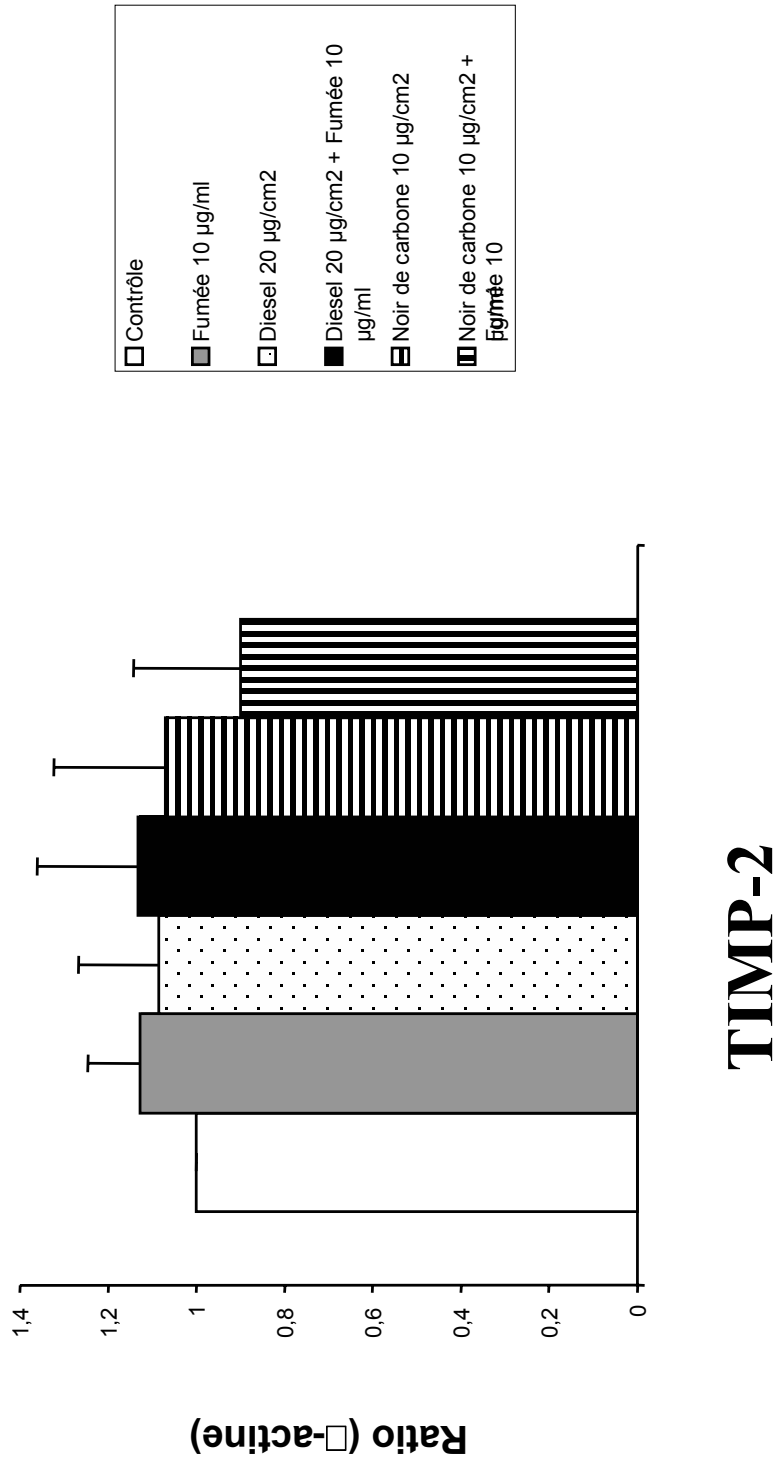


Figure 20

Macrophages murins
Effet du curcumin sur l'expression de la HO-1 (protéine)

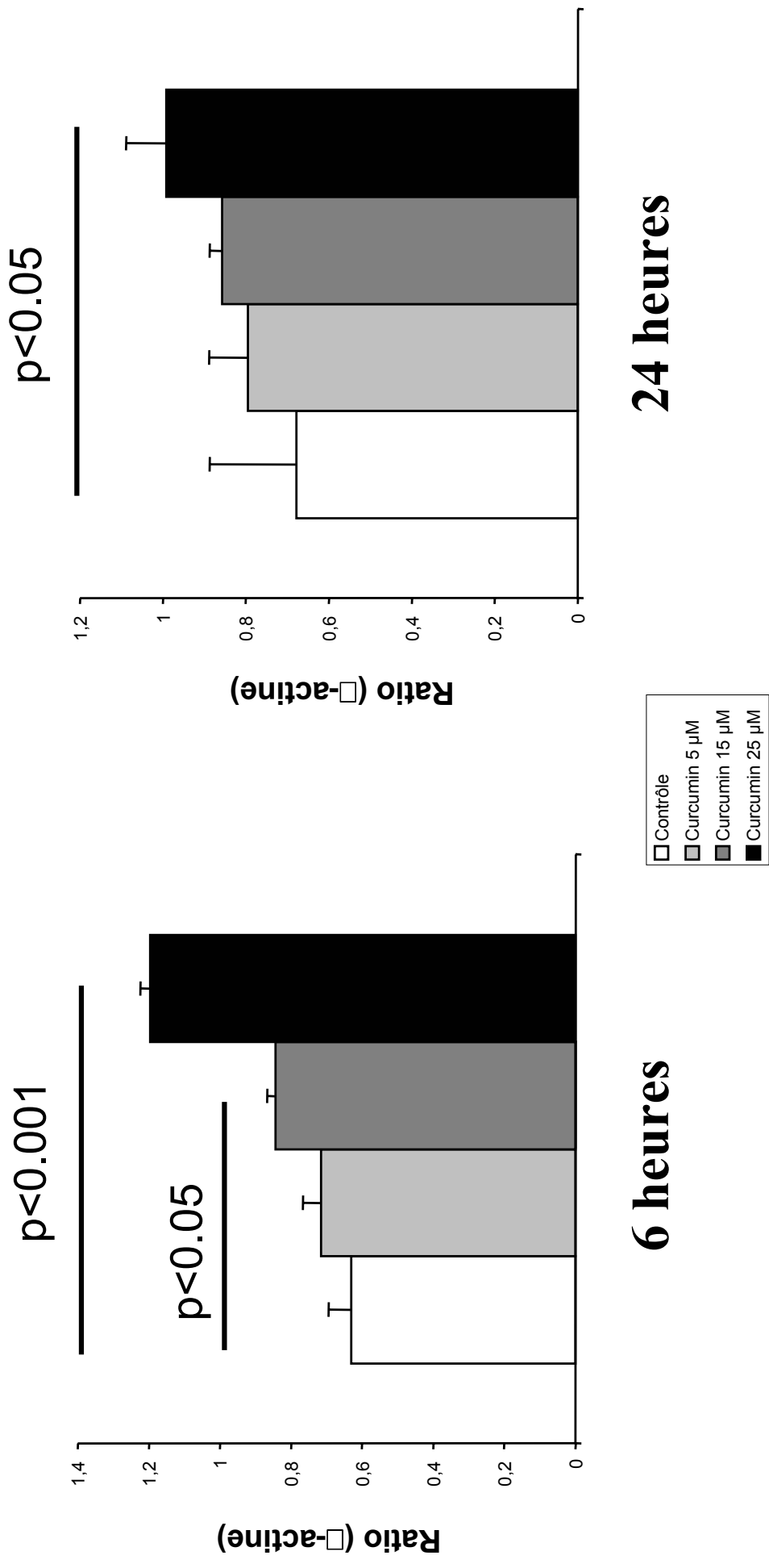
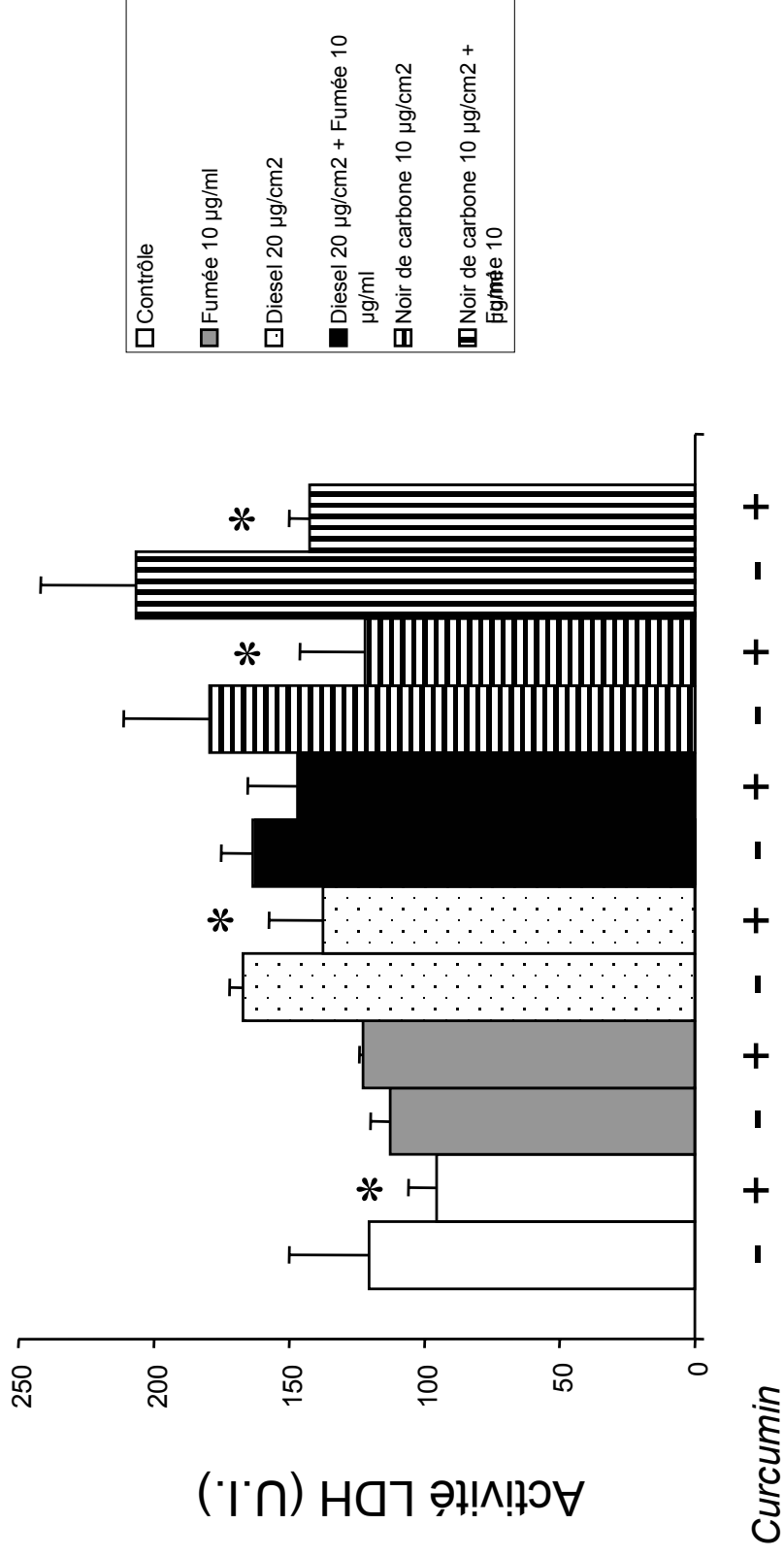


Figure 21

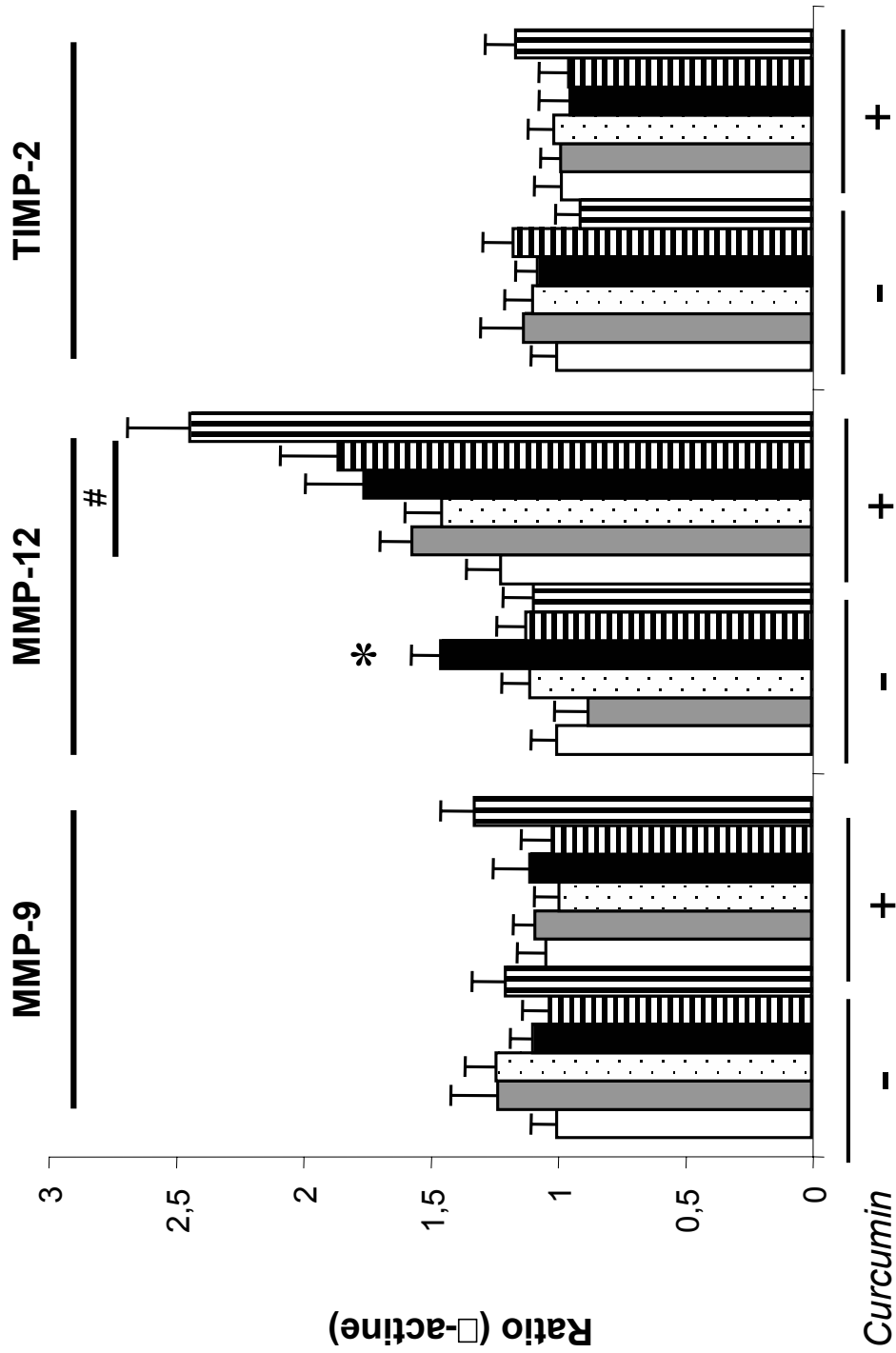
Macrophages murins
Effet du curcumin sur l'activité LDH



*: p<0.05 vs curcumin -

Figure 22

Macrophages murins
Effet du curcumin sur la balance MMPs/TIMP



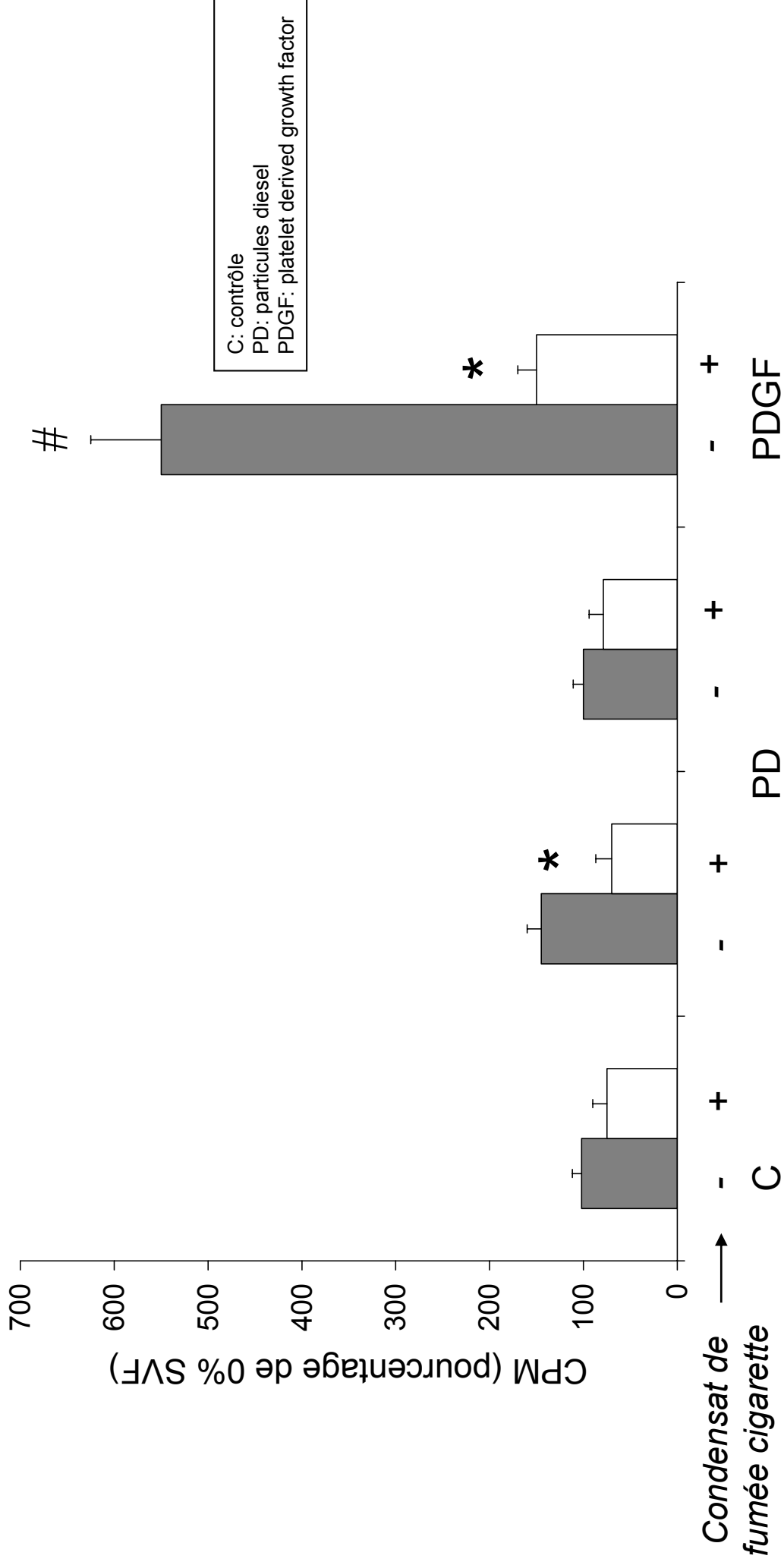
•: p<0.05 vs Contrôle
 #: p<0.05 vs Curcumin-

-Résultats In Vitro-

Cellules musculaires lisses bronchiques

Figure 23

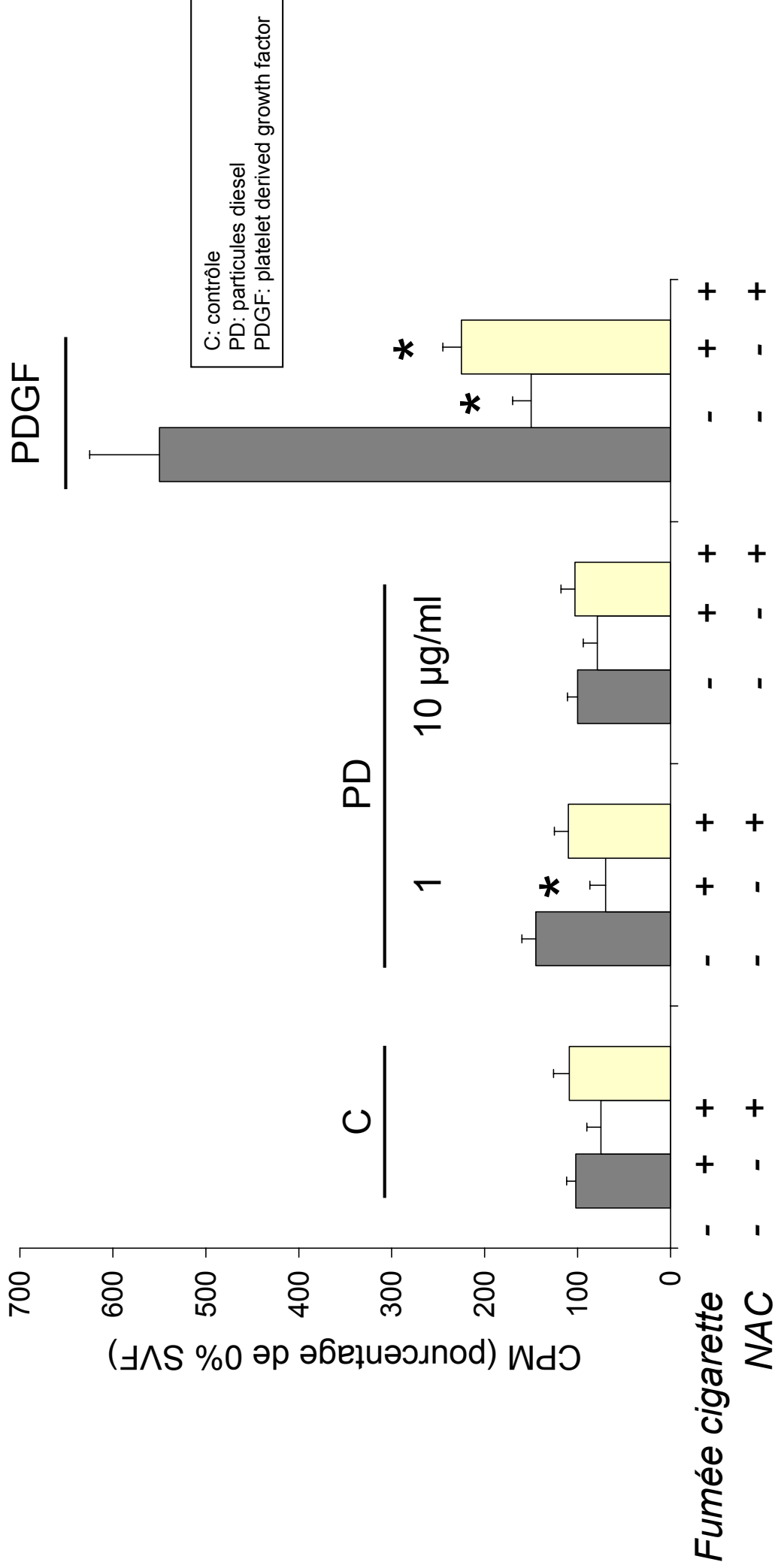
Cellules musculaires lisses bronchiques
Effet du la fumée de cigarette et des particules diesel sur
la prolifération



* p<0.05 vs sans condensat
p<0.05 vs sans condensat

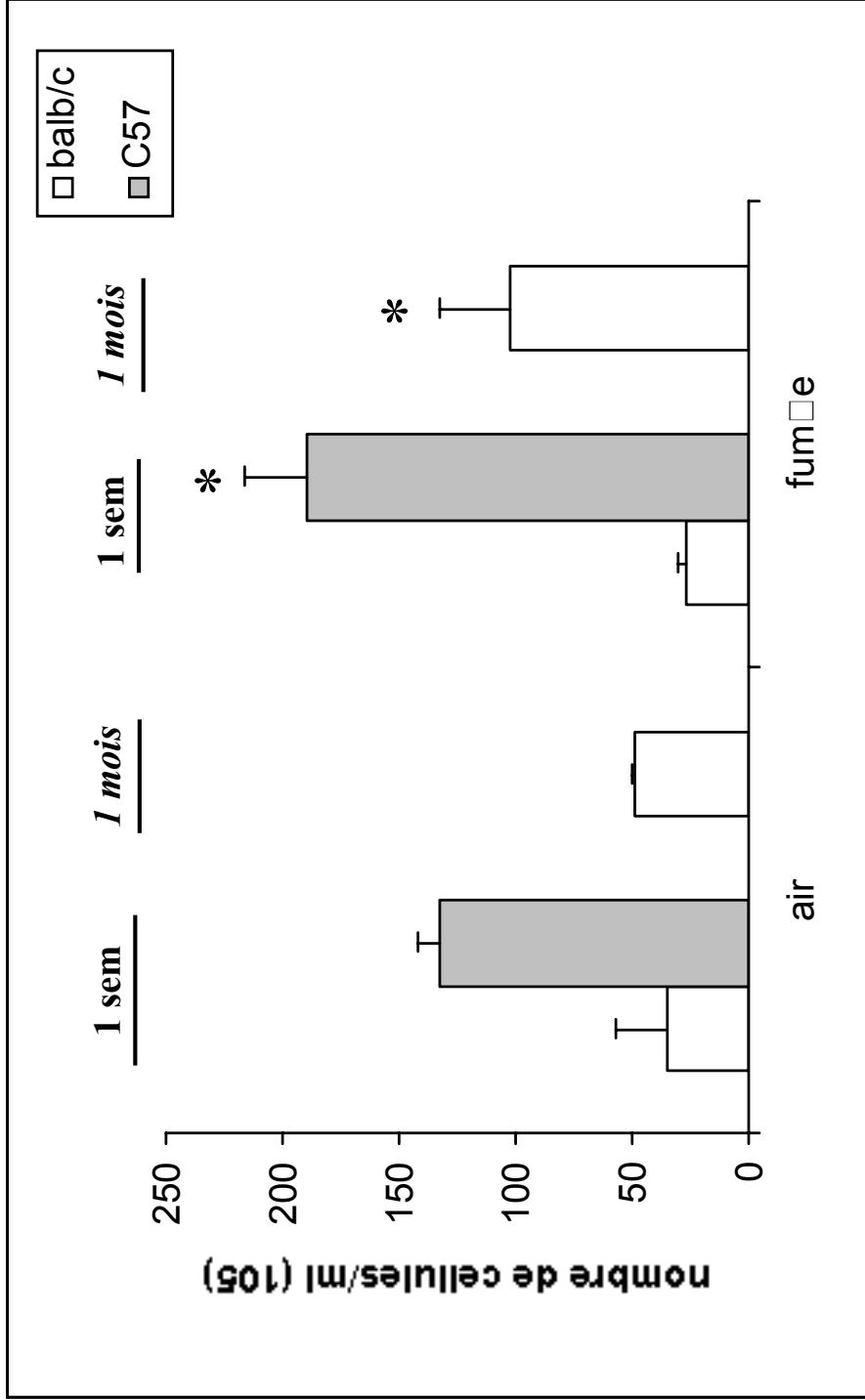
Figure 24

Cellules musculaires lisses bronchiques
Effet de la N-acetyl cystéine sur les modifications de la prolifération induites
par la fumée de cigarette et des particules diesel



-Résultats *in vivo*-

Etude in vivo
Effet de la fumée de cigarette sur la cellularité du LBA :
« effet souche »



* p < 0.05 vs air

Etude in vivo
Effet de la fumée de cigarette sur la balance
protéases/antiprotéases (souris Balb/c, 1 mois d'exposition)

