

Dr Lan Tien NGUYEN, Pneumologue, Tabacologue,
Addictologue CH Vichy

Dr Jean PERRIOT, Dispensaire Emile Roux, Clermont
Ferrand

Science'Tab IRAAT Lyon 20 octobre 2016

**MODÈLE ANIMAL DE BPCO:
PARTICULARITÉS DU MODÈLE
INDUIT PAR LA FUMÉE DE
CIGARETTES**

Liens d'intérêt

- ⦿ Novartis
- ⦿ Boehringer Ingelheim
- ⦿ Chiesi
- ⦿ Lundbeck

Plan de l'exposé

- Modèles animaux et leurs limites
- Méthodologie générale de l'expérimentation animale
- Modèle général de l'inflammation dans la BPCO
- Expression pathogénique du modèle animal exposé à la FC:
 - Vieillesse et tabac
 - Stress oxydant
 - Lésions inflammatoires pulmonaires
 - Atteintes systémiques

Introduction

- BPCO
 - Insuffisance respiratoire progressive, non réversible, d'origine inflammatoire, en réaction à des particules et gaz toxiques
 - 3^{ème} cause de mortalité et 5^{ème} cause de handicap dans le monde
 - FDR principal (80%): fumée de tabac après plusieurs dizaines d'années d'exposition
 - Manifestations pathogéniques hétérogènes, pulmonaires et systémiques
 - Pas de traitement préventif contre l'induction de la maladie, ni de traitement curatif
- Modèle animal permet de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques et développer de nouveaux traitements

Modèle animal idéal

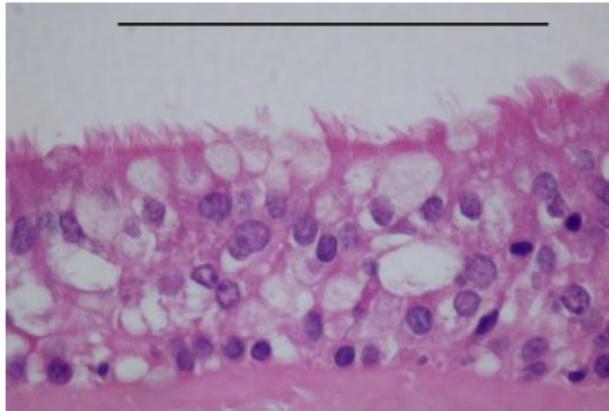
- Anatomie pulmonaire similaire aux humains
- Pathologie reproductible sur un temps court
- Réunir les caractéristiques cliniques humaines de la maladie
 - Hypersécrétion mucus
 - Remodelage des VA et vasculaire
 - Emphysème
 - Modifications de la fonction respiratoire
 - Co-morbidités systémiques
 - Exacerbations aiguës
 - Degrés de sévérité

Limites des modèles liés à l'animal

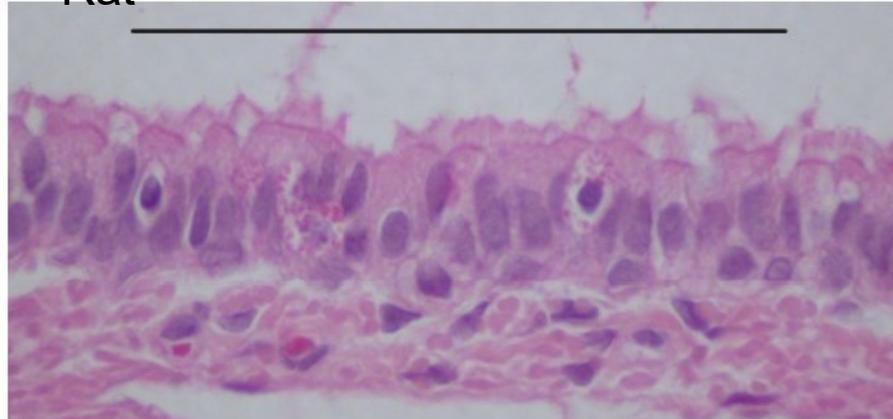
- Développement et maturité alvéolaires variables en fonction de l'espèce
- Ramification bronchiolaire est moindre chez les rongeurs
- Limites dans les Explorations Fonctionnelles Respiratoires
 - ➔ Risques de biais
- Coût
- Ethique

Epithélium trachéal

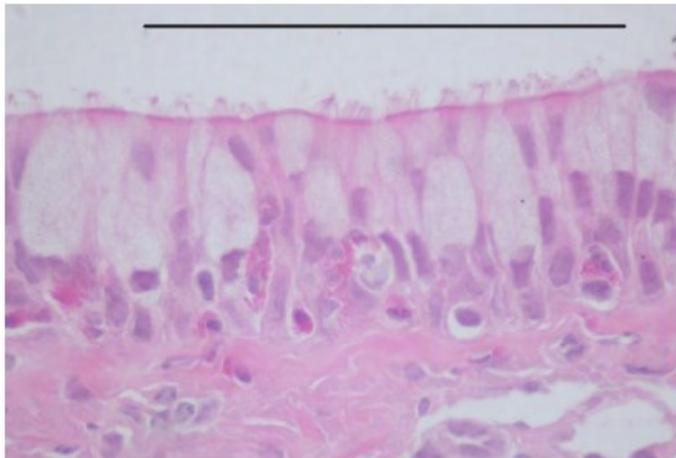
A Humain



C Rat



B Cochon d'inde



D Souris



Fig. 1. Comparison of tracheal epithelium from humans (A), guinea pigs (B), rats (C), and mice (D). In the human there are large numbers of ciliated cells and goblet cells, a pattern that is also found in the guinea pig. The rat has scant goblet cells, and the mouse has none. Ciliated cells are common in the rat but are present only in clusters (arrows) in the mouse. Bar = 100 μ m; hematoxylin and eosin (H&E) stain.

Emphysème

Humain

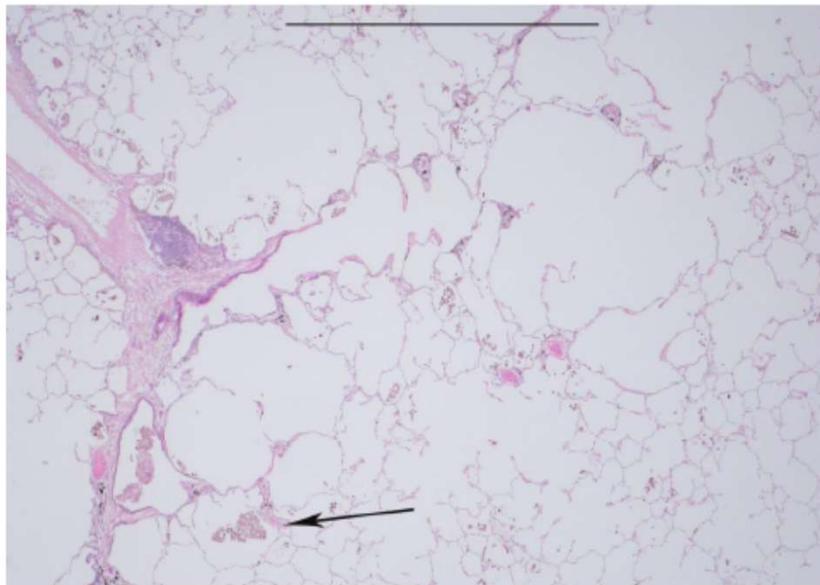


Fig. 5. Example of centriacinar emphysema in a human. Note that the respiratory bronchiole and alveolar duct complex is distorted and destroyed. Aggregates of pigmented alveolar macrophages can be found (arrow). Bar = 1,000 μm ; H&E stain.

Cochon d'inde

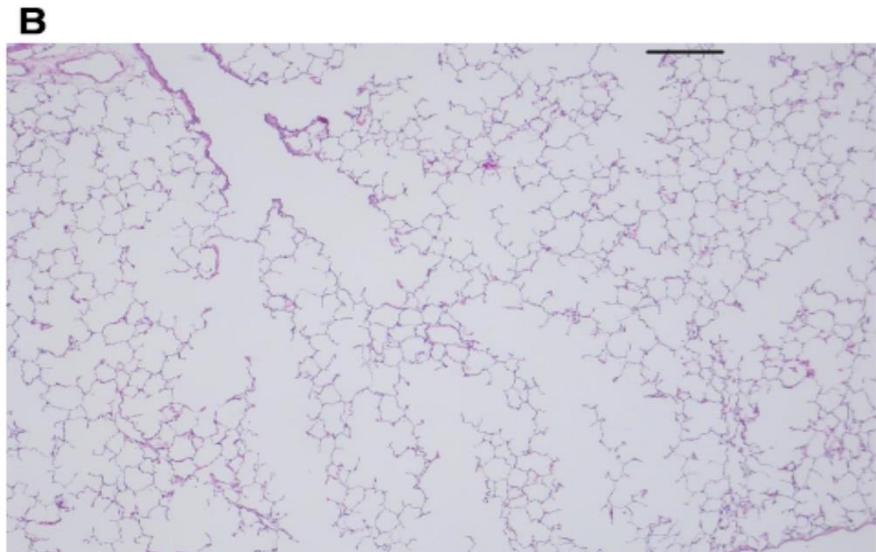
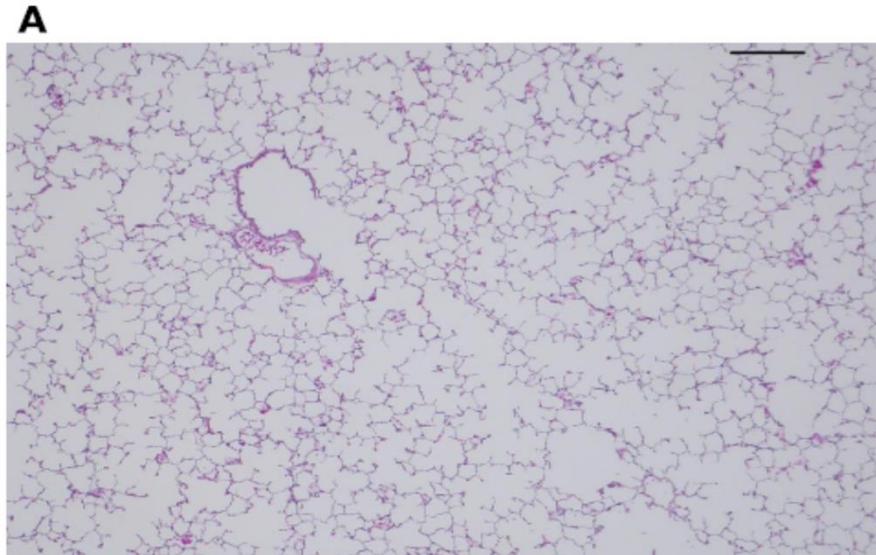


Fig. 6. Example of a guinea pig emphysema model induced by exposure to cigarette smoke for 6 mo. *A* shows a representative control lung, whereas *B* shows a representative smoke-exposed lung with an overall increase in air space size of $\sim 43\%$. Bar = 200 μm ; H&E stain.

Les modèles animaux (d'emphysème) de BPCO:

| Elastase 1975-85 Protéases /antiprotéases | Jeûne 1980-1985 Tr. croissance et réparation pulmonaire | LPS 2000-2005 Inflammation: E+remodelage VA | Apoptose 2000-2005 Caspase |
|--|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Modèle court-terme • Progressif • Sévérité de l'E. dose dépendante • Peu coûteux | <ul style="list-style-type: none"> • Modèle court-terme • Emphysème | <p>Modèle à court terme Remodelage bronchique et emphysème Cascade inflammatoire PNN, CD4, TNFα, IL-1β, MMP9-12...</p> <p>Mime les exacerbations aiguës</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Modèle court-terme • Induit un élargissement (transitoire) des VA (Emphysème?) et remodelage vasculaire |
| <ul style="list-style-type: none"> • Dépend du choix de l'enzyme, dose, de l'espèce animale, âge • Pas comparable aux modèles induits par FC | <ul style="list-style-type: none"> • Troubles de la croissance pulmonaire et de la réparation tissulaire > Emphysème • Ethique (perte de 45% du poids) | <p>Infiltrats inflammatoires non identique à celle induite par la FC</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Pas de remodelage des VA • Apoptose présente dans E. humain sévère, mais pas sur modèle animal exposé à la FC |

Les modèles animaux de BPCO induits par FC:

| Modèles induits par la FC (2006-) | Modèles transgéniques et KO (souris) |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Reproduit des lésions comparables aux humains: Inflammation, emphysème, remodelage des VA, remodelage cardio vasculaire, cachexie, perte de masse musculaire...• Altérations fonctionnelles respiratoires comparables aux humains | <ul style="list-style-type: none">• Etude de processus pathogéniques moléculaires spécifiques (gène/protéine)• Susceptibilité plus grande de certaines espèces au développement de la BPCO |
| <ul style="list-style-type: none">• Exposition de 3 à 6 mois (coût, temps)• Hypersécrétion et remodelage petites VA sont limités chez souris• Sévérité moindre (GOLD I ou II)• Evolution de la maladie stoppée avec l'arrêt de l'exposition | <ul style="list-style-type: none">• Interactions du modèle génétique avec le développement pulmonaire, ou effet de vieillissement accéléré |

Méthodologie Expérimentale

Mode d'administration fumée cigarette

Exposition
corps entier

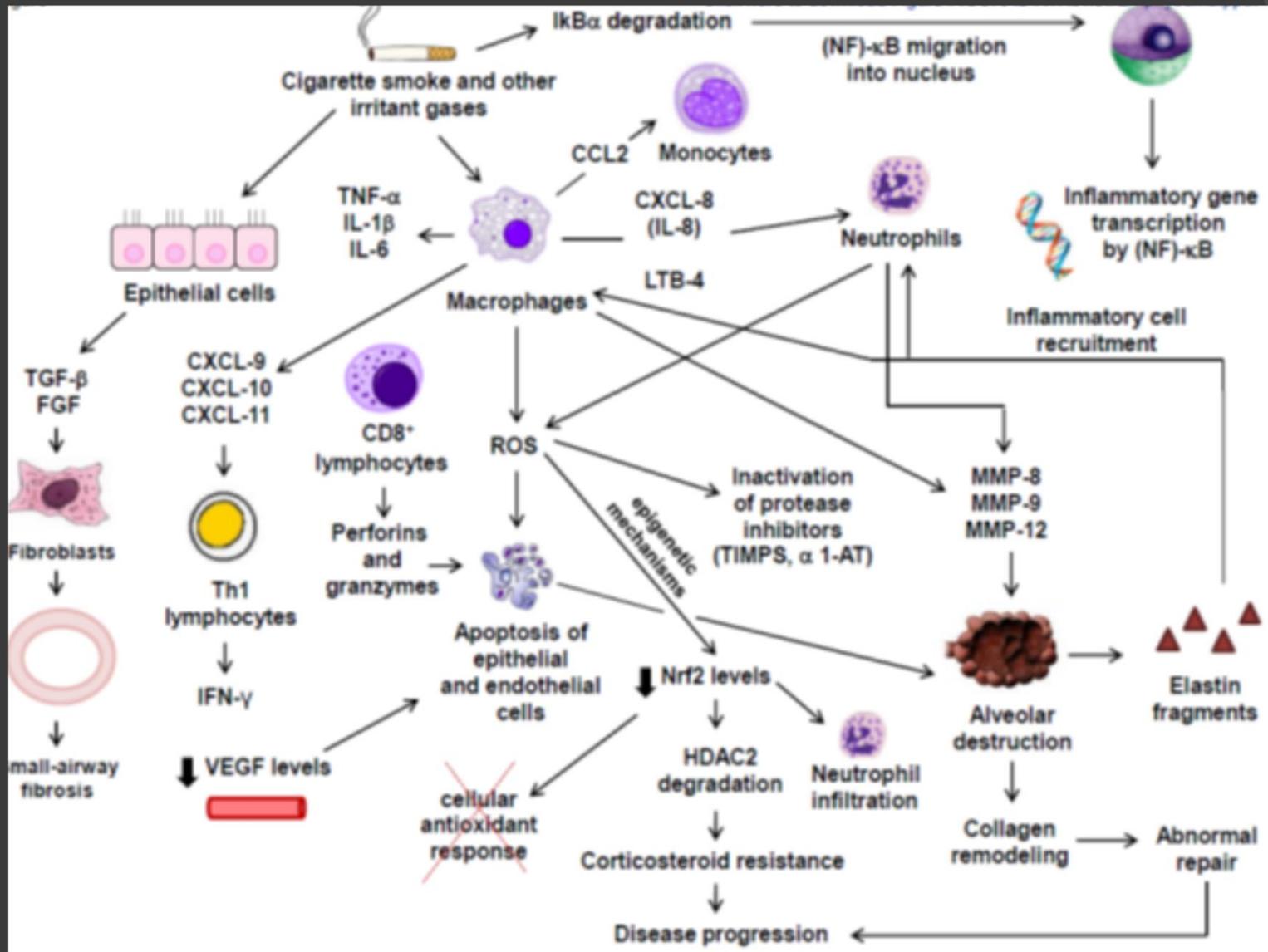


Exposition
nasale seule

Méthodes d'exposition

- Chambres d'exposition standardisées ou non (chambre de Teague 1994)
- Marque de la cigarette utilisée (Kentucky University, Virginia ...)
 - [Particules suspendues / particules totales] mg/m³
 - [Nicotine] mg/m³
 - [CO] ppm
- Dose, horaire et durée d'exposition
 - Aigue ou chronique
 - Nb de jours d'exposition par semaine
 - Nb de cigarettes par jour
 - Nb de bouffées par cigarette
 - Durée d'exposition par jour

Physiopathologie de la BPCO



Apports des modèles animaux aux
connaissances sur les mécanismes
lésionnels induits par la FC dans la
BPCO

Aging and Cigarette Smoke: Fueling the Fire

RUBIN M. TUDER, M.D. AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE VOL 174 2006

- Souris « Klotho déficientes » (protéine anti-âge) développent précocement un emphysème via MMP-9>TIMP
 - La fragmentation de l'élastine alvéolaire chez la souris âgée favorise l'apoptose par activation de la NE et la formation d'emphysème
 - Diminution naturelle de (SMP)-30 chez le rat âgé le rend plus vulnérable aux dommages septaux alvéolaires induits par la FC
 - Souris KO (SMP)-30: la FC induit une ↑ du stress oxydant et une ↓ de l'activité des anti-protéases
 - Chez la souris, la FC induit une accélération de la sénescence des fibroblastes, impliqués dans la réparation tissulaire
- ➡ Age et BPCO partagent et potentialisent des mécanismes pathogéniques communs, par défaillance dans le maintien et la réparation tissulaire

Funada Y et al. Kobe J Med Sci 2004;50:59-67

Sato T et al Am J Respir Crit Care Med 2006;174:530-7

Rubin M. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:490-1

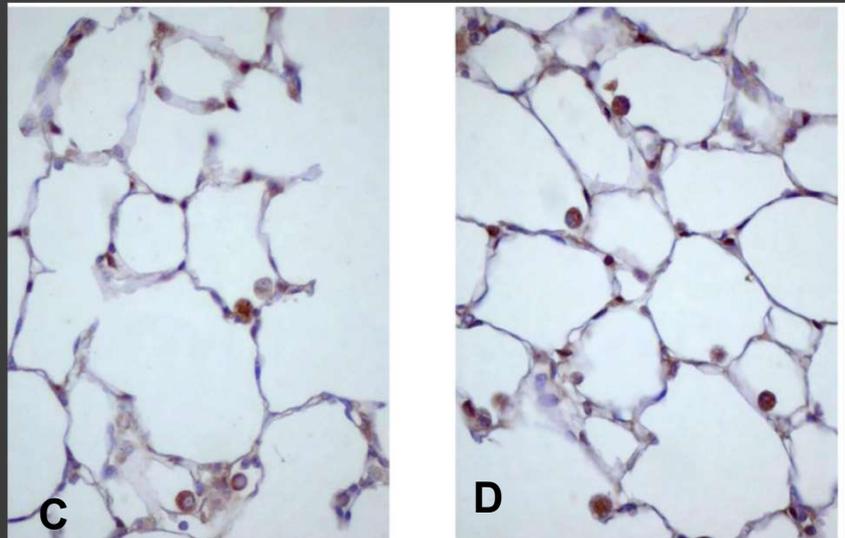
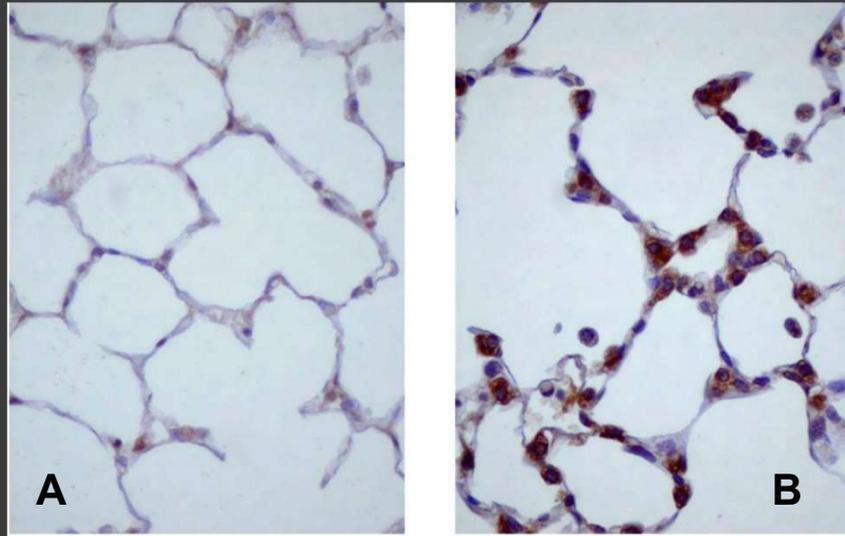
Chung KF et al Eur Respir J 2008; 31:1334-1356

Botelho F et al Plos ONE 2011; 6 (12):e28457

Modèle animal de stress oxydant et BPCO

| | | | |
|---------------|---|--|--|
| RONS | Inflammation broncho pulmonaire, emphysème | Souris transgéniques SOD (surexpression) Souris SOD ^{-/-} | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Foronjy et al. AJRCCM 2006;174:530-7</i> • <i>Seimetz et al Cell 2011;14:147(2):293-305</i> |
| iNOS | Inflammation, emphysème, HTAP | Souris iNOS ^{-/-} , inhibiteur iNOS | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Seimetz et al Cell 2011;14:147(2):293-305</i> |
| Gpx-1 Nrf2 | Suppression inflammation, stress oxydant, emphysème, HTAP | Gpx-1 ^{-/-} Nrf2 ^{-/-} , Nrf2 activateur | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rangasamy et al J Clin Invest 2004;114:1248-59</i> • <i>Duong et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2010;299:L425-33</i> • <i>Susan et al Proc Natl Acad Sci USA 2009;6:106:250-5</i> |

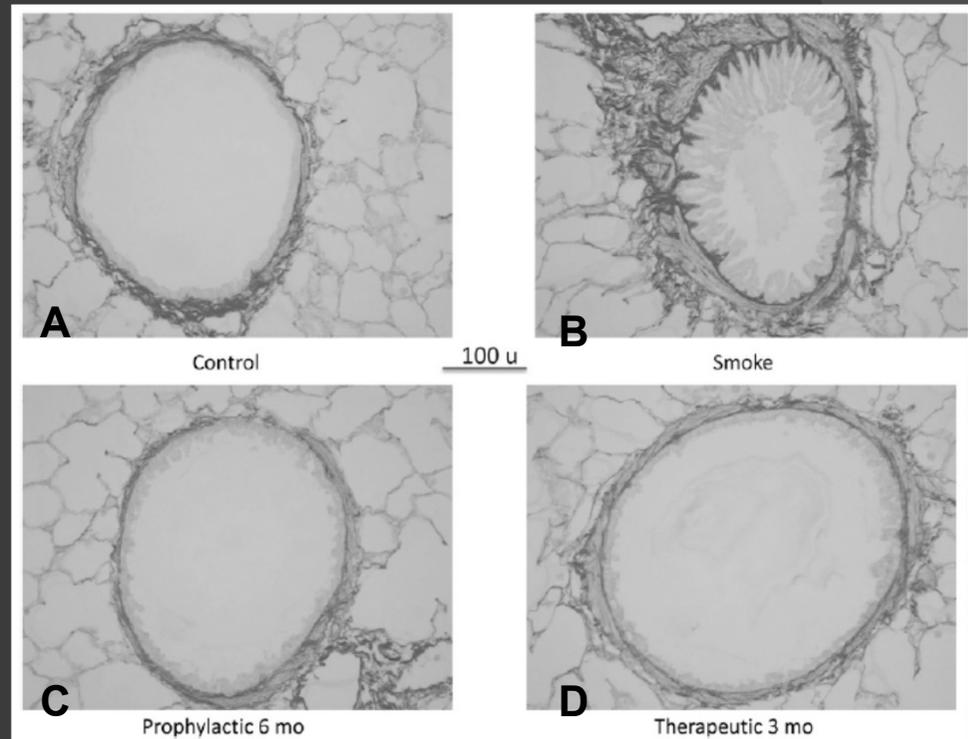
MPO et inhibiteur de MPO



Alvéoles
coloration immunohistochimique du marqueur de
stress oxidant dityrosine

Cochon d'Inde

A: Témoin; B: exposition FC /6 mois (5j/sem);
C: FC+AZ1 préventif J-1; D: FC+AZ1 curatif au
3è mois



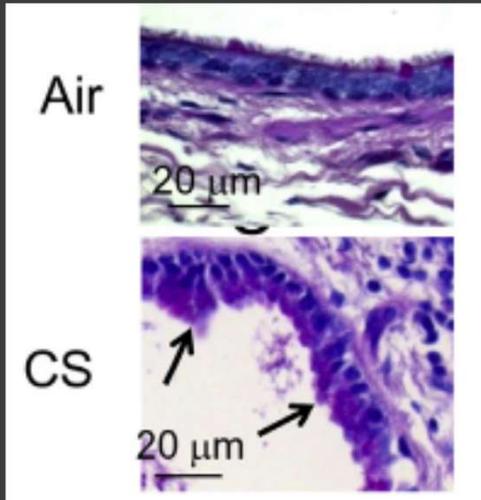
Remodelage Bronchiolaire

Churg et al Am J Respir Crit Care Med 2012;185:34-43

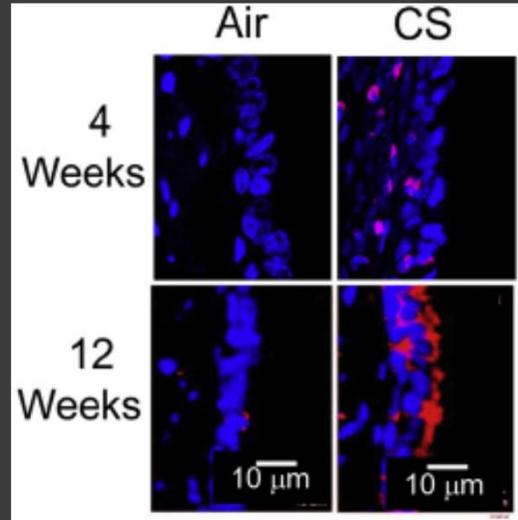
Modèle animal de l'inflammation pulmonaire

- Femelles macaques; 11 ans d'âge moyen
- Exposition à la FC,
 - corps entier,
 - 6h/j, 5j/ semaine
 - [250mg/m³] de particules suspendues totales
 - Equivalent à 1,8 à 4 p/j chez l'homme
- 4 groupes (n=8 dans chaque groupe)
 - FC/4 semaines vs air
 - FC/12 semaines vs air
 - Tissu pulmonaire obtenu par nécropsie

Métaplasie cellules à gobelet, remodelage bronchique et vasculaire



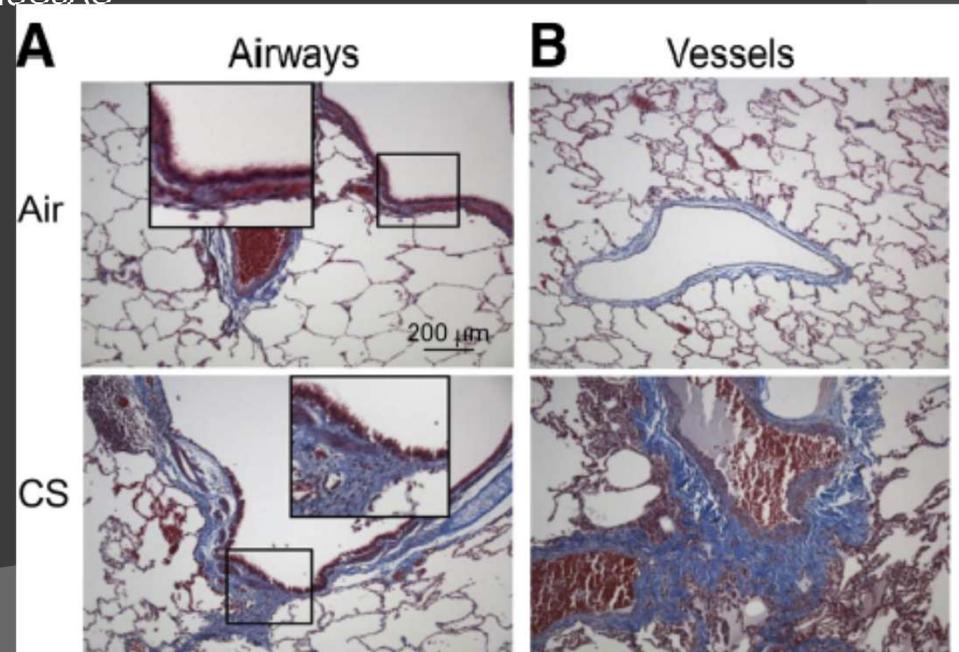
Coloration acide périodique de Schiff



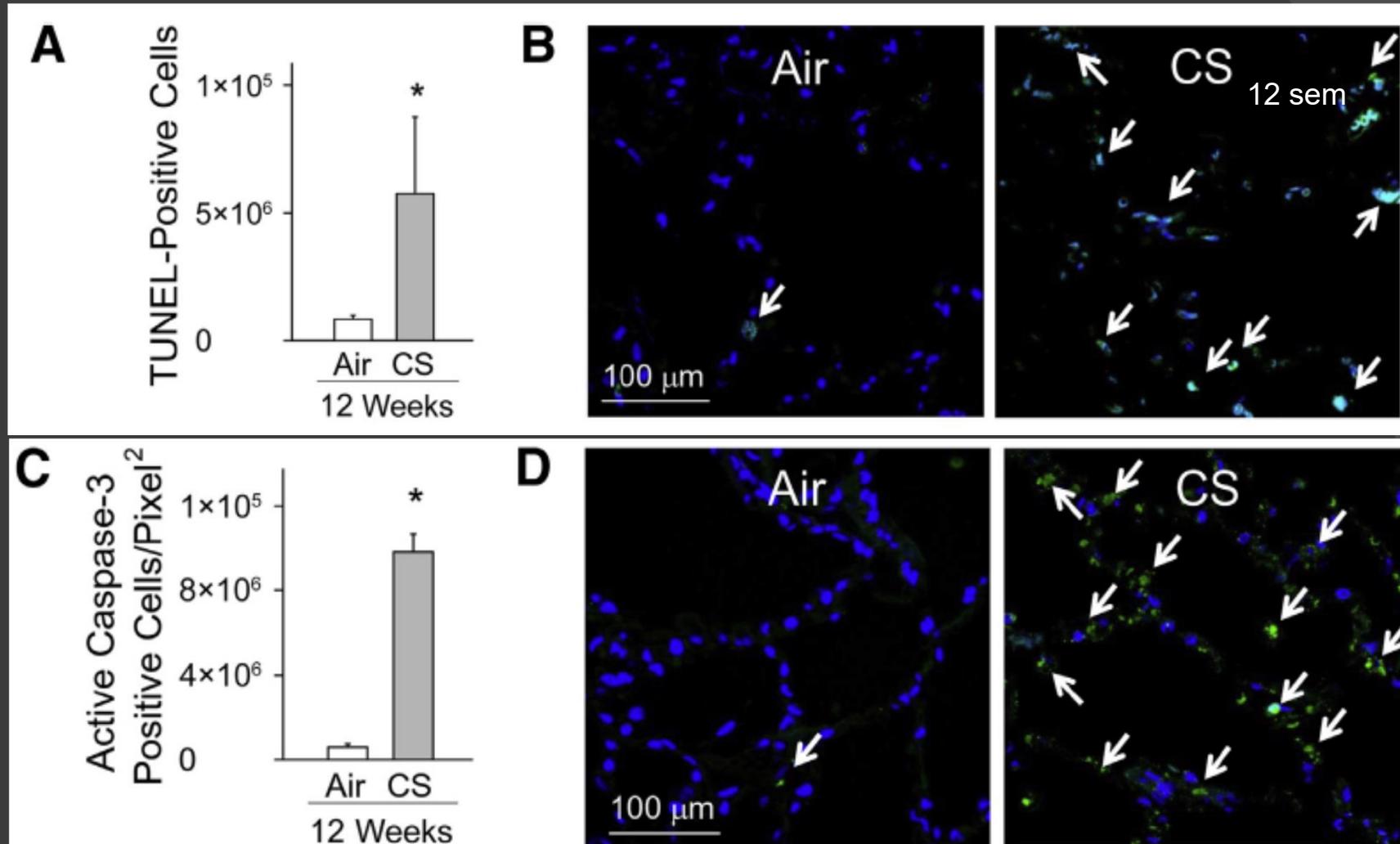
Immunofluorescence MUC5AC

Muqueuse bronchique

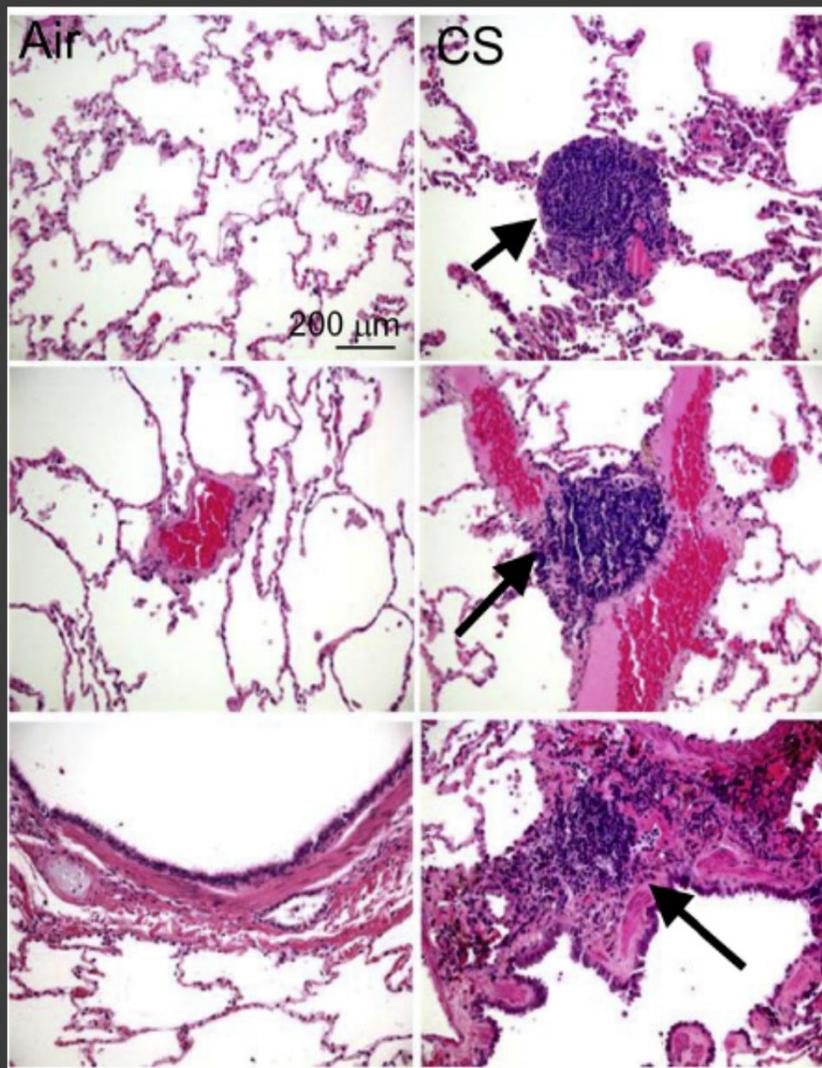
Coloration trichrome de Masson du collagène de la matrice extracellulaire



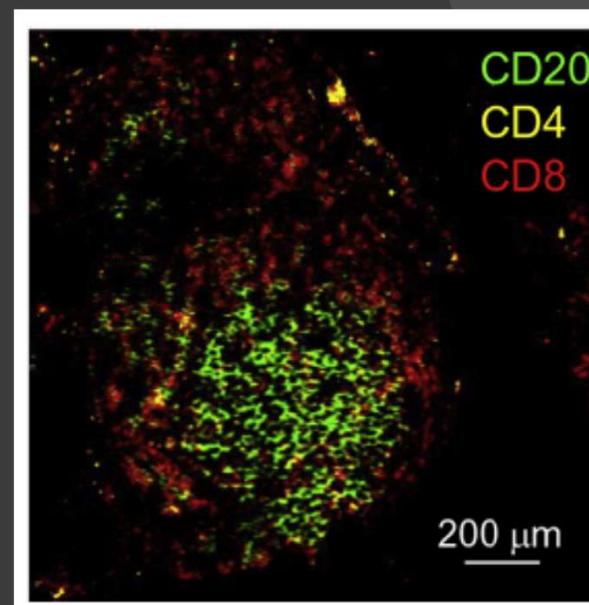
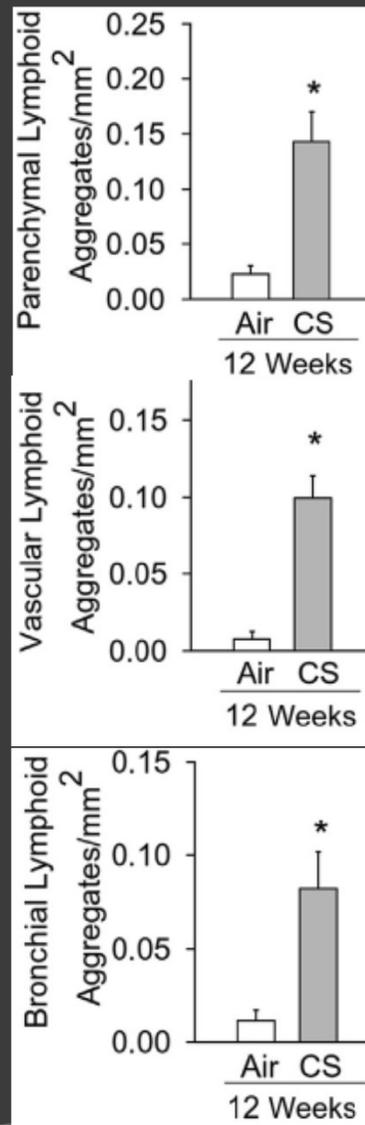
Apoptose des cellules alvéolaires



Les follicules lymphoïdes



Coloration hématoxyline



Marquage immunofluorescence LB (vert), CD4 et CD8

Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component?

A Agustí, W MacNee, K Donaldson, M Cosio

Thorax 2003;58:832–834

- Corrélation entre la sévérité de la maladie et l'activation lymphocytaire et le nombre de CD8+ pulmonaires (*Maeno et al. J Immunol* 2007;178:8090-6)
- CD4+ sang de patients BPCO sont activés par des fragments d'élastine (*Lee et al Nat Med* 2007;13:267-9)
- Autoanticorps anti-élastine, anti-épithélial, anti-endothélial, anti-muscle lisse chez des patients BPCO
- Prolifération oligoclonale de CD8+ persiste après arrêt d'exposition à la FC chez la souris (*Motz GT et al. J Immunol.* 2008; 181:8036–804)
- Le transfert de LT de poumons de souris exposées à la FC à des souris naïves, Rag2^{-/-} (absence de LB et T) causent une pathologie BPCO-like, témoin d'une réponse auto-immune contre le tissu pulmonaire (*Motz GT et al. Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(11):1223-33)
- Les CD4+ pulmonaires de souris exposées à la FC/6 mois expriment un phénotype Th1 et Th17 (*Eppert et al. J Immunol* 2013;190(3):1331-40)

Modèles de comorbidités systemiques

Modèle de dénutrition

Souris Balb/c, âge 6 semaines,
3 gpes control vs 4sem exposition FC vs pair feed

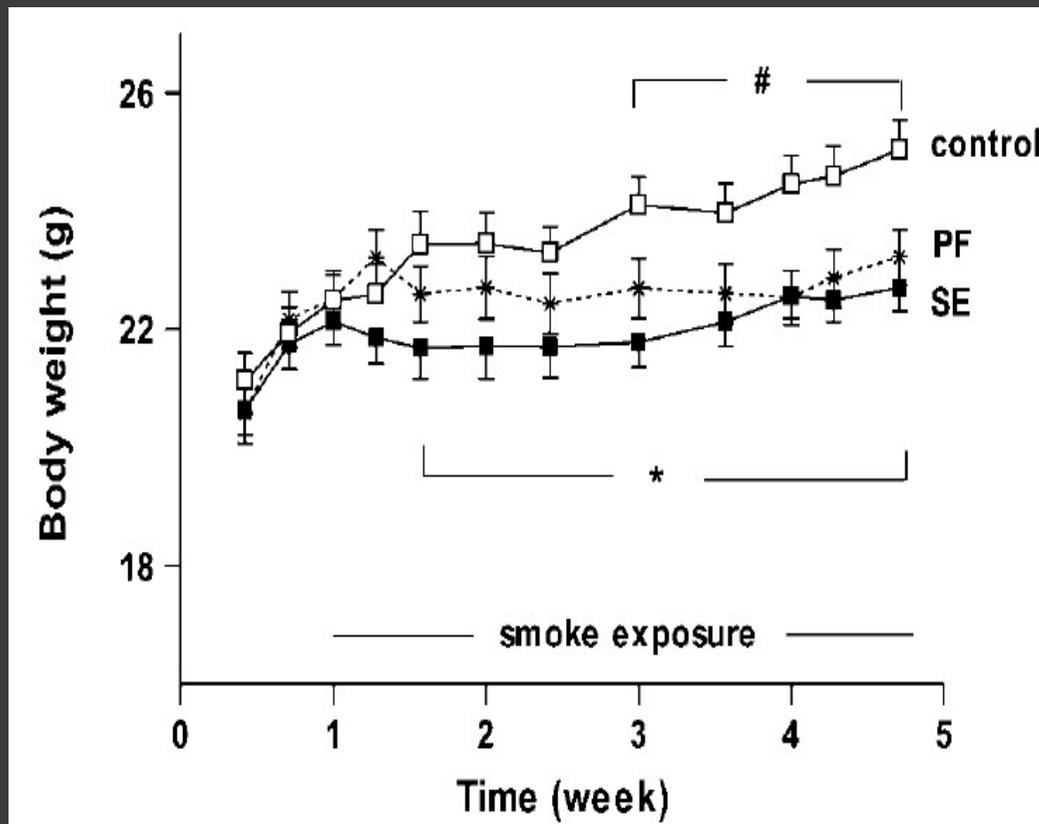


Figure 1. Body weight of control (white squares; $n = 12$), smoke-exposed (SE; solid squares; $n = 12$), and pair-fed (PF) groups (asterisks; $n = 12$) during the experimental period. Results are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures. *SE group significantly different from control group, $p < 0.05$; #PF group significantly different from control group, $p < 0.05$.

- Diminution des apports + Effet catabolique
- Déplétion de la masse maigre et masse grasse (tissu adipeux brun)
- Diminution de la leptine et neuropeptide Y orexigène

Modèle de l'atteinte musculaire

- Chez la souris exposée à la FC/4-6 mois, sont observées une diminution de:
 - Masse musculaire des membres (gastrocnemius, tibialis anterior)
 - De l'index de force musculaire
 - L'endurance aérobie, et de la tolérance à l'exercice
 - De la proportion de fibres oxydatives
 - De la capillarisation des fibres musculaires striées
 - De modifications dans l'expression mRNA associés à la régulation de la masse musculaire (IGF-1, atrogin-1, IL-6)

Chen H et al. AJRCCM 2006;173:1248-54

Gosker H et al AJRCMB 2009;40:710-6

Vlahos R, Bozinovski S. Clin Sci 2014;126:253-65

Modèle de comorbidités cardiovasculaires

- Souris exposées à la FC pendant 5 à 8 semaines
 - Augmentation du volume et de la masse cardiaque
 - Elargissement du diamètre de fin de systole et diastole
 - Diminution de la fonction contractile des cardiomyocytes
 - Lésions de fibrose myocardique, apoptose et lésions mitochondriales
 - HTA, dysfonction endothéliale et remodelage cardiaque
 - HTAP, Défaillance de la fonction diastolique et systolique et de la contractilité du VD
- Facteurs protecteurs
 - Anti-oxydants
 - Statines
 - Antagonistes angiotensine II

Hu N et al. PloS One 2013;8:e57151

Sussan T et al Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:250-5

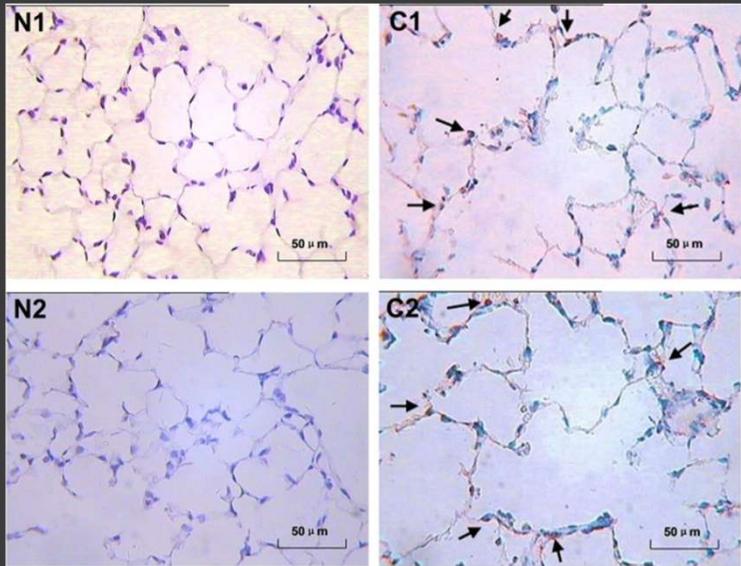
Talukder M et al Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011:H388-96

Podowski M Et al J Clin Invest 2012;122:229-40

Wright JL et al. Am J Respir Crit Care Med 2011;183:50-8

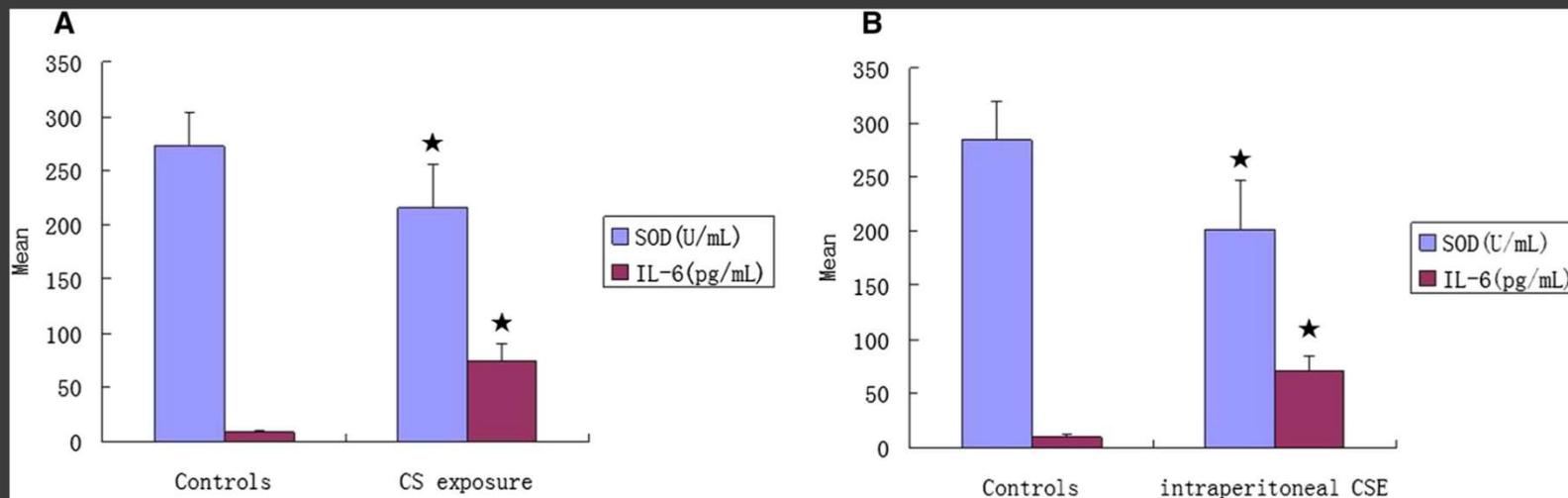
Vlahos R Bozinovski. S Clin Sci 2014;126:253-65

BPCO: maladie à point de départ pulmonaire?



He et al. Tobacco Induced Diseases (2015)

Apoptosis of alveolar septum cells in C57BL/6 J mice induced by CS exposure (C1) and that induced by intraperitoneal injection of CSE (C2) ($\times 400$)



SOD and IL-6 concentrations in serum of C57BL/6 J mice induced by CS exposure (A) and that induced by intraperitoneal injection of CSE (B).

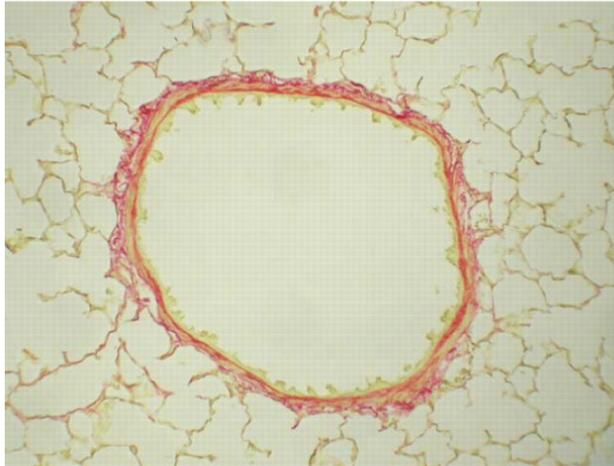
CONCLUSION

- BPCO est une maladie
 - hétérogène pour une expression phénotypique donnée
 - Poly-phénotypique avec des manifestations respiratoires et systémiques
- Pas de modèle animal parfait pour la BPCO,
- Modèle à définir en fonction des objectifs de la recherche et des essais thérapeutiques
- Cultures cellulaires

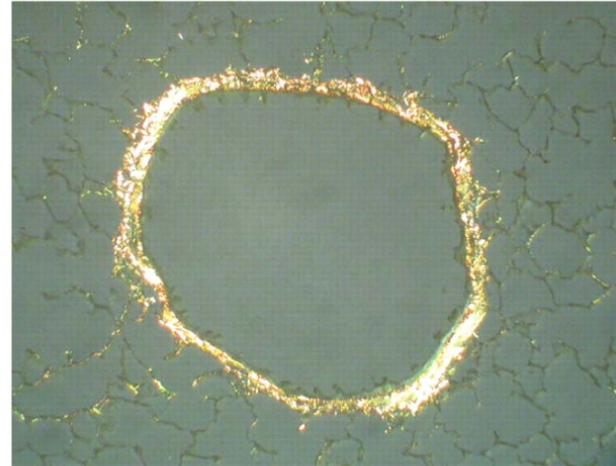
- Les mécanismes de défense impliqués contre la fumée de cigarette sont nombreux à être impactés simultanément, et les réponses « sur-adaptées »?
- La meilleure défense contre la BPCO reste **encore et pour longtemps** l'AIDE AU SEVRAGE TABAGIQUE

Small airway remodeling in guinea pigs.

A



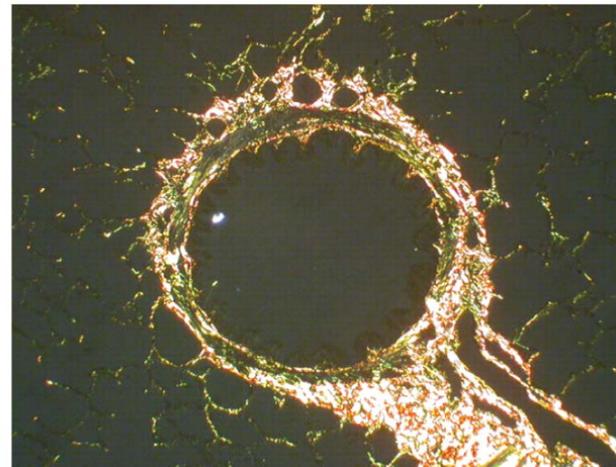
B



C



D

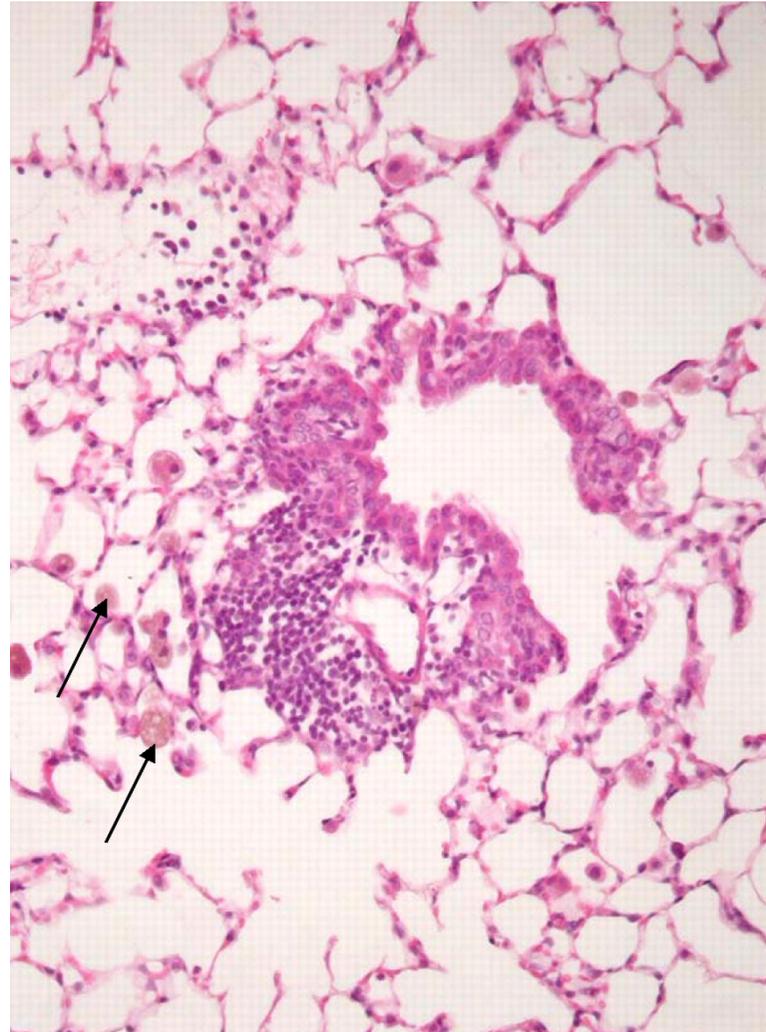


Andrew Churg et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*
2008;294:L612-L631

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY

Lung Cellular and Molecular Physiology

Peribronchiolar lymphoid aggregate in a mouse exposed to smoke for 6 mo.

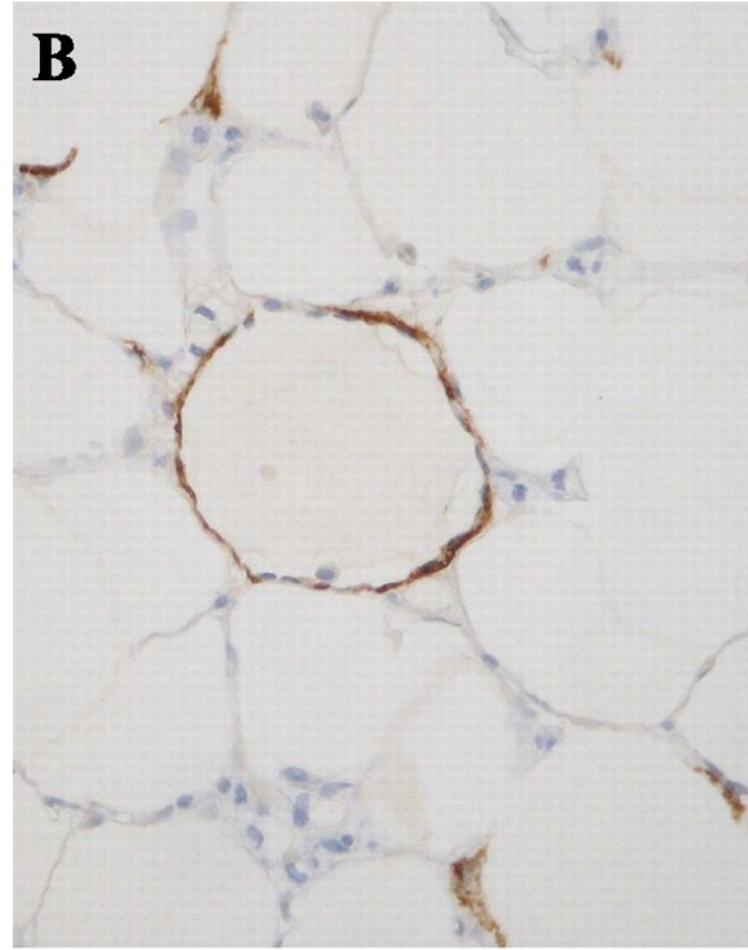
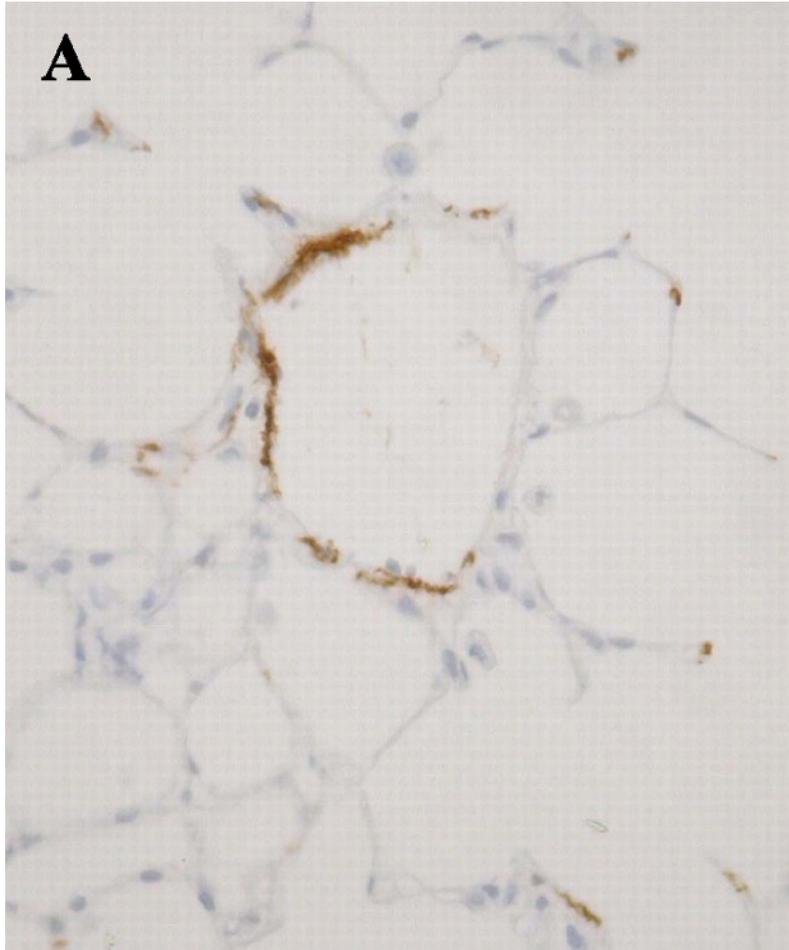


**Andrew Churg et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol
2008;294:L612-L631**

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY

Lung Cellular and Molecular Physiology

Vascular remodeling.



Andrew Churg et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol
2008;294:L612-L631

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
Lung Cellular and Molecular Physiology