

Mémoire de Maîtrise en médecine No 5700

Analyse des altérations morphologiques du poumon suite à l'inactivation du gène de la Tenascine C (*TNC*) chez la souris âgée

Etudiante

Chabenet Farah

Tuteur

Prof Matthias Roth-Kleiner

Service de néonatalogie, CHUV

Co-tutrice

Responsable de recherche Dre Sandrine Gremlich

Service de néonatalogie, CHUV

Expert

Dre Isabelle Rochat Guignard, médecin associée

Département femme-mère-enfant, CHUV

Lausanne, 15 décembre 2018

1 Table des matières

1	TABLE DES MATIÈRES	2
2	REMERCIEMENTS	3
3	ABSTRACT	4
4	ABRÉVIATIONS	6
5	INTRODUCTION	8
5.1	DÉVELOPPEMENT PULMONAIRE.....	8
5.2	LA PROTÉINE TNC	11
5.3	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE MAÎTRISE	14
6	MATÉRIEL ET MÉTHODE	15
6.1	ANIMAUX	15
6.2	PRÉPARATION DES TISSUS ET COLORATION HÉMATOXYLINE ET EOSINE (H&E) :	15
6.3	PRISE DE PHOTOS DES LOBES PULMONAIRES	18
6.4	ANALYSE STÉRÉOLOGIQUE.....	21
6.5	STATISTIQUES :	25
7	RÉSULTATS	26
8	DISCUSSION	29
9	CONCLUSION	33
10	BIBLIOGRAPHIE	34

2 Remerciements

Premièrement, je souhaite remercier les Dres **Tiziana Cremona** et **Sandrine Gremlich** pour m'avoir soutenue tout au long de cette étude, avoir supporté mes doutes et m'avoir apporté tout leur savoir sur le sujet et les compétences nécessaires pour mener à terme ce travail. Je n'aurais jamais vu le bout sans vous, merci de votre patience et épaullement dès les premiers instants à Berne, tout cela aurait été moins facile sans votre précieuse aide.

Je tiens aussi à remercier **Eveline Yao**, qui a su répondre à toutes nos questions dans les moments plus stressants et qui a rendu l'organisation plus facile entre Lausanne et Berne lorsque cela était nécessaire.

Tous mes remerciements pour la **Dre Isabelle Rochat Guignard** qui a accepté d'être l'experte qui évaluera ce Travail de Maîtrise, j'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

Je voudrais aussi remercier mes amis et ma famille qui n'ont eu de cesse de m'écouter dans les moments de doutes et de remises perpétuelles en question de ce travail. Merci à **Dina** et **Olivier**, j'espère que mes monologues ne vous ont pas trop usés. Tout particulièrement, merci à **Diane**, qui m'a soutenu tout le long et a corrigé les fautes d'orthographe de ce travail.

Pour terminer, un remerciement tout particulier pour mon tuteur, **Dr Matthias Roth-Kleiner**, qui m'a accepté les bras ouverts dans son groupe de recherche. Merci infiniment, sans vous je ne me serais pas engagée dans une telle expérience, qui m'a énormément appris et apporté. Ce fut un plaisir de faire ce Travail de Maîtrise sous votre supervision.

3 Abstract

La protéine tenascine C (TNC) est une glycoprotéine multifonctionnelle de la matrice extracellulaire. Dans le poumon, son expression est très élevée durant la phase d'organogenèse, puis elle s'arrête et n'augmente par la suite que lors de lésions ou d'épisodes inflammatoires, au cours desquels elle participe à la réparation tissulaire. Dans des études menées précédemment sur des souris nouveau-nées, déficientes en TNC, la protéine a été reconnue comme ayant une fonction dans la morphogenèse de l'arbre bronchique. En effet, sa présence favorise la formation de branchements et donc la subdivision des voies respiratoires. Elle est aussi impliquée dans les deux phases de l'alvéolarisation, jouant un rôle synergique avec l'élastine. Il a été également montré que parallèlement aux modifications morphologiques observées, l'inactivation du gène TNC entraînait des modifications fonctionnelles du poumon visibles à la naissance et persistantes à l'âge adulte. Dans le cadre de ce travail de maîtrise, il s'agit de mieux comprendre le rôle de la TNC dans le processus d'« aging » pulmonaire, impliquant habituellement une diminution du volume pulmonaire ainsi qu'une diminution de la surface d'échanges gazeux (1).

Pour ce faire, nous disposons de souris âgées (1.5 ans), déficientes en TNC (souris knockout : KO) et de souris « contrôle » (souris wild type : WT).

La préparation des tissus pulmonaires se fait premièrement par la fixation de ceux-ci dans de la paraformaldéhyde 4%. Une inclusion dans de la paraffine est nécessaire pour faire des coupes histologiques. Dans un second temps, des sections régulières du lobe pulmonaire sont obtenues grâce à la méthode de Cavalieri. La coloration choisie pour ce projet est l'hématoxyline et l'éosine, qui met en évidence les structures tissulaires. Des prises de vues sériées des sections pulmonaires sont faites, permettant ainsi l'analyse stéréologique des tissus (ici, volume du parenchyme, surface et volume des septa).

Au cours de cette étude, il a été démontré que les souris TNC KO ont un plus grand volume pulmonaire ainsi qu'une plus grande surface de septa et, par extension, une plus grande surface d'échanges aériens que les souris WT. Ces résultats vont à l'encontre de l'évolution naturelle du poumon avec l'âge. Chez des souris âgées, une diminution de l'ensemble des fonctions pulmonaires citées ci-dessus est attendue. En comparaison avec les souris WT, les souris TNC KO ont donc un avantage, du point de vue morphométrique, pour la survie lors du processus



UNIL | Université de Lausanne

Faculté de biologie
et de médecine

d'« aging ». Ces résultats peuvent avoir un impact important dans la majorité des maladies pulmonaires chroniques touchant l'homme, qui accélèrent, pour la plupart, le vieillissement du poumon.

4 Abréviations

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

CV : Capacité Vitale

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

Dex : Dexaméthasone

FGF : Fibroblast Growth Factor

H&E : Hématoxyline et Eosine

H₂O : Eau

IL-6 : Interleukine-6

IL-1 β : Interleukine-1 β

KGF : Keratinocyte Growth Factor

KO : Knockout

L_m : Mean linear intercept

NGF : Nerve Growth Factor

PEEP : Positive End-Expiratory Pressure

PFA : Paraformaldéhyde



UNIL | Université de Lausanne

Faculté de biologie
et de médecine

SMA : Smooth Muscle Actin

TGF-beta : Transforming Growth Factor-bêta

TNC : Tenascin C

TNF-alpha : Tumor Necrosis Factor alpha

VEMS : Volume Expiratoire Maximal en une Seconde

VC : Volume courant

VR : Volume Résiduel

WT : Wild-type

5 Introduction

5.1 Développement pulmonaire

Les poumons sont les organes clefs de la respiration. En effet, ils permettent des échanges gazeux entre l'air inspiré et notre organisme. Pour que cela se fasse, le développement pulmonaire assure la croissance d'une barrière entre l'air que nos poumons emmagasinent durant l'inspiration et le sang. Elle est capable d'approvisionner l'organisme en oxygène, lors de l'inspiration, et de débarrasser le corps du dioxyde de carbone dont il n'a pas besoin (2), lors de l'expiration. On la nomme la barrière alvéolo-capillaire. Pour une diffusion optimale, les propriétés structurelles du poumon assurent, via les alvéoles, une large surface d'échanges gazeux avec une barrière qui doit être la plus fine possible (3). Les alvéoles sont les unités fonctionnelles du poumon et sont délimitées par les septa interalvéolaires. L'air passe à travers les alvéoles pulmonaires, qui sont composées d'un épithélium simple, reposant sur sa fine membrane basale, et de l'endothélium des capillaires pulmonaires. Chez l'homme, deux sortes de cellules composent principalement cet épithélium monostratifié ; les cellules épithéliales, ou pneumocytes, I et II (4).

Les cellules épithéliales I recouvrent environ 95% de la surface de l'épithélium alvéolaire. Ce sont des petites cellules aplaties, réunies par des jonctions cellulaires, qui jouent sans doute un rôle dans la cohésion de la barrière anatomique et les mouvements des échanges gazeux au sein du poumon (5). Pour ce qui est des cellules épithéliales II, elles ne couvrent que 5% de la surface de l'épithélium mais sont plus nombreuses. Leur rôle métabolique est plus connu, elles sont indispensables à la fabrication du surfactant, au transport des électrolytes et participent à la prolifération et réparation des structures composant les alvéoles (5).

Le développement pulmonaire est donc primordial et consiste en plusieurs étapes charnières pour assurer un fonctionnement respiratoire optimal. Il se divise en cinq phases principales, communes aux rongeurs et aux hommes : la phase embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire, qui sont les phases prénatales et pour terminer la phase alvéolaire qui intervient durant la vie fœtale et surtout en postnatal. Durant ces phases, deux grandes étapes sont décrites dans la littérature, qui sont aussi similaires chez les rongeurs et les humains : la

morphogénèse bronchique qui implique des cycles de « bourgeonnements » et la septation des alvéoles pulmonaires, ou « alvéolarisation ».

Ce que l'on appelle premièrement le bourgeonnement, peut être décrit comme une invasion des bourgeons terminaux dans le mésenchyme pulmonaire environnant. Ce processus permet l'expansion des voies aériennes et la croissance d'autres bourgeons terminaux (2).

Cette étape est décrite dès la phase embryonnaire. En effet, l'ébauche des poumons primaires se développe à partir d'une évagination ventrale de l'endoderme de l'intestin antérieur (6), même processus chez l'humain et les rongeurs. Elle débute dans le courant de la 4^{ème} semaine de grossesse chez l'humain (pour les souris : Jour embryonnaire 9.5 à 12 ; E9.5-E12). La formation d'un septum longitudinal va séparer la trachée de l'œsophage tandis que les deux bourgeons ventraux (ou bourgeons primaires) qui donneront les poumons se forment à partir de l'extrémité postérieure de la trachée. Chez la souris, le côté droit va donner quatre lobes, nommés supérieur, moyen, inférieur et cardiaque, tandis que le côté gauche donne un lobe unique. Chez l'humain, le poumon droit sera trilobé et le gauche bilobé, on parle de croissance dichotomique. Par la suite, durant la phase pseudoglandulaire qui prend place entre la 5^{ème} et 17^{ème} semaine post-conception chez l'humain (pour la souris ; E12-E16.5), l'arbre bronchique subit son pic de bourgeonnement avec 14 cycles de ramifications. Ces cycles permettent la formation des bronchioles terminales. C'est au niveau de ces nouvelles bronchioles terminales qu'apparaissent les pneumocytes II (6). Dans la phase suivante, la phase canaliculaire, allant de la 16^{ème} à la 26^{ème} semaine chez l'humain (pour la souris ; E16.5-E17.5), les bronchioles terminales vont subir à nouveau le processus de bourgeonnement pour donner deux ou plusieurs bronchioles respiratoires. C'est à ce moment-là que l'on voit aussi les capillaires pulmonaires se former, qui entreront par la suite en contact rapproché avec l'épithélium pulmonaire simple. En effet, le mésenchyme qui entoure l'acinus commence petit à petit à être envahi par un réseau vasculaire. C'est le début du développement de la barrière alvéolo-capillaire. A ce stade, les cellules épithéliales de type II commencent à sécréter le premier surfactant. Le stade sacculaire, débutant durant la 24^{ème} semaine jusqu'à la 38^{ème} semaine post-conception chez l'humain (pour la souris ; E17.5-P4), se distingue par la

division des bronchioles respiratoires pour donner des alvéoles primitives ou, ce que l'on nomme aussi les sacs terminaux (sacculi). Le mésenchyme environnant commence à s'amincir et l'endoderme se différencie en pneumocytes de types I et II (8). Ces dernières cellules tapissent aussi la paroi lisse des sacs alvéolaires (6). Il a déjà été observé que les premières alvéoles se forment durant la phase sacculaire. Lors de la naissance, le poumon est constitué de la totalité des sacculi séparés par des septa primaires qui dérivent du parenchyme pulmonaire (6).

La deuxième étape décrite dans la littérature est l'alvéolarisation ou septation. Elle prend place durant le stade alvéolaire, qui est biphasique, avec une alvéolarisation précoce et tardive. Durant cette étape, la surface responsable des échanges gazeux va énormément se développer. Il semblerait que le travail synergique des cellules musculaires lisses, de l'élastine et des fibrilles de collagène donne l'énergie nécessaire à ce processus d'alvéolarisation (2).

La plus grande partie de l'alvéolarisation, la phase précoce, se fait durant les premiers mois de vie pour l'homme (9). Avant la naissance, autour de la 36^{ème} semaine, il a été observé que les cellules présentes dans les septa primaires subissent une phase de prolifération qui atteint un pic après la naissance (10). Ce pic (pour les souris ; Jour postnatal 4 ; P4) mène à la formation de nouveaux septa; les septa secondaires (10). Cette croissance des septa permet la subdivision des sacculi ainsi en formant les alvéoles (3). A ce stade, les septa primaires et secondaires qui sont présents dans le poumon sont constitués d'une double couche de capillaires (9). Cette double épaisseur contient du tissu conjonctif avec de l'élastine, faisant le pont entre le réseau vasculaire (10). Le développement des septa secondaires se fait par la croissance centripétale, depuis la périphérie vers le centre de l'espace aérien. C'est un processus qui est très actif durant les 6 premiers mois de vie (pour la souris ; P4-P14) (9) (3). Durant cette phase précoce de l'alvéolarisation, la formation des septa secondaires est si intense que l'expansion des espaces aériens a de la peine à suivre et les alvéoles sont de petites tailles. Passé la première année de vie (pour la souris ; P60), l'alvéolarisation continue mais de manière moins intensive, la formation des alvéoles se retrouve être moins importante et c'est à ce moment-là qu'elles commencent à avoir un volume plus grand et optimal (3). A la fin de la phase d'alvéolarisation tardive, la maturation de la micro-vascularisation pulmonaire est optimale et la double

couche vasculaire fusionne pour n'en former qu'une (3). A partir de cette étape, l'alvéolarisation dans le cadre de développement pulmonaire est considérée comme terminée.

5.2 La protéine TNC

La TNC est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire. Elle est multifonctionnelle mais a un rôle surtout régulateur. C'est une protéine dont l'activité prédomine surtout durant les phases d'organogenèse. Son expression s'estompe petit à petit avec la maturation de l'organisme pour n'être presque plus présente lors de la vie adulte. Son expression se retrouve néanmoins stimulée lors des processus de réparation tissulaire, d'inflammation, durant certains processus de néovascularisation et de tumorigenèse (2). De nombreuses études ont démontré qu'elle était stimulée par des facteurs de croissance tel que le Transforming Growth Factor-bêta (TGF-beta), le Fibroblast Growth Factor (FGF), le Keratinocyte Growth Factor (KGF), et le Nerve Growth Factor (NGF) mais négativement influencée par des glucocorticoïdes, par exemple (2). Elle module l'adhésion des cellules à la fibronectine (2) et a donc un impact sur la prolifération, la migration et la survie cellulaire.

Concernant le rôle de la protéine TNC dans le développement pulmonaire, là encore, plusieurs études ont été menées. Il a été démontré que la protéine TNC avait un impact positif sur les deux étapes principales qui participent à la formation du poumon ; la morphogenèse bronchique et l'alvéolarisation.

Pour ce qui est de la formation de l'arbre bronchique, la protéine TNC est produite par les cellules mésenchymateuses du poumon. Elle se dépose de manière diffuse sur l'épithélium aérien, s'accumule dans la membrane basale et le mésenchyme pulmonaire, et permet une bonne ramification de l'arbre bronchique (2). Il a en effet été objectivé que les fœtus de souris auxquels on injecte de l'anti-sérum TNC ou des fœtus KO pour la tenascine C, finissent par avoir un arbre bronchique simplifié en comparaison avec les fœtus WT. Le développement bronchique n'est donc pas optimal en l'absence de la protéine TNC (7).

La seconde étape principale, l'alvéolarisation, est biphasique ; la phase précoce commençant durant la gestation et la phase tardive continuant après celle-ci. Tout comme d'autres protéines, comme l'élastine, qui se trouve être

présente durant l'alvéolarisation précoce et tardive (3), la protéine TNC a une activité durant ces deux phases pour ensuite voir ses taux chuter (Sonja I. Mund and Johannes C. Schittny, , paper in revision). Il y a longtemps que l'on sait que l'administration de Dexaméthasone (Dex), même pour une durée courte (environ 10 jours), en postnatal (P2 ou P4 chez le rat), avait un impact sur l'alvéolarisation du poumon (11) (12). Il en résultait une complexité du parenchyme pulmonaire plus faible. Une étude datant de 2013 émet l'hypothèse que l'administration de corticostéroïdes postnataux aurait un effet négatif sur l'alvéolarisation par interférence avec certaines protéines de la matrice extracellulaire, dont la protéine TNC. Les résultats de cette étude mettent plusieurs points en lumière : le processus d'alvéolarisation précoce semble prendre place plus tardivement chez les souris traitées avec la Dex car pris aux mêmes stades, les espaces aériens sont moins développés en comparaison aux souris non-traitées. En parallèle, il apparaît aussi que la protéine TNC est exprimée plus tardivement chez les souris traitées avec la Dex, ce qui expliquerait une alvéolarisation précoce plus lente et donc ces espaces aériens moins formés (septa plus fins et alvéoles plus larges) ainsi qu'un début d'alvéolarisation tardive débutant et prenant fin aussi de manière altérée (12). Indirectement, en bloquant momentanément la protéine TNC, la Dex met en lumière le rôle de cette protéine lors des phases précoces et tardives de l'alvéolarisation.

Au cours de ces différentes études menées au sujet de la protéine TNC, elle a été donc reconnue comme ayant un rôle dans la morphogénèse de l'arbre bronchique, favorisant la formation de branchements et donc la subdivision des voies respiratoires, et est également impliquée dans les deux phases de l'alvéolarisation.

Comme tout l'organisme, les poumons connaissent un vieillissement de leurs structures, que l'on nomme souvent dans la littérature « aging pulmonaire ». Le parenchyme pulmonaire et les bronches sont les structures du corps qui subissent les plus fortes pressions partielles d'oxygène de tout notre organisme (1). Les propriétés oxydatives de l'oxygène sont démontrées dans de nombreuses études et ce depuis longtemps. En effet, une exposition trop forte ou chronique à l'oxygène entraîne des lésions tissulaires dans le temps. Mais le parenchyme pulmonaire n'est de loin pas la seule structure respiratoire à connaître les effets du temps. En effet, le déclin respiratoire se fait sur plusieurs tableaux anatomiques et physiologiques. Pour commencer au niveau thoracique, la compliance diminue

avec l'âge ; les personnes âgées peuvent perdre jusqu'à 0.5 cm de taille par an créant ainsi une plus petite cage thoracique (1), les cyphoscolioses dorsales se créent plus fréquemment ainsi que les calcifications des cartilages intercostaux ou encore l'arthrite des articulations costovertébrales. De plus, les muscles responsables de la respiration vont perdre en élasticité avec le temps, ce qui aura pour conséquence additionnelle une augmentation du travail respiratoire et une diminution de l'ampliation thoracique. Au niveau des voies aériennes distales, les bronchioles terminales ont un diamètre qui diminue avec l'« aging » pulmonaire, notamment par perte de leurs attachements avec le parenchyme avoisinant (13). Elles ont tendance à se collaber ce qui crée un piègeage gazeux avec une augmentation du VR (14). Pour ce qui est des bronchioles respiratoires et des canaux alvéolaires ainsi que des alvéoles, leur diamètre augmente. Ce changement géométrique explique la perte d'alvéoles avec l'âge et la diminution de la surface d'échange gazeux (1) (13). Une augmentation de certaines cytokines circulantes telles que l'Interleukine-6 (IL-6), l'Interleukine-1beta (IL-1beta) et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) vont avoir un impact sur la dégénérescence des fibres élastiques et la modification du collagène présents dans le tissu interstitiel (14). Cette perte d'élasticité va créer une diminution des forces de rétraction du parenchyme pulmonaire, celui-ci est donc plus distensible et met plus de temps à retourner à sa position de base après les mouvements respiratoires (13). Avec toutes ces modifications, la masse pulmonaire reste pourtant la même au cours du processus d'« aging » du poumon. Le nombre d'alvéoles diminuant ainsi que la densité capillaire (13), c'est donc un épaississement de la paroi des bronches qui explique cette constatation. Il a été plusieurs fois montré que les volumes pulmonaires mobilisables, qui se trouvent être le volume courant (VC) et la capacité vitale (CV), diminuent lors du vieillissement tandis que la capacité pulmonaire totale reste stable, par augmentation du volume résiduel (VR) justement (13). Ces changements s'opèrent tôt car on observe déjà une diminution de la CV à partir de 20 ans et une diminution progressive du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) s'opère dès 30 ans (1).

Ces changements ont pour conséquence une diminution de la compliance respiratoire et une diminution progressive de la PaO₂ avec l'âge. Une corrélation positive a été démontrée dans une étude entre la diminution de

la PaO₂ et la survie (1). La PaCO₂ en revanche augmente via la mauvaise compliance thoracique, qui ne l'élimine pas correctement.

Du point de vue immunologique, plusieurs observations ont également été faites, qui ont un lien avec le vieillissement pulmonaire (15). On parle d'immunosénescence, qui se traduit autant par des modifications des récepteurs Toll, avec un défaut ou un retard de la réponse à un pathogène, que par un retard de la réponse des cellules dendritiques aux chémokines, ainsi que par une baisse du répertoire des lymphocytes B et une augmentation du pool des lymphocytes T et encore bien d'autres modifications immunes liées à l'âge. Tous ces bouleversements touchant autant l'immunité innée qu'adaptative ont un rôle dans l'apparition plus fréquente d'épisodes d'infections pulmonaires bactériennes ou virales, d'asthme et d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (15). La baisse de l'immunité joue donc un rôle pondérant dans le vieillissement pulmonaire et dans l'apparition de maladies liées à l'âge.

Le rôle de la protéine TNC n'a pas encore été autant mise en avant dans le vieillissement pulmonaire que dans le développement de poumons chez des fœtus TNC KO ou des jeunes souris TNC KO.

5.3 Objectifs du travail de maîtrise

La majorité des études susmentionnées ont mis en évidence le rôle de la protéine TNC dans le développement pulmonaire. En effet, en l'absence de la TNC, le développement du poumon n'est plus optimal et le parenchyme pulmonaire se retrouve grossièrement simplifié.

Dans cette étude, il s'agirait de se pencher sur des poumons plus âgés, et donc sur le rôle de la protéine TNC dans des étapes de vie plus tardives.

Pour ce travail, une analyse stéréologique des poumons de 17 souris, toutes âgées de 1.5 ans, est menée pour comparer les souris déficientes en TNC (KO) et les souris contrôle (WT). Il s'agit ici d'attribuer un potentiel rôle de la protéine TNC dans le processus de vieillissement du poumon.

6 Matériel et méthode

6.1 Animaux

Nous disposons pour cette étude de 3 femelles WT (SV129), 4 mâles WT (SV129), 5 femelles TNC KO et 5 mâles TNC KO. Les souris TNC KO proviennent de l'équipe de Forsberg et al (16).

Elles sont toutes âgées de 1.5 ans.

6.2 Préparation des tissus et coloration Hématoxyline et Eosine (H&E) :

Cette partie de l'étude consiste à préparer les lobes pulmonaires supérieurs droits de nos 17 souris pour pouvoir les étudier par histologie.

Les souris sont anesthésiées, intubées via une canule oro-trachéale et ventilées 10 minutes avec une ventilation conservative (10 ml/kg ; Fréquence respiratoire de 150 /min ; Positive End-Expiratory Pressure (PEEP) à 3 cmH₂O), puis une heure en utilisant un volume courant de 25 ml/kg (60 battements/min ; PEEP à 0 cmH₂O) pour récupérer des données fonctionnelles en niveau basal et lors d'une ventilation mécanique agressive. Par la suite, on récupère les tissus pulmonaires. D'autres souris sont directement sacrifiées pour servir de contrôles non ventilés. Nous utiliserons ces dernières pour les études stéréologiques présentées dans ce travail. Dans les deux cas, la bronche gauche est ensuite ligaturée, le lobe pulmonaire gauche sera utilisé pour la biologie moléculaire tandis que les lobes pulmonaires droits seront utilisés pour l'histologie. Dans notre étude, c'est le lobe pulmonaire supérieur droit qui est étudié.

Pour ce faire, le poumon droit est rempli du paraformaldéhyde (PFA) 4% (permet la fixation des cellules) en utilisant un cathéter trachéal. Une pression hydrostatique de 20 cm H₂O est requise pour obtenir une structure 3D du poumon qui se rapproche le plus possible de sa forme physiologique. En effet, cette pression permet une extension optimale des structures pulmonaires, on atteint ainsi la capacité pulmonaire totale (17). Cette pression est constante pour tous les lobes pulmonaires droits, de façon à avoir une représentation correcte et standardisée

du volume de chacun des lobes, de leurs proportions physiologiques. Le lobe peut être conservé plusieurs jours dans du PFA. Le poumon est maintenant fixé.

A partir de cette étape, le poumon est préparé selon la méthode de Cavalieri. Le lobe entier est coupé en plusieurs sections d'épaisseur équivalente. Selon la taille du lobe, on obtient entre 5 et 7 sections régulières par lobe (Figure 1). Les différentes sections sont disposées sur un même plan et enrobées ainsi dans de la paraffine. Cette méthode permet d'avoir, sur une même lame, une représentation globale de tout le poumon, à travers différentes sections du même poumon (Figure 2) ; c'est-à-dire autant la distribution des bronchioles et alvéoles de la partie la plus distale du lobe que le tissu pulmonaire proche des bronches pour la partie la plus proximale de celui-ci.

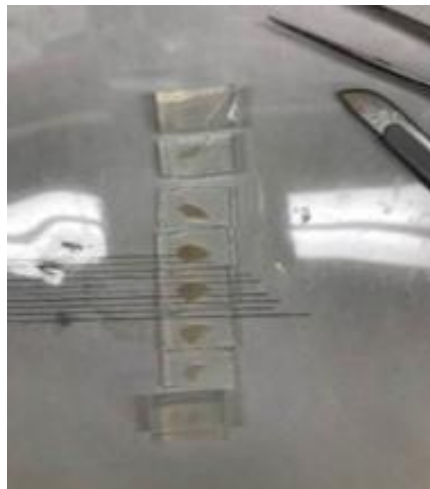


Figure 1 : Sur cette figure, le lobe pulmonaire supérieur droit est coupé en sections régulières, par la méthode de Cavalieri.

Photo prise dans le cadre de l'étude de la Dre Tiziana Cremona.

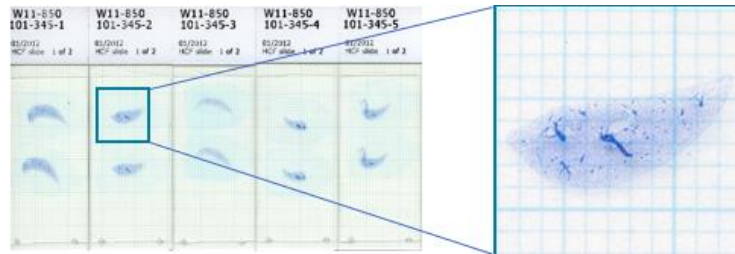


Figure 2 : Ici tissus histologiques de 5 microns, obtenues par découpe avec un microtome, à partir du bloc contenant les sections obtenues par la méthode de Cavalieri. Photo prise dans le cadre de l'étude de la Dre Tiziana Cremona.

Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine est utilisée pour les coupes. Cette préparation demande plusieurs bains dans lesquels les lames contenant les tissus vont être immergées. Pour commencer, les lames sont immergées dans du xylène durant deux cycles d'une dizaine de minutes (déparaffinage). S'ensuit une série de dilution décroissante dans de l'éthanol, afin de réhydrater les lames (2x100%, 95%, 80%). Elles sont ensuite colorées une première fois avec l'hématoxyline, pour une durée de 5 minutes. Cette première coloration faite, elles sont lavées à l'eau courante pour être à nouveau plusieurs fois immergées dans de l'éthanol à 80%. A ce moment, on atteint la deuxième coloration, celle à l'éosine 1% qui dure 3 minutes. Une nouvelle série de dilution, cette fois-ci croissante, se fait dans de l'éthanol, afin de déshydrater à nouveau les lames (50%, 80%, 95%, 2x100%). La coloration prend fin avec deux nouveaux cycles de 5 minutes dans du xylène. (Yao E., HE-Färbung für Paraffinschnitte, Institute of Anatomy, University of Bern). C'est une coloration bichromatique ; l'hématoxyline met en évidence les structures nucléaires en bleu/violet et l'éosine colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans un rose plus pâle (18). C'est une des colorations les plus utilisées en histologie ; elle permet de mettre en évidence la structure des tissus qui nous intéresse dans l'analyse stéréologique.

Il est important que la fixation des poumons avec le paraformaldéhyde, les sections selon la méthode de Cavalieri et l'inclusion dans la paraffine suivent des protocoles standardisés pour assurer une analyse stéréologique la plus valide possible, en évitant toutes distorsions des tissus ou altérations de leurs structures.

Pour comprendre toutes les étapes qui ont lieu durant cette préparation du lobe pulmonaire supérieur droit, partant de la souris jusqu'aux photos sériées obtenues pour l'analyse stéréologique, voici cette illustration (Figure 3) :

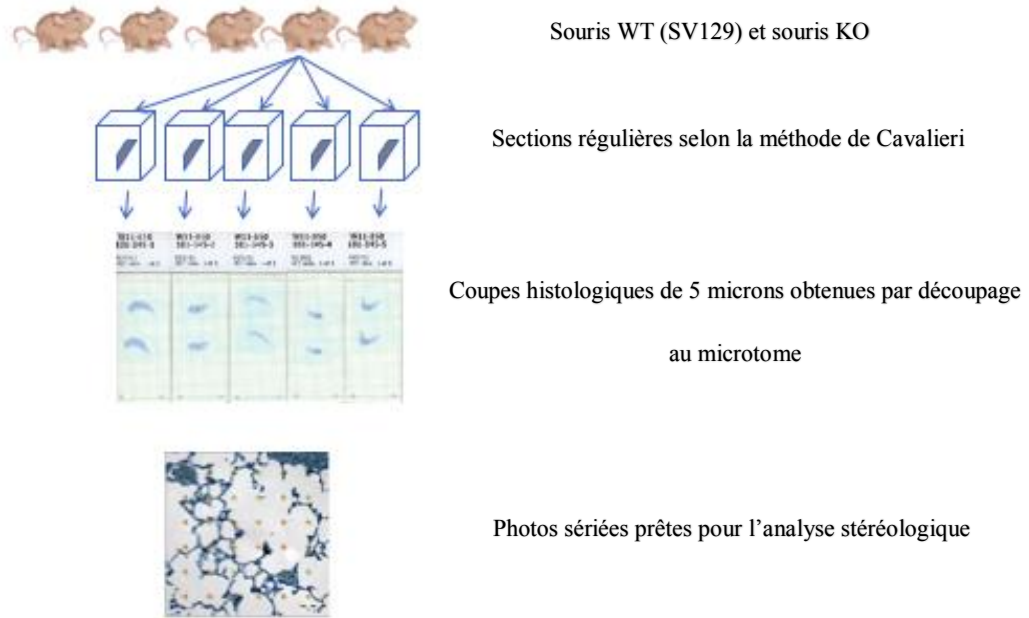


Figure 3: Représentation de la préparation des tissus de la souris jusqu'aux photos sériées. Schéma obtenu par la Dre Tiziana Cremona.

6.3 Prise de photos des lobes pulmonaires

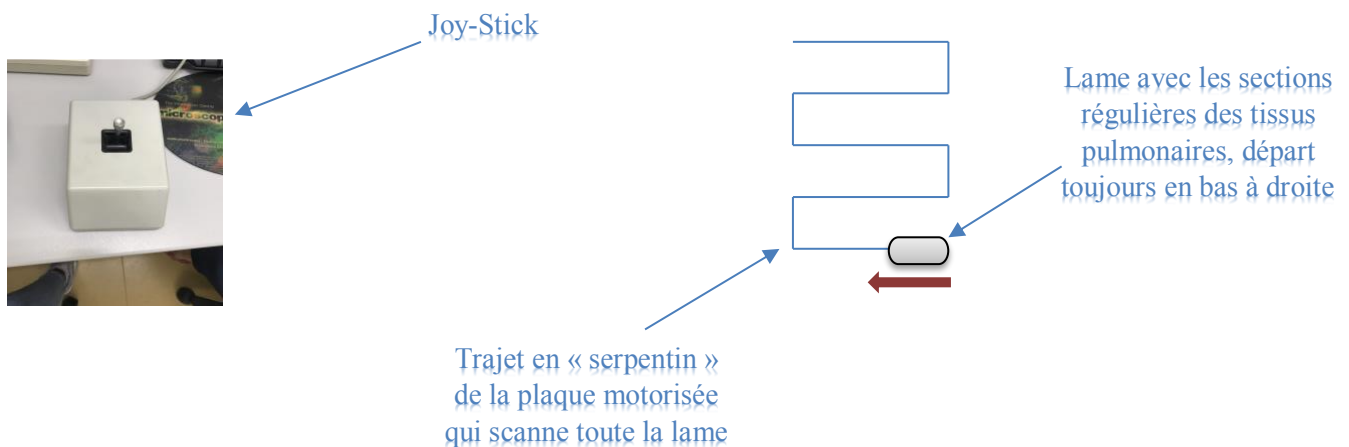
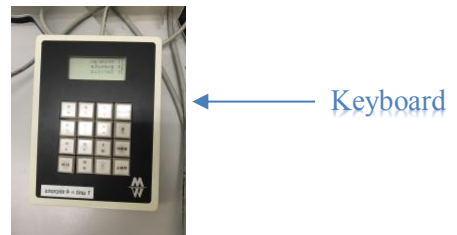
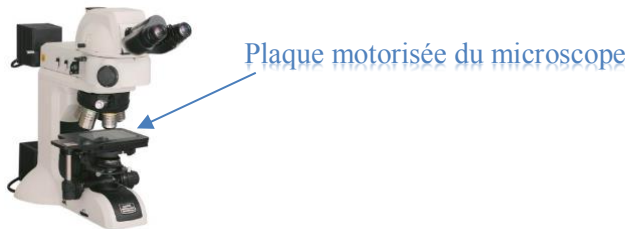
Dans cette partie, chaque lame, comportant les coupes de 5 microns d'épaisseur du lobe pulmonaire supérieur droit d'une souris va être photographiée. Une prise de vue sériée de 100 photos par lame est prévue, on bénéficie ainsi d'images de chaque partie du lobe et donc d'une vue d'ensemble du poumon. Une fois les photos faites, nous sélectionnons 50 photos par souris (1 sur 2). Ce seront ces photos qui seront analysées à l'aide du programme en ligne STEPanizer.

Matériel :

1. Un microscope équipé d'une platine motorisée sur l'axe X et Y
2. Un ordinateur bénéficiant du programme « cell^D »

3. Un Keyboard

4. Un Joy-Stick

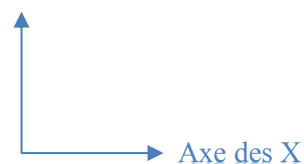


Méthode (cf. « Détails de la prise de photos sériées » dans les annexes) :

Dans le cadre de cette étude, c'est avec un grossissement de 20x que nous travaillons sur le microscope. Pour ce qui est des « pas » sur l'axe des X et des Y, une certaine rigueur doit être mise en place pour toutes les lames. Ce qui a été décidé est d'avoir les valeurs suivantes :

- a) X – direction : Steps : 25 um
Length : 800 um
- b) Y – direction : Steps 25 um

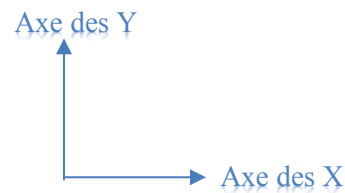
Axe des Y



Length : 800 um

Ces valeurs ont été choisies après plusieurs tentatives pour prendre le plus de photos possibles de tout le lobe pulmonaire supérieur droit, sans manquer de parcelles et à l'inverse, sans devoir reprendre des photos de zones pulmonaires pour arriver aux 100 photos mentionnées plus haut. Ce sont ces valeurs qui, dans la mesure du possible, nous ont permis d'arriver aux résultats souhaités. Par convention, nous orientons la lame horizontalement en bas à droite sur la plaque du microscope motorisé. Si par hasard nous nous retrouvons avec moins de 100 photos pour une lame, il a été décidé de placer celle-ci verticalement sur la plaque motorisée et d'utiliser les valeurs suivantes pour les axes X et Y :

- a) X – direction : Steps : 18 um
Length : 800 um
- b) Y – direction : Steps : 25 um
Length : 800 um



6.4 Analyse stéréologique

La stéréologie est un ensemble de règles mathématiques qui permet de mettre en évidence les données géométriques et structurelles d'un objet en 3D (17) (19) (20). Dans le cadre de notre étude, nous retirons donc, grâce à cette méthode, les données structurelles de nos poumons, à partir des sections de deux dimensions (2D), planes, des tissus pulmonaires reposant sur les lames histologiques. C'est un point important de la stéréologie, car elle permet l'étude en trois dimensions (3D) de tissus préalablement coupés en fines sections. L'analyse structurelle est donc possible, même à partir de sections en 2D. Pour comprendre une pathologie ou le vieillissement organique dans un organe aussi dynamique que le poumon, une vision en 3D des structures tissulaires est indispensable, ce que l'analyse stéréologique permet.

C'est la méthode quantitative de choix depuis des années pour mettre en lien la structure du poumon et sa fonction (17). Les valeurs géométriques d'intérêt que la stéréologie met en avant sont : le volume, la surface, la longueur et le nombre (17). Ces informations structurelles nous aident à analyser des objets tridimensionnels. Afin d'obtenir ces valeurs, la stéréologie utilise ce que l'on appelle des « sondes géométriques ». En effet, à partir de nos photos sériées prises de chaque souris, un champ d'analyse, que l'on nomme habituellement « test system », est appliqué de manière aléatoire et systématique sur chacune d'elles avec une des « sondes géométriques » que l'on sélectionne selon la valeur géométrique que l'on veut obtenir. Il existe 4 sortes de sondes : les points, les lignes, les plans et les volumes (17) (20) qui nous permettent donc de quantifier un volume, une aire, une longueur et un nombre respectivement. C'est l'intersection de ces sondes avec des structures bidimensionnelles sélectionnées de l'image histologique qui vont créer des objets géométriques en 3D. Chaque intersection entre la sonde et la structure en 2D doit arriver à une somme dimensionnelle de 3.

Ayant choisi les « sondes géométriques », il faut connaître le volume de référence du lobe pulmonaire supérieur droit avec lequel nous travaillons pour ensuite interpréter des résultats. Le volume de référence est ce que l'on peut aussi appeler le volume total du lobe pulmonaire supérieur droit, et est mesuré par une méthode se basant sur la loi d'Archimède, le « fluid displacement ». Du liquide est placé dans un cylindre, le lobe supérieur droit y est

immergé. La différence de volume de liquide avant et après l'immersion du lobe, correspond au volume total du lobe pulmonaire supérieur droit. Les quantités que l'on va obtenir grâce aux sondes sont interprétées en ratios ou densités (17). Il ne faut surtout pas commettre l'erreur de rapporter des résultats sans les comparer au volume de référence, ce que l'on appelle la « reference trap » (17). Pour un organe comme le poumon, le volume de référence peut changer en fonction de l'état de celui-ci ; qu'il soit sain ou pathologique, le volume change et donc l'interprétation des résultats change également (20). Si nous reprenons les valeurs géométriques que la stéréologie peut nous donner : le volume, la surface, la longueur et le nombre, il s'agit donc de les mettre en lien avec l'environnement avoisinant, soit le volume de référence. C'est le ratio ou densité dont on parlait plus haut : le volume par unité de volume, la surface par unité de volume, la longueur par unité de volume ou le nombre par unité de volume respectivement. Ces densités représentent les quantités classiquement données par la stéréologie (17). Pour que l'analyse stéréologique soit valide, il faut que deux conditions soient remplies :

- i. Le champ d'analyse et les « sondes géométriques » doivent être distribués de manière uniforme dans l'espace (20)
- ii. Le champ d'analyse et les « sondes géométriques » doivent être distribués de manière aléatoire sur l'image histologique (20)

Matériel :

1. Des photos de coupes histologiques sériées selon les règles d'échantillonnage stéréologique (toutes prises avec le même grossissement et transformées en format .jpg)
2. Un ordinateur avec le logiciel JAVA et STEPanizer
3. Un pavé numérique

Méthode (cf. « Détails de l'analyse stéréologique avec STEPanizer » dans les annexes) :

Dans le cadre de cette étude, l'analyse stéréologique s'est faite avec un programme nommé STEPanizer (19). Ce programme est en accès libre sur internet et permet des analyses stéréologiques sur des lames histologiques mais

aussi sur de l'imagerie (radiologie ou tomographie). C'est une méthode facile pour l'analyse stéréologique. Une résolution de 768x1024 a été choisie, et il est important qu'elle reste la même tout au long de l'étude de sorte à ne pas provoquer des changements de calibration.

Pour ce projet, les valeurs géométriques qui nous intéressent sont la surface et le volume des septa pulmonaires, responsables des échanges gazeux, ainsi que le « *mean linear intercept* » (Lm). La Lm nous aide à calculer la distance médiane entre les alvéoles. Elle se calcule autant avec le système des points (en faisant le ratio du volume sur la surface des septa) que celui des lignes décrit ci-dessous. Dans le cas présent, elle a été calculée avec le système des points. C'est une valeur qui, avec le nombre de septa et leur surface, donne une idée correcte de la distribution des structures pulmonaires internes (21).

Pour évaluer ces valeurs, il a été décidé de travailler avec deux sortes de sondes : les points et les lignes. Pour ce qui est des points, il s'agit de deux lignes perpendiculaires, formant une croix (Figure 4). Il a été décidé d'en appliquer 36 pour chaque photo analysée, de sorte à englober suffisamment d'éléments structurels du tissu présent sur la photo. Les différentes catégories d'appartenance des points étaient : septa (1), septa « infiltrated » (2), « parenchymal airspace filled » (3), « non-parenchymal » (4), « outside » (of the lung) (5) et artefacts (6) (Figure 5).

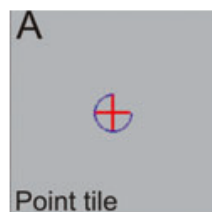


Figure 4: Une règle doit être décidée pour savoir quel coin de la croix sera utilisé pour l'analyse. C'est le point de référence pour le comptage, toutes structures étudiées qui coïncident avec ce coin de la croix ou son milieu devra être comptée. Ici, il a été choisi d'utiliser le quadrant supérieur droit.

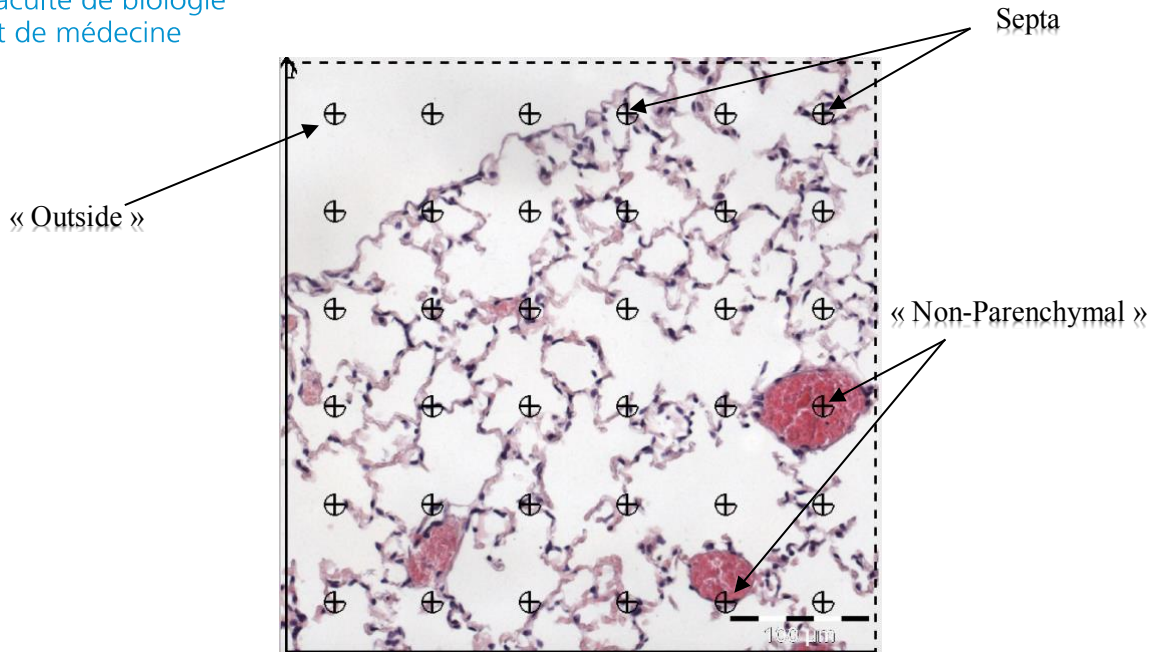


Figure 5 : Sur la figure ci-dessus, illustration de quelques points pour mieux comprendre la façon de compter.

Pour ce qui est des lignes, il s'agit d'une paire de lignes, de même direction, qui se place aléatoirement sur la photo (Figure 6-7). Il est question d'une ligne qui intercepte une structure choisie et nous aide à déterminer la surface de cette structure. En effet, chaque structure occupe une aire bien définie dans le tissu pulmonaire. Cette aire peut changer en fonction de l'angle que la section a formé lors de la coupe et de la forme de la structure en elle-même. Dans ce cas, les intersections entre la sonde et la structure étudiée seront proportionnelles à l'aire que celle-ci occupe dans le plan (17). Pour cette sonde, il a été choisi de compter les septa et d'en déterminer par la suite la surface totale (Figure 6-7).

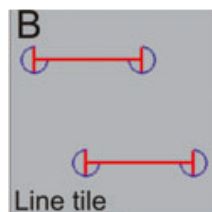


Figure 6 : Ici aussi une règle est mise en place pour le comptage, il commence par le bord libre du cercle gauche et se termine au bord libre du cercle droit. Toutes les septa qui interceptent la ligne entre ces deux zones arbitraires sont comptés.

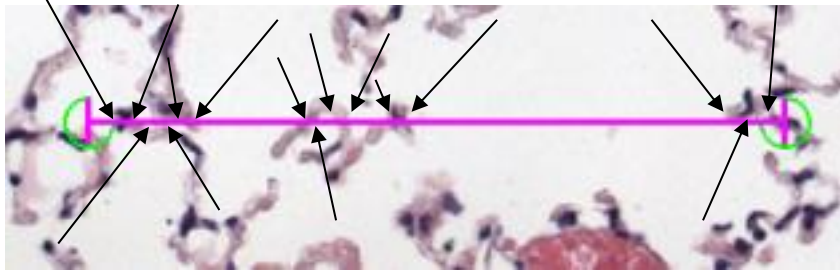


Figure 7 : Comptage des septa avec les lignes utilisées comme sonde.

Avec le système des lignes, nous comptons les septa afin de calculer la surface totale des septa. Comme illustré sur la Figure 7, il est important de compter le pôle basal et apical de l'épithélium respiratoire du septum en question, étant donné que les deux sont impliqués dans les échanges gazeux. Lorsqu'une structure annexe, tel un vaisseau sanguin, se retrouve sur la ligne de comptage, ne pas compter la paroi interne du vaisseau qui n'est pas de l'épithélium respiratoire.

6.5 Statistiques :

Analyses statistiques faites à l'aide du programme Prism. Le test utilisé est le two-way-ANOVA. La significativité est fixé à $p < 0.05$.

7 Résultats

Dans le cadre de cette étude, des souris qui ont la protéine TNC (WT) et des souris chez lesquelles la protéine est inactivée (TNC KO) ont été analysées. Il y avait 8 souris femelles (3 WT et 5 KO) et 9 souris mâles (4 WT et 5 KO) âgées de 1.5 ans.

Ce qui a pu être mesuré dans cette étude, au niveau morphométrique, est que les souris KO, ont un plus grand volume pulmonaire que les souris WT (Figure 9) tandis qu'aucune différence au niveau du poids corporel n'est identifiée entre les souris WT et TNC KO (Figure 8). Si nous allons plus loin dans les résultats, il se trouve que le volume du parenchyme est plus élevé chez les souris TNC KO aussi (Figure 10) et que la surface des septa est plus grande (Figure 11 B) tandis que le volume septal n'a pas de différence significative chez les souris WT ou TNC KO (Figure 11 A). Si le volume du tissu pulmonaire est plus grand mais que la surface des septa l'est aussi, on peut en déduire que la surface pulmonaire impliquée dans les échanges gazeux est plus importante chez la souris TNC KO que la souris WT.

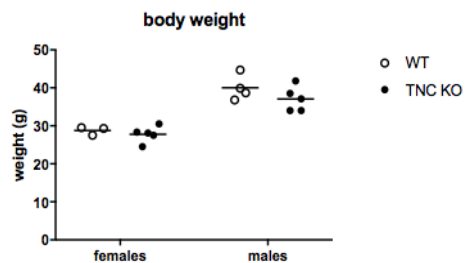


Figure 8 : On observe ci-dessus qu'aucune grande différence de poids n'est notable entre les femelles WT et KO ainsi qu'entre les mâles WT et KO.

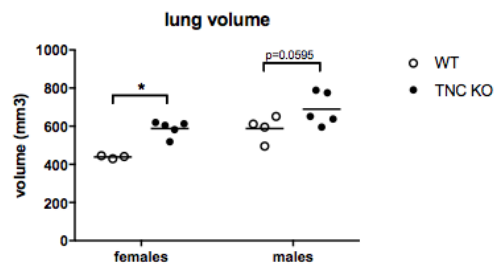


Figure 9 : Le graphique du volume pulmonaire met en évidence que les souris déficientes en TNC (KO), femelles et mâles, ont un plus grand volume pulmonaire en comparaison aux souris WT. * : $p < 0.05$.

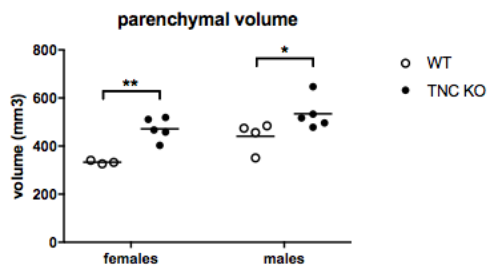


Figure 10 : Le graphique du volume du parenchyme met en évidence que les souris déficientes en TNC (KO), femelles et mâles, ont un plus grand volume parenchymateux en comparaison aux souris WT. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

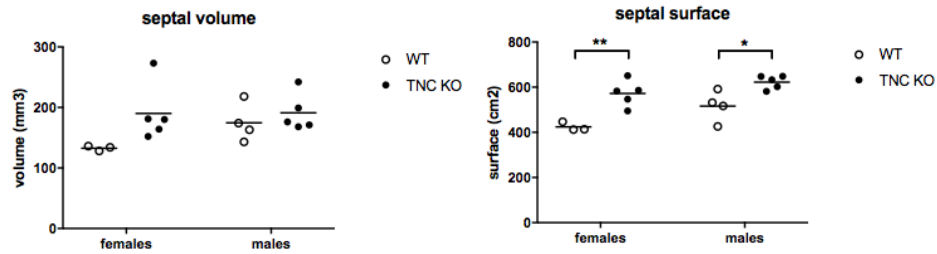


Figure 11 : Ci-dessus, deux graphiques concernant les septa.

- A) A gauche, le graphique pour le volume septal ne montre pas de différences statistiques significatives, que ce soit chez les femelles ou les mâles entre WT et TNC KO.
- B) A droite, le graphique pour la surface septale : elle est plus tranchée chez les femelles et les mâles. En effet, dans les deux cas, la surface septale est plus large chez les souris KO comparé aux souris WT. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

8 Discussion

La TNC est une glycoprotéine régulatrice de la matrice extracellulaire. Son expression est très présente lors de l'organogenèse, puis s'estompe petit à petit pour n'être presque plus détectable à l'âge adulte. Elle se réactive cependant lors de mécanismes de réparation tissulaire.

Au cours des recherches effectuées ces dernières années, des études en laboratoire ont démontré qu'une inactivation de la TNC provoquait des altérations dans le développement pulmonaire. En effet, elle affecte négativement le développement de l'arbre bronchique (8) ainsi que le processus d'alvéolarisation (3), tous deux des étapes fondamentales dans le développement du poumon.

Au départ de notre étude, on sait que chez les souris nouveau-nées, la compliance statique basale des souris TNC KO est augmentée en comparaison aux souris WT. Il s'avère qu'à la suite d'une ventilation mécanique agressive, cette compliance reste augmentée chez les souris TNC KO. Il y a donc une différence au niveau de la fonction du poumon (22). Il en est autrement pour les souris adultes. Chez elles, une augmentation de la compliance statique basale est observée chez les souris TNC KO par rapport aux souris WT. Cet écart n'existe cependant plus lors de la ventilation mécanique agressive. Il semblerait que les souris adultes TNC KO sous ventilation agressive ont une compliance pulmonaire qui stagne, tandis que la compliance pulmonaire chez les souris WT sous haut volume courant augmente encore (22). Outre la présence ou l'absence de la protéine TNC dans ces deux groupes, il a été également observé que les structures qui entourent les bronches ne sont pas présentes en même quantité chez les souris WT et TNC KO. Chez les souris nouveau-nées TNC KO, les images histologiques mettent en évidence moins de Smooth Muscle Actin (SMA) (couche musculaire lisse) autour des bronches que chez les souris de même âge WT. Cette diminution de SMA autour des bronches peut expliquer que ces souris aient une compliance basale et une compliance sous ventilation agressive augmentée. Les bronches n'étant plus soutenues par leur couche de musculature lisse physiologique, elles se retrouvent avec des possibilités d'expansion plus importantes, aussi bien à l'état basal qu'en ventilation mécanique agressive (22). Ce qui est observé chez les souris adultes TNC KO c'est

que les cellules musculaires « manquantes » sont remplacées par du collagène (22). Il n'y a donc plus de contraction musculaire active, comme le permettent les cellules musculaires lisses, mais le collagène étant une structure plus rigide, les bronches se déforment moins que ce que permet l'élasticité des muscles lisses. C'est la différence notable que nous observons entre les souris WT et TNC KO adultes lors de la ventilation mécanique agressive ; la compliance qui était plus élevée chez les souris TNC KO en condition basale stagne par la suite en ventilation agressive, tandis qu'elle augmente en situation de stress chez les souris WT (22).

Pour ce qui est de nos souris âgées, aucune différence fonctionnelle des poumons n'est notable entre les souris WT et TNC KO, que ce soit lors de la ventilation physiologique ou agressive. De même, aucune différence morphologique n'est observée en comparant les lames histologiques de poumon des souris WT et TNC KO colorées au H&E (Figure 12) (Gremlich S., Cremona TP., Schittny JC., Roth-Kleiner M., mars 2018, Age tenascin-C knockout mice have increased lung volume and septal surface but unchanged lung function) (22).

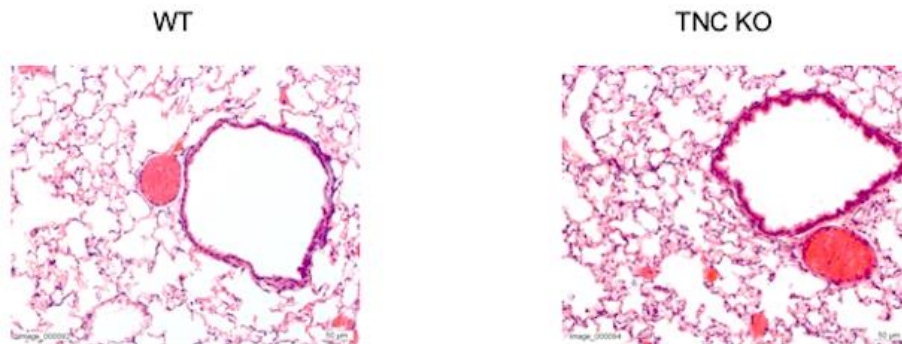


Figure 8 : Avec la coloration H&E, du point de vue morphologique, aucune différence n'est notable entre les souris WT et KO sur les coupes histologiques.

Cependant, au niveau morphométrique, des différences notables ont pu être mises en évidence dans ce travail. Les souris TNC KO de cette étude ont, en l'occurrence, un plus grand volume pulmonaire que les souris WT. Il en va de même pour le volume du parenchyme et la surface des septa qui est aussi plus importante pour le groupe TNC KO. Étant donné que le volume parenchymal est plus important et que la surface dédiée aux septa aussi, nous pouvons en conclure qu'une plus grande surface d'échanges gazeux est présente chez les souris KO. Avec ces

résultats morphométriques, il semblerait qu'être une souris KO soit un avantage lors de l'« aging » pulmonaire. En effet, comme mentionné dans l'introduction, lors du processus de vieillissement pulmonaire, on s'attend à une évolution physiologique menant à des volumes pulmonaires mobilisables plus petits, à des bronches terminales qui ont des diamètres plus petits et qui se collabent donc plus rapidement (1) (13). Parallèlement, les bronches distales et les canaux alvéolaires se dilatent créant une perte de surface des alvéoles, sans pour autant détruire leurs septa (13). En résumé, on s'attend à trouver des volumes pulmonaires et une surface d'échanges gazeux nettement moins importants qu'au début de la vie. En l'absence de TNC, il semblerait donc que cette évolution négative liée à l'âge ne se fasse pas ou se fasse moins.

Il serait intéressant de savoir ce qui se passe au niveau cellulaire entre l'âge adulte et le vieillissement dans les poumons de nos souris. Ce que l'on observe morphométriquement chez les souris TNC KO peut être le résultat de changements s'exprimant à un temps T entre le 3^{ème} mois et nos souris âgées d'1.5 ans. En effet, l'augmentation du volume du parenchyme et de la surface des septa suggère un déséquilibre entre prolifération cellulaire et perte cellulaire (que ce soit par apoptose, nécrose, ou autophagie). Deux hypothèses peuvent être mises en avant. La première est de se demander si les souris TNC KO n'ont pas une plus grande prolifération cellulaire qui expliquerait un plus grand volume pulmonaire et une surface de septa plus importante. La deuxième est de prendre le chemin inverse pour expliquer les résultats, et de se demander si, chez les souris TNC KO, quelque chose ne bloquerait pas une des voies qui mènent à la destruction de cellules. Dans le cadre de l'hypothèse d'une plus forte prolifération cellulaire, il est à mentionner que chez les souris TNC KO de tous les âges, ventilées ou pas, aucune différence immunohistochimique en utilisant le marqueur Ki67 n'avait été mise en évidence, ce qui pourrait supporter l'hypothèse d'une plus grande prolifération cellulaire (Equey L., Gremlich S., Roth-Kleiner M., Effet de la ventilation mécanique sur le développement pulmonaire de la souris knockout pour la tenascine-C, Mémoire de Maîtrise en médecine No 3351, 2017). De telles investigations vont être poursuivies avec des Western blots par exemple, par dosage de marqueurs prolifératifs aussi bien que de marqueurs liés à la sénescence, l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie. Ceci permettra de mettre en évidence une potentielle dysrégulation entre la prolifération cellulaire et la perte de cellules chez nos souris TNC KO. Cependant, il reste que l'étude des souris TNC KO a été

menée sur trois temps précis : souris nouveau-née (P5), jeune adulte (3 mois) et souris âgée (1.5 ans). Ceci ne nous permet pas d'exclure une augmentation de prolifération ou de mort cellulaire intervenant quelque part entre l'âge adulte et l'âge avancé.

Une autre question se pose quant à la cause des différences morphométriques observées. Il a en effet été démontré qu'il existait des isoformes de la protéine TNC courtes et longues et que leurs expressions changeaient en fonction de l'âge de la souris. Les isoformes de petites tailles sont continuellement présentes, aussi bien chez les souris de jeunes âge que chez les souris adultes et âgées, tandis que les isoformes de longues tailles sont uniquement présentes chez les jeunes souris au cours de l'organogenèse (P5) (Equey L., Gremlich S., Roth-Kleiner M., Effet de la ventilation mécanique sur le développement pulmonaire de la souris knockout pour la tenascine-C, Mémoire de Maîtrise en médecine No 3351, 2017). Dès lors, à quelles isoformes, exprimées à quel moment de la vie de la souris, les résultats de l'analyse stéréologique peuvent-ils être dus ? Il serait intéressant de savoir si une expression de la TNC sous forme d'isoforme longue, au cours du vieillissement pulmonaire, permettrait d'interpréter ces résultats. En effet, il est possible qu'une ré-expression de la protéine TNC se fasse lors de l'« aging » pulmonaire, via les diverses réactions inflammatoires et lésions tissulaires dues au vieillissement. Ou au contraire, il se pourrait qu'une expression extrêmement forte de la protéine TNC durant l'organogenèse (forme longue) suffise à influencer l'« aging » pulmonaire. La dernière possibilité étant que la faible expression de forme courte à l'âge adulte suffirait pour expliquer ces résultats.

L'idée d'une ré-expression de la protéine TNC lors de l'« aging » a été mentionnée plus haut. S'il s'avérait que ce soit le cas, l'expression de facteurs contre-balaçant l'activation de la protéine TNC est une piste ouverte à garder en tête. Elle soutiendrait le fait qu'aucune différence morphologique et fonctionnelle n'ait été révélée lors de l'étude.

9 Conclusion

Finalement, nous pouvons attribuer une fonction positive à l'absence de la protéine TNC dans le vieillissement pulmonaire. Il s'avère que l'inactivation de cette dernière pourrait être un avantage pour la survie et protéger de certaines maladies pulmonaires chroniques, se traduisant avec une perte de surface d'échanges gazeux, tel que l'emphysème.

Mots clefs : Tenascine C, vieillissement, analyse morphométrique, poumon, knockout

10 Bibliographie

1. Guénard H, Rouatbi S. Aspects physiologiques du vieillissement respiratoire. *Rev Mal Respir.* 2004 Nov;21(5):13–24.
2. Roth-Kleiner M, Post M. Similarities and dissimilarities of branching and septation during lung development. *Pediatr Pulmonol.* 2005 Jun 17;40(2):113–34.
3. Tschanz SA, Salm LA, Roth-Kleiner M, Barré SF, Burri PH, Schittny JC. Rat lungs show a biphasic formation of new alveoli during postnatal development. *J Appl Physiol.* 2014 Jul;117(1):89–95.
4. Universalis E. HISTOLOGIE [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cited 2018 May 28]. Available from: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/histologie/>
5. Masson E. Activité métabolique du tissu pulmonaire : épithélium alvéolaire [Internet]. EM-Consulte. [cited 2018 May 28]. Available from: <http://www.em-consulte.com/article/10765/activite-metabolique-du-tissu-pulmonaire-epitheliu>
6. Embryologie humaine - William Larsen, Philip R Brauer, Gary C Schoenwolf, Philippa Francis-West - Google Livres [Internet]. [cited 2018 May 28]. Available from: <https://books.google.ch/books?id=4F3hDgAAQBAJ&pg=PA254&lpg=PA254&dq=bourgeons+terminaux+poumons&source=bl&ots=Bnv-akCCR&sig=6dDKtsbeghYRPZ419ZjhROtrBUc&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiljcWrmqjbAhVB2ywKHYfhCaUQ6AEIJzAA#v=onepage&q=bourgeons%20terminaux%20poumons&f=false>
7. AUBIER. *Traité de pneumologie - 2e ed.* Lavoisier; 2009. 1139 p.
8. Roth-Kleiner M, Hirsch E, Schittny JC. Fetal Lungs of Tenascin-C–Deficient Mice Grow Well, but Branch Poorly in Organ Culture. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Mar 1;30(3):360–6.
9. Stades du développement pulmonaire; stade alvéolaire [Internet]. [cited 2018 Jul 25]. Available from: <http://www.embryology.ch/francais/rrespiratory/phasen06.html>
10. Luyet C, Burri PH, Schittny JC. Suppression of cell proliferation and programmed cell death by dexamethasone during postnatal lung development. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Mar;282(3):L477–83.
11. Halliday H. Use of steroids in the perinatal period1. Vol. 5 Suppl A. 2004. S321 p.
12. Roth-Kleiner M, Berger TM, Gremlich S, Tschanz SA, Mund SI, Post M, et al. Neonatal steroids induce a down-regulation of tenascin-C and elastin and cause a deceleration of the first phase and an acceleration of the second phase of lung alveolarization. *Histochem Cell Biol.* 2014 Jan 1;141(1):75–84.
13. Ketata W, Rekik WK, Ayadi H, Kammoun S. Vieillescence de l'appareil respiratoire : modifications anatomiques et conséquences physiologiques. *Rev Pneumol Clin.* 2012 Oct 1;68(5):282–9.
14. Boyer L, Savale L, Boczkowski J, Adnot S. Sénescence cellulaire et pathologies pulmonaires : exemple

de la BPCO. *Rev Mal Respir*. 2014 Dec 1;31(10):893–902.

15. Bergeron-Lafaurie A, Le Treut J, Tonnel A –B., Magnier R. Vieillesse pulmonaire et immunité. *Rev Mal Respir Actual*. 2011 Nov;3(3):167–71.
16. Forsberg E, Hirsch E, Frohlich L, Meyer M, Ekblom P, Aszodi A, et al. Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci*. 1996 Jun 25;93(13):6594–9.
17. Gélinas-Lymburner E. Développement d’une approche quantitative pour l’étude du poumon équin : fixation et échantillonnage pour l’application des principes de la stéréologie. 2015 Oct 15 [cited 2018 Jul 6]; Available from: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/12987>
18. Coloration à l’hématoxyline et à l’éosine. In: Wikipédia [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 6]. Available from: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Coloration_%C3%A0_1%27h%C3%A9matoxyline_et_%C3%A0_1%27%C3%A9osine&oldid=146224285
19. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc*. 243(1):47–59.
20. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):394–418.
21. Knudsen L, Weibel ER, Gundersen HJG, Weinstein FV, Ochs M. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2010 Feb;108(2):412–21.
22. Cremona TP, Roth-Kleiner M, Schittny J, Gremlich Irrausch S. Tenascin C knockout mice have an altered lung function at newborn and adult age. In: *Lung and Airway Developmental Biology* [Internet]. European Respiratory Society; 2017 [cited 2018 Oct 18]. p. PA2083. Available from: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/1393003.congress-2017.PA2083>