



**Impact du sexe fœtal et du temps de gestation sur les
profils d'expression des gènes des cultures primaires
enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales
issues de poumons murins**

Thèse

Magaly Kaczmarczyk

Doctorat en médecine moléculaire
Philosophiae doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Magaly Kaczmarczyk, 2017

**Impact du sexe fœtal et du temps de gestation sur les
profils d'expression des gènes des cultures primaires
enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales
issues de poumons murins**

Thèse

Magaly Kaczmarczyk

Sous la direction de :

Yves Tremblay, directeur de recherche
Pierre Provost, codirecteur de recherche

Résumé

L'immaturation pulmonaire caractérisée par un défaut en surfactant est très fréquente chez le nouveau-né prématuré, particulièrement chez les plus jeunes. La sévérité du syndrome de détresse respiratoire (SDR) et le taux de mortalité qui y est associé ont été considérablement réduits par l'administration anténatale de glucocorticoïdes. En plus, les traitements administrant du surfactant exogène, qui compense l'immaturation, et l'amélioration des protocoles de ventilation assistée ont contribué à ces progrès. Toutefois, le SDR reste plus fréquent chez les enfants de sexe masculin que féminin. Le sexe fœtal est alors un facteur déterminant dans les processus de développement et de maturation pulmonaire où la maturation des pneumocytes de type II marque le début de la montée de synthèse et de la sécrétion du surfactant. Chez l'enfant né prématurément, la structure du poumon est simplifiée. Les saccules distales sont indifférenciées, les parois paraissent plus larges et on observe un faible développement microvasculaire. Le poumon verra sa surface alvéolaire augmenter vers la 30^e semaine de gestation tandis que la septation alvéolaire des saccules distales commencera vers la 32^e semaine de gestation. Durant cette maturation structurale du poumon, des interactions entre le mésenchyme et l'épithélium vont être impliquées dans la régulation de différents processus via des facteurs paracrines. Chez le garçon, la maturation est retardée par les androgènes, conduisant à un délai dans la synthèse du surfactant pulmonaire.

Dans le but de développer de nouvelles cibles pharmacologiques, nous avons étudié les différences temporelles et sexuelles dans les transcriptomes des cellules fibroblastiques et épithéliales pulmonaires chez la souris durant les jours de gestation 17.5, 18.0 et 18.5. Nous avons utilisé une approche de biopuce ADN durant une fenêtre de gestation qui encadre la montée de synthèse du surfactant, qui est asynchrone entre femelles et mâles en défaveur de ces derniers. Différents profils d'expression des gènes du poumon ont été obtenus entre les jours de gestation 17.5, qui correspond au stade canaliculaire, et 18.5, qui correspond au début du stade sacculaire. Les résultats ont montré que 347 gènes présentaient une différence d'expression en fonction du temps dans les cultures de fibroblastes contre 116 gènes dans les cultures épithéliales. Le gène

Cox-1, impliqué dans la synthèse des prostaglandines présentait une expression qui diminuait entre les jours de gestation 17.5 et 18.5. Pour le gène *Sema3A* impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales, et le gène *Lemd2*, un régulateur négatif de la signalisation PI3K/MAP kinase, on observait une augmentation de leur niveau d'expression entre les jours de gestation 17.5 et 18.5. De plus, nos résultats indiquent que le nombre de gènes exprimé avec des différences sexuelles évolue à la hausse en fonction du temps de gestation. Dans les cellules épithéliales, 3276 transcrits présentant une différence sexuelle dans leur niveau d'expression au jour gestationnel 18.5 ont été identifiés. Ils sont principalement impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire, les interactions cellulaires, le métabolisme des lipides et l'apoptose. Plusieurs voies de signalisation, dont celles de TGF β , FGF, IGF et WNT présentaient des différences sexuelles. Des modulations temporelles et sexuelles spécifiques aux types cellulaires ont été observées pour plusieurs gènes, ce qui pave la voie au développement de nouvelles cibles pharmaceutiques.

Abstract

Pulmonary immaturity characterized by the deficiency absence of surfactant is frequent for premature babies, especially for those who born before the 32nd week of gestation. The severity of respiratory distress syndrome of the neonate (RDS) and the related mortality rate have been reduced substantially by antenatal administration of glucocorticoids. Moreover, exogenous surfactant therapy and ventilation strategies also have contributed to this progress. However, RDS is still more frequent for boys than girls. Foetal sex is thus a critical factor for foetal lung maturation. For babies born prematurely, lungs structure is simplified. The distal saccules are undifferentiated. Pulmonary walls seem thicker and the microvasculature is underdeveloped compared with normal lungs. Alveolar surface of normal lungs increases from the 30th week of gestation, while saccularization starts around the 32nd week of gestation. During this lung structural maturation, interactions between mesenchymal and epithelial cells involving paracrine factors are involved in the regulation of different processes. For males, maturation is delayed by androgens, leading to a delay in the surge of surfactant synthesis in type II pneumocytes.

In order to develop novel pharmaceutical targets, we have studied the effect of sex and gestation time on the transcriptome of cultured mouse pulmonary fibroblasts and epithelial cells isolated on gestation day 17.5, 18.0 and 18.5. We used DNA microarrays during a gestation period overlapping the surge of surfactant synthesis, which occurs later in males. Different expression profiles were obtained on gestation day 17.5, corresponding to the canalicular stage, compared with gestation day 18.5, corresponding to the beginning of the saccular stage. Our data indicated that 347 genes were expressed differently according to gestation time in lung fibroblast cultures, while only 116 genes presented such a variation in epithelial cell cultures. The expression levels of *Cox-1*, involved in prostaglandin synthesis, decreased from gestation day 17.5 to 18.5. For *Sema3A*, involved in epithelial cell differentiation, and *Lemd2*, encoding for a negative regulator of PI3K/MAP kinase signalling, we observed an increase in expression from gestation day 17.5 to GD 18.5. Moreover, our results show that the number of genes expressed with a sex difference increased according to gestation time. In epithelial cells, 3,276 transcripts presenting a sex difference in their expression level

on gestation day 18.5 have been identified. They are mainly involved in cell proliferation and growth, cell-cell interaction, lipid metabolism, and apoptosis. Several signalling pathways including those of TGF β , FGF, IGF and WNT showed sex differences. Time- and sex-related modulations were observed for various genes in specific cells, which pave the way to the development of novel pharmaceutical targets.

Table des matières

<i>Résumé</i>	iii
<i>Abstract</i>	v
<i>Table des matières</i>	vii
<i>Liste des Tables</i>	x
<i>Liste des Figures</i>	xi
<i>Liste des abréviations :</i>	xiv
<i>Remerciements</i>	xxi
<i>Avant-Propos</i>	xxiii
CHAPITRE I : Introduction	1
I.1 Préambule	2
I.2 Prématurité : définition et conditions biologiques	3
I.2.1 Trois stades de prématurité	3
I.2.2 Limite de viabilité	6
I.2.3 Immaturité morphologique et/ou fonctionnelle des organes	6
I.2.3.1 Immaturité digestive	8
I.2.3.2 Immaturité neurologique	8
I.2.3.3 Immaturité pulmonaire	9
I.2.3.3.1 Approches thérapeutiques	11
I.2.4 Conclusion de la section	14
I.3 Le poumon fœtal	15
I.3.1 Le développement au cours du temps	16
I.3.1.1 Stade embryonnaire	17
I.3.1.2 Stade pseudo-glandulaire	18
I.3.1.3 Stade canaliculaire	20
I.3.1.4 Stade sacculaire	21
I.3.1.5 Stade alvéolaire et maturation microvasculaire	22
I.3.2 Conclusion de la section	24
I.4 Types cellulaires	25
I.4.1 Les fibroblastes	25
I.4.2 Les cellules épithéliales	26
I.4.2.1 Les pneumocytes de type I	28
I.4.2.2 Les pneumocytes de type II	29
I.4.2.2.1 Le surfactant	29
I.4.3 Interactions mésenchyme-épithélium	30
I.4.4 Conclusion de la section	32
I.5 Génétique du développement pulmonaire	33
I.5.1 Les facteurs de croissance	33
I.5.1.1 TGFβ/BMP	33
I.5.1.2 Wnt	37
I.5.1.3 FGF	39
I.5.1.4 SHH	42
I.5.1.5 IGF	44
I.5.1.6 EGF	45
I.5.1.7 PDGF / VEGF	47
I.5.2 Les facteurs de transcription	48
I.5.2.1 Nkx	48
I.5.2.2 Hox	49
I.5.2.3 RAR	49
I.5.2.4 GLIs	50
I.5.2.5 Facteurs de transcription de la boîte Forkhead	50
I.5.3 Les autres facteurs	51
I.5.3.1 Les microARNs	51
I.5.3.2 La MEC	52

1.5.4 Conclusions de la section	53
1.6 Différences sexuelles et effets des androgènes sur le développement du poumon	54
1.6.1 Conclusion de la section	55
1.7 Études génomiques	56
1.7.1 Études génomiques selon le sexe fœtal	57
1.7.2 Conclusion de la section	58
1.8 Présentation du projet de recherche	59
1.8.1 Hypothèses de travail	60
1.8.2 Objectif général	61
1.8.3 Objectifs spécifiques	61
CHAPITRE II : Matériels et Méthodes	62
II.1 Animaux	63
II.2 Protocole d'accouplement	63
II.3 Nécropsie	63
II.4 Détermination du sexe fœtal	64
II.5 Préparation des cultures enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales isolées des poumons fœtaux de souris	64
II.6 Isolation de l'ARN	67
II.7 Préparation des échantillons pour les biopuces à ADN d'Affymetrix « Mouse Gene 1.0 ST »	69
II.8 Préparation des sondes, hybridation des biopuces à ADN, balayage et analyse	70
II.9 Analyse des données	71
II.10 Validation des données des biopuces ADN	72
II.11 Validation technique du protocole d'isolation	75
II.12 Statistiques	75
CHAPITRE III : Résultats	76
III.1 Validation du modèle cellulaire et des données de transcriptomique par qPCR	77
III.1.1 Enrichissement des cultures cellulaires en fibroblastes et en cellules épithéliales	77
III.1.2 Niveaux relatifs d'expression des ARNm dans des poumons entiers	78
III.2 Analyse bioinformatique des données de biopuces en fonction du temps	92
III.2.1 Variation de l'expression des gènes dans la fenêtre de gestation s'étendant du jour 17.5 au jour 18.5	92
III.2.2 Études des gènes modulés en fonction du temps dans les cultures enrichies en cellules fibroblastiques issues de poumon fœtaux de femelles	94
III.2.2.1 Fonctions biologiques associées à la majorité des gènes en modulation temporelle chez les fibroblastes en culture	94
III.2.2.2 Gènes fibroblastiques potentiellement importants pour le développement et la maturation du poumon fœtal	96
III.2.2.3 Implication des gènes fibroblastiques pulmonaires dans les voies de signalisation impliquées dans la régulation du surfactant	101
III.2.3 Études des gènes modulés en fonction du temps dans les cultures enrichies en cellules épithéliales issues de poumons fœtaux de femelles	103
III.2.3.1 Différences temporelles d'expression des gènes et répartition de ces gènes dans les grandes fonctions biologiques chez les cellules épithéliales pulmonaires	103
III.2.3.2 Gènes potentiellement importants dans l'épithélium pour le développement et la maturation du poumon fœtal	105
III.2.3.3 Implication de gènes épithéliaux des cultures pulmonaires dans les voies de signalisation impliquées dans le développement du poumon et la régulation du métabolisme des lipides	107
III.3 Analyse bioinformatique des données de biopuces selon le sexe fœtal	109
III.3.1 Variation de l'expression des gènes fibroblastiques pulmonaires selon le sexe pour une fenêtre de gestation s'étendant du jour 17.5 au jour 18.5	109
III.3.2 Études des gènes modulés en fonction du sexe dans les cultures enrichies en cellules fibroblastiques issues de poumon fœtaux	111
III.3.2.1 Catégorisation des gènes modulés en fonction du sexe au jour de gestation 18.5 dans des cultures de fibroblastes issues de poumons murins	111
III.3.2.2 Gènes fibroblastiques modulés en fonction du sexe pouvant être impliqués dans le développement et le retard de la maturation du poumon fœtal observé chez le mâle au jour de gestation 18.5	113

III.3.3 Différences sexuelles dans l'expression des gènes du poumon fœtal en développement dans la fraction épithéliale	115
III.3.3.1 Fonctions biologiques associées à la majorité des gènes modulés par le sexe dans les cellules épithéliales en culture	117
III.3.3.2 Étude des gènes exprimés avec une différence sexuelle qui seraient potentiellement importants dans l'épithélium du poumon fœtal.....	119
III.3.3.3 Gènes impliqués dans le développement pulmonaire et la maturation et exprimés avec différences sexuelles	124
CHAPITRE IV : Discussion.....	126
CHAPITRE V : Conclusion et Perspectives	146
V.1 Rétrospective des principales conclusions en fonction de nos hypothèses initiales	147
V.2 Perspectives.....	150
Bibliographie.....	153

Liste des Tables

TABLES CHAPITRE I

<i>Table 1 : Taux de naissances prématurées en 2010 selon le pays.</i>	5
<i>Table 2 : Recommandations au sujet de la réanimation des bébés prématurés.</i>	7
<i>Table 3 : Les cellules de l'épithélium respiratoire.</i>	28

TABLES CHAPITRE II

<i>Table 4 : Échantillonnage des poumons fœtaux de souris pour les analyses de biopuces ADN.</i>	68
<i>Table 5 : Caractéristiques des ARNs totaux et des sondes pour les biopuces à ADN.</i>	71
<i>Table 6 : Paramètres expérimentaux et oligonucléotides spécifiques des gènes sélectionnés pour l'analyse en PCR en temps réel des poumons de fœtus de souris.</i>	74

TABLES CHAPITRE III

<i>Table 7 : Corrélation dans l'expression de plusieurs gènes en fonction du temps entre l'étude du poumon entier par qPCR et l'étude des cultures primaires par biopuces.</i>	81
<i>Table 8 : Corrélation dans l'expression de plusieurs gènes en fonction du sexe entre l'étude du poumon entier par qPCR et l'étude des cultures primaires par biopuces.</i>	81
<i>Table 9 : Processus/fonctions biologiques dans lesquels les gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du temps sont impliqués.</i>	98
<i>Table 10 : Gènes fibroblastiques pulmonaires modulés en fonction du temps et leurs voies de signalisation impliquées dans la régulation du surfactant.</i>	102
<i>Table 11 : Gènes de l'épithélium pulmonaire modulés en fonction du temps et leurs voies de signalisation impliquées dans le développement du poumon et le métabolisme des lipides.</i>	108
<i>Table 12 : Processus/fonctions biologiques dans lesquels les gènes épithéliaux pulmonaires modulés en fonction du sexe sont impliqués.</i>	121

Liste des Figures

FIGURES CHAPITRE I

<i>Figure 1</i> : Illustration des régions conductrices et respiratoires du poumon humain et nombre d'embranchements de la trachée aux sacs alvéolaires.....	16
<i>Figure 2</i> : Développement pulmonaire chez l'humain et chez la souris.....	17
<i>Figure 3</i> : Embranchement chez la souris durant le stade pseudoglandulaire.....	19
<i>Figure 4</i> : Illustration d'une alvéole	23
<i>Figure 5</i> : Compartiments épithéliaux et mésenchymateux du poumon.....	27
<i>Figure 6</i> : La voie de signalisation TGF β /BMP.	34
<i>Figure 7</i> : Les voies de signalisation Wnt.	39
<i>Figure 8</i> : La voie de signalisation FGF.....	40
<i>Figure 9</i> : La voie de signalisation SHH.....	43
<i>Figure 10</i> : La voie de signalisation IGF.....	44
<i>Figure 11</i> : La voie de signalisation EGF.....	46

FIGURE CHAPITRE II

<i>Figure 12</i> : Protocole expérimental utilisé pour la culture enrichie en cellules fibroblastiques et épithéliales.....	66
---	----

FIGURES CHAPITRE III

<i>Figure 13</i> : Niveaux d'expression de K18 et Vim dans nos cultures cellulaires enrichies issues de poumons fœtaux de souris.....	78
<i>Figure 14</i> : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes <i>Spry4</i> et <i>Ankrd1</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	82
<i>Figure 15</i> : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes <i>Rny3</i> et <i>Rpl13a</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	83
<i>Figure 16</i> : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes <i>Ch25h</i> et <i>Mmp10</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	84
<i>Figure 17</i> : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes <i>Slc40a1</i> et <i>Exph5</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	85
<i>Figure 18</i> : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes <i>Spry4</i> et <i>Ankrd1</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	86

Figure 19 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes <i>Rny3</i> et <i>Rpl13a</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	87
Figure 20 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes <i>Smad3</i> et <i>Bmp7</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	88
Figure 21 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes <i>Egfr</i> et <i>Dgat2</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	89
Figure 22 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes <i>Chpt1</i> et <i>Lpin1</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	90
Figure 23 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes <i>Pdgfβ</i> et <i>Tgfβ1</i> dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces).	91
Figure 24 : Modulation de l'expression des gènes entre les temps de gestation 17.5 et 18.5 dans les cultures cellulaires de poumon fœtal de femelles.	93
Figure 25 : Proportions des gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du temps dans les grandes fonctions biologiques selon le site GO.	95
Figure 26 : Répartition des gènes fibroblastiques pulmonaires modulés en fonction du temps dans une sélection de fonctions biologiques.	97
Figure 27 : Catégorisation des gènes modulés en fonction du temps dans des cultures épithéliales issues de poumons murins femelles selon le site GO.	104
Figure 28 : Répartition des gènes des cultures épithéliales pulmonaires modulés en fonction du temps dans une sélection de fonctions biologiques.	106
Figure 29 : Modulation de l'expression des gènes en fonction du sexe entre les temps de gestation 18.0 et 18.5 dans des cultures primaires de fibroblastes des poumons fœtaux.	110
Figure 30 : Proportions des gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du sexe dans les grandes fonctions biologiques selon le site GO.	112
Figure 31 : Répartition des gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du sexe dans une sélection de fonctions biologiques.	114
Figure 32 : Modulation de l'expression des gènes en fonction du sexe entre les temps de gestation 17.5, 18.0 et 18.5 dans des cultures primaires épithéliales du poumon fœtal.	116
Figure 33 : Catégorisation des gènes modulés en fonction du sexe dans des cultures épithéliales issues de poumons murins selon le site GO.	118
Figure 34 : Implication potentielle des gènes épithéliaux du poumon fœtal modulés en fonction du sexe dans une sélection de fonctions biologiques.	120
Figure 35 : Volcano plot représentant la distribution spatiale des gènes modulés par le sexe selon leurs p-values corrigées et leurs FC dans les cultures épithéliales du poumon en JG 18.5.	125

FIGURES CHAPITRE IV

Figure 36 : Les voies de signalisation activées par <i>TGFβ</i> dans le poumon fœtal.	130
--	-----

Figure 37 : Les voies de signalisation PI3K/AKT et MAP kinase activées par IGF/IGF1R dans le poumon fœtal..... 136

FIGURE CHAPITRE V

Figure 38 : Réseau interactif de gènes modulés selon le sexe fœtal dans le métabolisme des lipides.151

Liste des abréviations :

5 α -DHT : 5- *alpha* Dihydrotestostérone
ACT : Actin-Like Protein (ACT) Gene
ActR-1A : Actin-Related Protein 1 Homolog A, Centractin Alpha
ActR-2A : Actin-Related Protein 2 Homolog A, Centractin Alpha
ActR-2B : Actin-Related Protein 2 Homolog B, Centractin Alpha
ADRB2 : Adrenoceptor Beta 2
AGO1 : Argonaute RISC Catalytic Component 1
AGO2 : Argonaute RISC Catalytic Component 2
AKT : V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene
ALK3 = BMPR1A Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type IA
ANKRD1 : Ankyrin Repeat Domain 1
APH1C : Anterior Pharynx Defective 1 Homolog C
ARNm : Acide ribonucléique messenger
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4
BMP6 : Bone Morphogenetic Protein 6
BMP7 : Bone Morphogenetic Protein 7
BMPR-1A : Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type IA
BMPR-1B : Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type IB
BMPR2 : Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type II
CCP16 : Clara cell protein 16
CCSP : Clara Cells 10 KDa Secretory Protein
CH25H : Cholesterol 25-Hydroxylase
CHPT1 : Choline Phosphotransferase 1
CI : Cubitus interruptus
CLU : Clusterin
CMP : Cytidine monophosphate
COUP-TFII = NR2F2 Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 2
COX : Cyclooxygenase
COX-1 = PGHS1 Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1 (Prostaglandin G/H Synthase And Cyclooxygenase)
COX-2= PGHS2 Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (Prostaglandin G/H Synthase And Cyclooxygenase)
CPAP : Ventilation en pression positive continue de l'anglais, Continuous Positive Airway Pressure
CRABP : Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP-1 : Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1
CRBP-2 : Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2
CREBBP : CREB Binding Protein γ
CTNNA1 : Catenin (Cadherin-Associated Protein), Alpha 1
CTP : Cytidine triphosphate
DBP : Dysplasie broncho-pulmonaire
DDIT4 : DNA-Damage-Inducible Transcript 4
DDX3Y : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Helicase 3, Y-Linked
DEPC : Diethylpyrocarbonate
DHT : Dihydrotestostérone

DKK : Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor
DKK1 : Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1
DLL1 : Delta-Like 1
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPC : 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DSH = DVL Dishevelled
DSPC : Phosphatidylcholine disaturée
DVL : Dishevelled
EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EGRI : Early Growth Response 1
EIF2S3Y : Eukaryotic Translation Initiation Factor 2, Subunit 3 Gamma
ENaC : Epithelial sodium channel
ER : Estrogen receptor
Erb : Erb Receptor Tyrosine Kinase
ERK = MAPK Extracellular Signal-Regulated Kinase 2
ESR1 : Estrogen Receptor 1
ESR2 : Estrogen Receptor 2
ETS : V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene
EXPH5 : Exophilin 5
FAS : Fas Cell Surface Death Receptor
FC : Fold change
FDR : False discovery rate
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGF1 : Fibroblast Growth Factor 1
FGF10 : Fibroblast Growth Factor 10
FGF13 : Fibroblast Growth Factor 13
FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2
FGF7 : Fibroblast Growth Factor 7
FGF9 : Fibroblast Growth Factor 9
FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FGFR2 : Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FGFR2B : Fibroblast Growth Factor Receptor 2B
FGFR2C : Fibroblast Growth Factor Receptor 2C
FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FGFR4 : Fibroblast Growth Factor Receptor 4
FLK1 = KDR Fetal Liver Kinase 1
FLT1 : Fms-Related Tyrosine Kinase 1
FOG2 = ZFPM2 Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2
FOXA1 : Forkhead Box Protein A1
FOXA2 : Forkhead Box Protein A2
FPF : Fibroblast-pneumonocyte factor
FZD : Frizzled Class Receptor
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GATA6 : GATA Binding Protein 6
G/D : Gauche/Droite

GD = ***JG*** Jour de gestation de l'anglais gestation day
DGAT2 : Diacylglycerol O-Acyltransferase 2
GDF : Growth Differentiation Factor
GDNF : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GLI : Glioma-Associated Oncogene
GLI2 : GLI Family Zinc Finger 2
GO : Gene ontology
GPX : Glutathione Peroxidase
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HEY1 : Hes-Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1
HEY2 : Hes-Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2
HFH4 = FOXJ1 Hepatocyte Nuclear Factor 3 Forkhead Homolog 4
HFH8 : Hepatocyte Nuclear Factor Forkhead Homolog 8
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIP1 : Huntingtin Interacting Protein 1
HIST1H3C : Histone Cluster 1, H3c
HMBS : Hydroxymethylbilane Synthase
HNF-3 α = FOXA1 Hepatocyte Nuclear Factor 3, Alpha
HNF-3 β = FOXA2 Hepatocyte Nuclear Factor 3, Beta
HOX : Homeobox
HOXA5 : Homeobox A5
HOXB5 : Homeobox B5
HOXC5 : Homeobox C5
HPRT1 : Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
IGF : Insulin-Like Growth Factor
IGF1 : Insulin-Like Growth Factor 1
IGF1R : Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IGF2 : Insulin-Like Growth Factor 2
IGF2R : Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor
IGFBP : Insulin-Like Growth Factor Binding Protein
IGFBP3 : Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3
IGFBP5 : Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5
IKBKG : Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells, Kinase Gamma
IPA : Ingenuity pathway analysis
JG : Jour de gestation
JNK : C-Jun N-Terminal Kinase
K18 : Keratin 18
KGF : Keratinocyte Growth Factor
KLF5 : Kruppel-Like Factor 5
KO : Knockout
L/S : Lécithine/sphingomyéline
LRP : LDL- related protein
LDL : Low density lipoprotein
LEM2 = LEMD2 LEM Domain Containing 2
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LIFR : Leukemia Inhibitory Factor Receptor Alpha

LPC : Lysophosphatidylcholine
LPCAT : Lysophosphatidylcholine acyltransférases
LPCAT2 : Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2
LPCAT4 : Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 4
LPINI : Lipin 1
LTBP : Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein
LTBP3 : Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 3
LTBP4 : Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4
MBOAT2 : Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 2
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MMP : Matrix Metallopeptidase
MMP10 : Matrix Metallopeptidase 10
MMP2 : Matrix Metallopeptidase 2
ncRNA : Acide ribonucléique non codant de l'anglais, non-coding RNA
NKX : Homeobox Protein
NKX2 : NK2 Homeobox
NKX2.1 : NK2 Homeobox 1
NOG : Noggin
NOTCH1 : Notch Homolog 1
NOTCH3 : Notch Homolog 3
NOTCH4 : Notch Homolog 4
NR2F2 = Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2 = **COUP-TFII**
NRG1 : Neuregulin 1 beta
OMS : Organisation mondiale de la santé
P38 : P38 MAP Kinase
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGFA = **PDGF α** Platelet-Derived Growth Factor Alpha Polypeptide
PDGFB = **PDGF β** Platelet-Derived Growth Factor Beta Polypeptide
PDGFC : Platelet Derived Growth Factor C
PDGFD : Platelet Derived Growth Factor D
PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDGFR α : Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha Polypeptide
PDGFR β : Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Beta Polypeptide
PEA3 : Ets Variant
PECAM : Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGD2 : Prostaglandin D2 Synthase
PGDH : Prostaglandin Dehydrogenase 1
PGE2 : Prostaglandin E2
PGF2 : Prostaglandin F2
PGHS-1 = PGH Synthase 1 = **COX-1**
PGHS-2 = PGH Synthase 2 = **COX-2**
PI3K = **PIK3** Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PIGF : **Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class F**
PKC : Protein Kinase C

PLA2 : Phospholipase A2
PN : Post-Natal
PPI : Protein Phosphatase 1
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PTCH : Patched 1
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog
PTGS1 = Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1 = ***COX-1***
PTI : Pneumocyte type I
PTII : Pneumocyte type II
QPCR : PCR quantitative, PCR en temps réel
RA : Retinoic Acid
RAR : Retinoic Acid Receptor
RARB = ***RAR β*** Retinoic Acid Receptor, Beta
RAR γ : Retinoic Acid Receptor, Gamma
RHOA : Ras Homolog Family Member A
RMA : Robust multiarray average
RNY3 : RNA, Ro-Associated Y3
RPL13A : Ribosomal Protein L13a
RPM : Rotation par minute
RRAS : Related RAS Viral (R-Ras) Oncogene Homolog
RXR : Retinoid X Receptor
SDHA : Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A, Flavoprotein
SDR : Syndrome de détresse respiratoire
SEMA3A : Semaphorin IIIA
SFTPA = ***SP-A*** Surfactant Protein A
SFTPB = ***SP-B*** Surfactant Protein B
SFTPC = ***SP-C*** Surfactant Protein C
SHH : Sonic Hedgehog
siRNA : ARN Interférant de l'anglais Small interfering RNA
SLC34A2 : Solute Carrier Family 34 (Type II Sodium/Phosphate Cotransporter), Member 2
SLC40A1 : Solute Carrier Family 40 (Iron-Regulated Transporter), Member 1
SMAD : SMAD Family Member
SMAD1 : SMAD Family Member 1
SMAD2 : SMAD Family Member 2
SMAD3 : SMAD Family Member 3
SMAD4 : SMAD Family Member 4
SMAD5 : SMAD Family Member 5
SMAD6 : SMAD Family Member 6
SMAD7 : SMAD Family Member 7
SMAD8 : SMAD Family Member 8
SMO : Smoothened, Frizzled Class Receptor
SP-D : Surfactant Protein D
SPRY : SPRY Domain Containing
SPRY4 : SPRY Domain Containing 4
SRP : Particule de reconnaissance du signal de l'anglais, recognition particule
SRY : Sex Determining Region Y

STAT3 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
STK40 : Serine/Threonine Kinase 40
T/EBP : Thyroid-specific enhancer-binding protein
TABI : Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase-Binding Protein 1
TBX4 : T-Box Protein 4
TBX5 : T-Box Protein 5
TCF : Transcription Factor
TCF4 : Transcription Factor 4
TCF7 : Transcription Factor 7
TGF β 1 : Transforming Growth Factor, Beta-Induced, 68kDa
TGF β 3 : Transforming Growth Factor, Beta Receptor III
TGF α : Transforming Growth Factor, Alpha
TGF β : Transforming Growth Factor, Beta
TGF β 1 : Transforming Growth Factor, Beta 1
TGF β 2 : Transforming Growth Factor, Beta 2
TGF β 3 : Transforming Growth Factor, Beta 3
TGF β R2 : Transforming Growth Factor, Beta Receptor II
TGF β R1 : Transforming Growth Factor, Beta Receptor I
THY-1 : Thy-1 Cell Surface Antigen
TIMP : TIMP Metallopeptidase Inhibitor
TIMP3 : TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
TSC-22 : TSC22 Domain Family
TTF1 : Transcription Termination Factor, RNA Polymerase I
UTY : Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Containing, Y-Linked
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor = **FLK1**
VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VIM : Vimentin
WNT : Wingless-Type MMTV Integration Site Family
WNT2 : Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 2
WNT5A : Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5A
WNT7B : Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7B
ZFPM2 = Zinc Finger Protein Member 2 = **FOG2**
ZFYVE9 : Zinc Finger, FYVE Domain Containing 9
 α -SMA : Alpha smooth muscle actin

***« Je suis le maître de mon destin,
Je suis le capitaine de mon âme... »***

Invictus de William Ernest Henley

*A mes parents adorés,
Véronique et Philippe*

Remerciements

À l'issue de la rédaction de ma thèse, je suis convaincue que ce travail commencé il y a longtemps dans une grande et belle ville du sud de la France est loin d'être un travail que j'aurais pu faire toute seule. Je n'aurais jamais pu mener à bien ce long cheminement sans le soutien d'un bon nombre de personnes dont l'amour, la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à mon égard m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprentissage ».

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur Dr. Yves Tremblay pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer mes études doctorales. Je tiens à le remercier pour sa grande patience, son ouverture d'esprit et son implication dans de nombreux congrès qui nous ont permis d'échanger et d'apprendre aux contacts des autres. J'ai été sensible à ces qualités relationnelles et je ne sais comment exprimer ma gratitude autrement qu'en promettant d'agir comme on me l'a appris, de donner mon maximum dans mes projets futurs tout en étant fier de ce que j'ai accompli dans le laboratoire du Dr. Yves Tremblay.

Je tiens particulièrement à remercier mon co-directeur, Dr. Pierre R Provost pour son travail acharné, ses conseils, sa patience et les longues heures consacrées à diriger mes recherches. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité, son grand secours au cours de certains moments plus difficiles, son implication dans la relecture de mon manuscrit et les conseils qu'il a pu me donner pour la correction. J'espère faire honneur à ce qu'il m'a appris tout au long de ma carrière.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à Mr Niel du collège de Duclair. Ce fut le professeur qui me donna le goût des sciences et l'envie de faire des études de médecine. S'il doit y avoir un professeur durant toutes mes années d'études à qui je voudrais dire un petit mot c'est lui. Merci Mr Niel, vous y êtes pour quelque chose si j'en suis là aujourd'hui.

Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire que j'ai côtoyé ces dernières années. Je suis particulièrement reconnaissante à Marc Simard et Eric Boucher pour leur « mentorat » à mon arrivée, ce fut des moments très sympathiques et j'en garde de très bons souvenirs. Merci à ma collègue Wafae Bouaddihoui pour tous les moments partagés, ce fut un réel plaisir de te côtoyer, je fais confiance au destin pour nous remettre un jour sur le même chemin.

Merci beaucoup à Catherine Gilbert qui fut « mon étudiante » longtemps. Merci pour ton amitié, ta patience et ton excellent travail dans le cadre de ton stage. Merci à Sonia Morisset pour son aide, son soutien et son amitié qui m'a aidé à franchir des montagnes... Merci aux membres des différentes équipes du centre de recherche avec qui j'ai partagé et échangé, vous me manquerez.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif durant ces longues années d'études.

Mes chers amis d'enfance, Mlle Pauline Feugray et son compagnon David, Mr Boris Aubourg, Mr Pascal Romain et son petit bonhomme Noha et Mr Kevin Balguerie. Je vous aime tellement ! On ne se voit pas souvent, mais je sais qu'on est tous là les uns pour les autres et c'est ça qui compte. Peu importe le temps qui passe sans se parler ou se voir, je sais que nous nous reverrons et que rien n'aura changé...

Je souhaiterais particulièrement remercier mes amis Rémi Tremblay et Jean Thivierge. Vous m'avez accueillie à Québec, choyé, aimé... Je pense que si vous n'aviez pas été là j'aurais repris l'avion dans l'autre sens. J'ai en tête tellement de bons moments avec vous. Je me sens privilégiée de vous avoir dans ma vie. Jean chéri ne change pour rien au monde, tu ne te rends pas compte à quel point tu fais du bien autour de toi... Je t'aime mon ami.

Merci à Mr P. et sa « grande » famille, on vous aime tellement et on a déjà hâte de se retrouver autour d'un bon souper.

Merci à ma merveilleuse amie Clotilde Maurice, sans toi les choses n'auraient jamais été pareille. Notre amitié m'est précieuse. J'ai en tête nos sorties filles où on se vidait le cœur tout en découvrant les restaurants et la vie de Québec, mais aussi nos sorties patins, nos congrès et ...la rencontre de nos québécois.

Merci à tous mes amis d'Europe et d'ici, mon frère de coeur Laurent Thomas, sa femme Alison et ses enfants chéris Lucas et Romane, Mélanie Brien, Joée Labranche, Dominique Ferland et leurs enfants, Olivier Simard, Sandra Bélanger, Guillaume Bard, Martine Bénard, Mickaël Di-Luoffo, Caroline Morgane Prévost et son petit Noam. Merci à tous, Merci de faire partie de ma vie.

Ma meilleure amie, Catherine Brousseau. Sans toi la vie serait bien triste. Tu sais me remonter le moral quand tout va de travers et tu m'accompagnes dans toutes les étapes de ma vie. Ma chérie nous allons trouver plein d'autres occasions de rire et pleurer de tout et de rien. Je te le promets. Je t'aime. Merci à ton chum Vincent Tremblay d'être si bon envers nous, merci d'être un si bon ami pour moi Vincent et de prendre soin de ma petite chérie... et mon petit minou d'amour Béatrice. Tata Mag sera là pour toi mon petit cœur. Grandis, vie et découvre... On sera là pour chaque instant.

Je voudrais remercier ma famille proche, Chantal, Hervé et Virginie d'avoir toujours été à mes côtés, bienveillants et aimant... je pense à vous souvent.

Merci à Jean-Paul, Sophie, Pascal, Patricia, Anne, Jean-Pierre et mes cousins cousines... Merci pour votre soutien et tout l'intérêt que vous me manifestez.

Merci à ma famille de coeur Martineau-Leclerc. Monique et Mario merci d'être entrée dans ma vie, de m'avoir accueillie avec mes différences et mes coutumes. Merci de m'aimer telle que je suis et d'être là. Cette présence a tellement aidé... Merci à vous.

Pour leur présence et leur amour, je souhaite remercier mes grands-parents Michel et Gilberte. Je ne sais pas s'il est possible de grandir avec plus grand amour que j'ai pu recevoir de votre part. Merci de vous accrocher à la vie et d'être toujours là pour nous.

Je ne peux pas faire autrement que d'avoir une pensée particulière pour feu mon grand-père Michel Belhache.

Papy où que tu sois je pense à toi, j'espère que tu es fier de moi...

D'un côté plus personnel...

Merci à mes petits minous Ploum, Mezzo et Lily de m'avoir accompagnée dans mes années d'études. Vous avez été de précieux facteurs de réussite.

Je voudrais remercier ma petite sœur Sarah pour son amour et son aide durant les moments difficiles de l'écriture. Je suis tellement fière de toi, de ce que tu accomplis. Je n'ai aucun doute sur la belle vie qui t'attend et chanceux sera l'homme qui la partagera avec toi. Je t'aime

J'ai eu la chance dans ma vie de rencontrer une personne qui partage mes valeurs et qui est devenue d'une importance vitale. Il me soutient par sa force, son énergie et son amour. Il s'agit de mon merveilleux conjoint Martin Leclerc. Je ne pourrais résumer en quelques lignes tout ce qu'il représente pour moi, mais tout ce que j'ai pu souffrir, il l'a souffert... N'est-ce pas là le véritable amour ? Moi j'en suis convaincue. Merci mon baby d'être ce que tu es. Notre vie commence... Je t'aime tellement.

Comment parler de moi sans parler d'eux, mes parents chéris je vous dois tant, c'est grâce à vous que j'affronte les épreuves de la vie et cette thèse vous est dédiée.

Comment ne pas commencer par toi maman, celle que j'aime tant, je suis si fière de toi, de la belle personne que tu es. Courageuse et généreuse, j'espère tellement te ressembler et avoir envers mes enfants autant de douceur et de patience que tu as pu avoir avec moi. Il ne peut pas y avoir meilleure maman que toi.

Papa grâce à toi je sais ce qu'est la détermination et le courage. J'accomplis les choses en me demandant souvent comment toi tu les ferais. Je me tiens droite et j'avance en me disant que mon père est là. Je t'aime tellement, tu as cet amour pour moi qui n'a jamais failli et j'espère ne jamais te décevoir.

Je sais que toutes les reconnaissances tant professionnelles que personnelles que l'on m'attribuera c'est grâce à vous que je les aurai mérités. Tout ceci est pour vous.

Vous être le premier amour que j'ai connu et ce sentiment est éternel, merci de m'aimer comme vous le faites si merveilleusement.

Mes espoirs et mes rêves m'appartiennent désormais et cela grâce à vous ...

Avant-Propos

Cette thèse comporte cinq chapitres et est présentée selon le modèle de la thèse classique. Le premier chapitre est une introduction aux concepts sur la prématurité et sur la morphogenèse pulmonaire. Dans le chapitre II et chapitre III sont présentés notre méthodologie et nos résultats. Le chapitre IV est consacré à une discussion des résultats les plus pertinents de notre étude et finalement le chapitre V revient sur nos conclusions générales et ouvre la voie à de futures études.

Notre étude comporte deux volets pour lesquels, j'ai contribué à l'élaboration du plan expérimental, j'ai effectué l'ensemble des expériences, notamment l'analyse et l'interprétation des résultats de biopuces ADN, la collecte de tissus pour les biopuces et les qPCR. J'ai effectué la plupart des manipulations animales pour les tissus ayant servi aux biopuces et j'ai complété nos échantillonnages pour les validations avec des accouplements réalisés avec l'aide de Mlle Sarah Tremblay et Mlle Catherine Gilbert qui étaient stagiaires au laboratoire. J'ai interprété et analysé les résultats présentés dans cette thèse. Deux articles sont en préparation et devraient être soumis d'ici la fin de l'année 2016.

Cette étude a été réalisée avec la contribution des co-auteurs suivants :

Yves Tremblay, Ph.D : Le Dr Tremblay est mon directeur de recherche pour ma thèse de doctorat. Il est professeur titulaire dans le département de Gynécologie, Obstétrique et de Reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Son laboratoire est situé au centre de recherche du CHU de Québec. Il a été impliqué dans la supervision globale du projet, la conception et le devis expérimental de l'étude et l'analyse des résultats.

Email : yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca

Pierre R Provost, Ph.D : Le Dr Provost est mon co-directeur de recherche pour ma thèse de doctorat. Il est professeur associé au département de Gynécologie, Obstétrique et de Reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il a été impliqué dans la conception et le devis expérimental de l'étude et l'analyse des résultats.

Email : pierre.provost@crchudequebec.ulaval.ca

Durant ma thèse de doctorat, j'ai eu plaisir à encadrer des étudiants, dont Mlle Catherine Gilbert qui a par la suite fait une Maîtrise dans notre laboratoire, et j'ai eu la chance de collaborer au projet de recherche de Mlle Clotilde Maurice dans le laboratoire du Dr Janice Bailey du département des Sciences Animales de l'Université Laval. L'étude portait sur les effets négatifs d'une exposition prénatale au mélange d'organochlorés contaminant l'Arctique sur la fertilité et la santé des mâles F1 âgés d'un an. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis dans *Journal of Development Origins of Health and Disease*. J'ai contribué à la manipulation des tissus et à l'analyse des résultats pour la section poumon. J'ai participé à la rédaction de l'article en tant que co-auteure avec Mlle Clotilde Maurice.

« *Prenatal exposure to an environmentally-relevant mixture of Arctic contaminants decreases male reproductive function and health in an aging rat model* »

Authors: Clotilde Maurice¹, Magaly Kaczmarczyk², Nancy Côté¹, Yves Tremblay², Sarah Kimmins³ and Janice L. Bailey¹

¹Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Département des Sciences Animales, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6

²Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Centre de recherche du CHUQ, Unité d'ontogénie-reproduction, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 4G2

³Department of Animal Sciences, McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, H9X 3V9 Canada and Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canada

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai reçu une bourse du Réseau de formation en recherche périnatale du Québec-IRSC (QTNPR); 2011-2015. Au sein du réseau, j'ai eu la chance de recevoir une formation transdisciplinaire via un microprogramme interdisciplinaire en périnatalité donnée à l'Université de Montréal. Cette formation enrichissante a élargi mon domaine d'expertise et a parfaitement complété mes études doctorales.

Dans le même ordre d'idée, j'ai eu la chance de participer à un forum dirigé par le Dr Yves Tremblay qui a abouti à la publication d'un livre électronique (version papier en cours d'édition).

Il s'agissait d'une réflexion transdisciplinaire autour de la réanimation des nouveau-nés prématurés. Ce livre est disponible au lien fourni ci-dessous :

http://www.fmed.ulaval.ca/prema/seuil_d'age_gestationnel_pour_la_reanimation_du_be_be_grand_premature.pdf

Pour ce travail, j'ai contribué en tant que co-auteure principale à la rédaction du chapitre portant sur la réflexion biomédicale, et en tant que co-auteure avec deux autres participants à la rédaction du chapitre final sur l'avis transdisciplinaire qui réunissait tous les aspects abordés par les différents auteurs.

CHAPITRE I : Introduction

I.1 Préambule

"À la vie, à la mort", un cycle immuable, deux réalités extrêmes parfois rendues indissociables lors des naissances prématurées. Notre thématique générale parle de cette dualité entre une dynamique de vie qui s'installe et une dynamique de mort qui menace.

Un fœtus a besoin d'un minimum de 37 semaines dans le ventre de sa mère pour que ses organes arrivent à maturité pour sa venue au monde. Cette considération n'étant pas toujours le reflet de la réalité, les naissances prématurées augmentent, et le temps imparti à la gestation continu à décroître. La recherche fondamentale a donc pour objectif de percer les mystères du développement fœtal, afin de procurer les outils nécessaires aux donneurs de soins pour optimiser les chances de survie du fœtus. Ces données ont une importance d'autant plus capitale que leur objectif n'est pas seulement de maintenir en vie, mais aussi d'assurer la qualité de vie future de l'enfant. Ce qui paraissait impensable il y a une vingtaine d'années est désormais réalisable grâce aux progrès techniques d'une part, mais aussi grâce à l'amélioration générale des connaissances scientifiques d'autre part. Si ces progrès ont permis d'abaisser le pourcentage de mortalité, les risques de troubles et de séquelles pathologiques après la naissance restent, en revanche, toujours très élevés, faisant de la prématurité une véritable problématique ancrée dans ce siècle aux enjeux médicaux, éthiques, légaux et économiques.

Nous ne sommes pas tous égaux dans ce combat, hommes et femmes ne sont pas les mêmes...

1.2 Prématurité : définition et conditions biologiques

En 2010, un enfant sur 10 naissait avant le terme de la grossesse, ce qui représente 15 millions de naissances prématurées par an. Plus d'un million de ces enfants décèdent en conséquence directe des complications liées à leur prématurité [1].

Avec un taux de naissance prématurée de 6.6% au Canada 1991 [2] et de 7.7% au Québec, la province présente des taux à la hausse comme ailleurs dans le monde. A l'échelle mondiale, la prématurité est la première cause de mortalité chez l'enfant de moins de 5 ans [3] et la plus importante cause directe de décès dans le premier mois de vie [4] de l'enfant.

1.2.1 Trois stades de prématurité

37 : c'est le nombre minimum de semaines d'aménorrhée pour une grossesse normale. L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit toute naissance vivante survenant avant cette date comme prématurée. On distingue trois stades : la prématurité moyenne, voire tardive, la grande prématurité et la prématurité extrême. La première catégorie concerne la période couvrant de la 32^e à la 36^e semaine de grossesse tandis que la deuxième comprend les naissances survenant entre la 28^e et la 31^e semaine de gestation. Enfin la prématurité extrême englobe les naissances survenant avant la 28^e semaine de grossesse. Bien que stable durant les cinq dernières années, le taux de naissances prématurées montre une forte augmentation depuis une vingtaine d'années. Plus de grossesses multiples et de traitement contre l'infertilité, des maternités plus tardives, des historiques d'accouchement prématuré ou encore un faible statut économique sont autant de paramètres qui peuvent expliquer cette tendance. Il existe toutefois d'autres facteurs susceptibles d'influencer le risque de prématurité tels que la prise de drogues, le stress, les maladies chroniques comme le diabète ou l'hypertension, les complications maternelles et fœtales d'ordre infectieuses et/ou inflammatoires, une influence génétique et le sexe fœtal [2]. 60% de ces naissances prématurées surviennent en Afrique et en Asie du sud comme exposé en Table 1. Toutefois, avec en moyenne 9% de bébés nés prématurément dans les pays à revenu plus élevé, le problème demeure planétaire (OMS). La prise en charge inégale géographiquement peut en partie

expliquer ces écarts. Le taux de survie va lui aussi varier en fonction des soins, mais aussi en fonction de l'âge gestationnel à la naissance. En effet, alors qu'il est de 11 à 30% à 23 semaines, il passe à 54-76% dès la 25^e semaine [5]. Une étude récente menée sur 4446 enfants nés prématurément entre 22 et 25 semaines de gestation a montré qu'en plus de l'âge gestationnel, d'autres facteurs tels que le sexe féminin du fœtus, la grossesse unique ou le poids à la naissance participent à une augmentation du taux de survie. Ces facteurs seraient équivalents à une semaine en terme de chances de survie. A contrario, le sexe masculin, les grossesses multiples et un retard de croissance fœtale pourraient obscurcir le pronostic [6].

Table 1 : Taux de naissances prématurées en 2010 selon le pays.

Pays	Taux de naissance prématurées^a
Malawi	18.1%
Congo	16.7%
Indonésie	15.5%
États-Unis	12.0%
Autriche	10.9%
Allemagne	9.2%
Brésil	9.2%
Pays-Bas	8.0%
Belgique	7.9%
Canada	7.8%
Royaume-Unis	7.8%
Australie	7.6%
Espagne	7.4%
Suisse	7.4%
Danemark	6.7%
France	6.7%
Maroc	6.7%
Norvège	6.0%
Japon	5.9%
Suède	5.9%
Finlande	5.5%
Irlande	5.5%
Bélarus	4.1%

^aDonnées extraites de Blencowe et al. [1]

1.2.2 Limite de viabilité

Seuil ou limite de viabilité est le terme consacré pour désigner l'âge gestationnel à partir duquel il est actuellement possible de survivre grâce aux techniques de réanimation néonatale. Cette limite mouvante varie d'un pays à l'autre car elle est liée aux progrès médicaux et à l'accès à ces soins (Table 2). A ce jour, le seuil de viabilité se situe autour de 22-23 semaines d'aménorrhée. Le fœtus qui évolue de la 12^e semaine jusqu'à terme acquiert son « individualisation » lui permettant au fil du temps de bouger, de sécréter des hormones, d'avalier, d'uriner puis d'avoir ses propres mouvements respiratoires en indépendance de sa mère. C'est un être en devenir. Mais il faudra attendre jusqu'aux alentours de la 24^e semaine pour que cette évolution soit suffisamment avancée pour lui permettre de survivre, avec assistance médicale, à la vie extra-utérine. Dans un avenir prévisible, il semble très peu probable, voire impossible de sauver des bébés encore plus jeunes. Ces bébés nés entre les semaines 24 et 25 appartiennent à une période de forte incertitude que l'on peut qualifier de « zone grise ». La recherche actuelle tend à améliorer la prise en charge des soins grâce à une meilleure compréhension des mécanismes permettant d'optimiser une maturation « accélérée » des systèmes d'organes.

1.2.3 Immaturité morphologique et/ou fonctionnelle des organes

La naissance prématurée de l'enfant interrompt son développement in utero. Les principaux risques de la prématurité sont en rapport avec l'immaturité tant morphologique que fonctionnelle des organes dans leur globalité à des degrés divers en fonction de chacun d'eux. Tous les organes sont présents mais pas encore aptes à supporter leurs rôles, même si tous n'ont pas le même déterminisme dans les complications mettant en jeu le pronostic vital ou psychomoteur de l'enfant.

Table 2 : Recommandations au sujet de la réanimation des bébés prématurés.
Exemple de lois encadrant la réanimation à la naissance des bébés prématurés dans trois pays bénéficiant de soins de première ligne.

ÉTATS-UNIS

23^e semaine de grossesse ou/et 400 grammes Aucune réanimation

Limite de viabilité : 23^e semaine de grossesse

Source : Textbook of Neonatal Resuscitation (6^e édition) [7]

ANGLETERRE

< 23^e semaine de grossesse Réanimation non recommandée

De la 23^e semaine de grossesse à 23 semaines +6 jours Réanimation à la demande des parents, sauf si le corps médical s’y oppose pour «*traitement intensif futile*»

De la 24^e semaine à 24 semaines +6 jours Réanimation, sauf en cas d’opposition des parents

>25^e semaine de grossesse Réanimation, traitement complet et intensif

Limite de viabilité : 23^e - 24^e semaine de grossesse

Source : The Nuffield Council on Bioethics 2006 [8]

FRANCE

< 24^e semaine de grossesse Pas de réanimation
 Prise en charge aux soins palliatifs

24^e semaine de grossesse Prise en compte du souhait des parents, estimation des risques/bénéfices d’une réanimation dans l’intérêt de l’enfant selon la situation

>24^e semaine de grossesse Réanimation, traitement complet et intensif

Limite de viabilité : 24^e - 25^e semaine de grossesse

Source : Commission d’éthique de la Société Française de Néonatalogie 2009 et 2012 [9]

Ainsi, du fait de leur prématurité, certains organes peuvent être directement responsables de la mortalité ou de la morbidité particulière aux prématurés, pour ces raisons, ces organes doivent être surveillés. C’est le cas du tube digestif, mais surtout du

poumon et du cerveau dont un aperçu vous est présenté ci-dessous. Une attention particulière sera accordée aux poumons et aux pathologies associées pour faciliter la compréhension de notre contexte d'étude.

1.2.3.1 Immaturité digestive

L'appareil gastro-intestinal du fœtus achève son développement autour de la 20^e semaine de grossesse. Toutefois ce dernier n'est pas encore entièrement fonctionnel. Certains mécanismes, tels que la coordination entre la succion et la déglutition, n'apparaissent habituellement qu'autour de la 33^e semaine. Le phénomène de contraction intestinale appelé péristaltisme et la synthèse suffisante d'enzymes nécessaires à la digestion du lait s'établissent quant à eux autour de la 29^e semaine. Les bébés prématurés de moins de 29 semaines vont bénéficier d'une période d'alimentation trophique en très petite quantité pour accélérer la maturation. Face à une immaturité de l'épithélium intestinale, les défenses immunitaires contre les infections bactériennes sont grandement perturbées. Le nouveau-né prématuré va présenter une réponse inflammatoire excessive aux stimuli microbiens qui va modifier la réponse de la barrière de protection de l'intestin. Des cytokines, telles que l'interleukine-8 sécrétée par l'épithélium, peuvent provoquer une migration des neutrophiles vers les sites d'inflammation susceptible de provoquer une nécrose de l'intestin [10, 11]. Cette pathologie appelée entérocolite nécrosante concerne 5% des enfants nés avant la 36^e semaine de grossesse dont 50% vont en mourir [12, 13].

1.2.3.2 Immaturité neurologique

Un autre type de complication reliée à la prématurité concerne le développement du cerveau et la mise en place des processus neurobiologiques. Des étapes essentielles au développement neurologique se produisent au cours des 6 dernières semaines de gestation [14]. Dans ces conditions, le spectre des troubles neurologiques dont le nouveau-né prématuré peut souffrir est large. Il s'étend des hémorragies intraventriculaires pouvant mener à l'hydrocéphalie ou une ischémie cérébrale avec leucomalacie périventriculaire, aux troubles de la coordination, aux déficiences

neurosensorielles et cognitives, aux déficits de l'attention avec difficultés d'apprentissage, aux troubles comportementaux et psychiatriques [5, 15]. De plus, dans les cas de prématurité extrême, une immaturité du système de contrôle respiratoire pouvant mener à des apnées est fréquemment observée, ce qui demande alors une assistance respiratoire jusqu'à ce que le mécanisme de réflexe apparaisse chez le nouveau-né [16].

1.2.3.3 Immaturité pulmonaire

Lors d'une naissance prématurée, l'immaturité structurale et fonctionnelle des poumons du bébé l'expose à plusieurs pathologies respiratoires. C'est en fin de grossesse que les mécanismes de maturation pulmonaire avec la production du surfactant pulmonaire, l'amincissement du mésenchyme et la réabsorption du liquide intrapulmonaire vont préparer le fœtus à sa vie extra-utérine. Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né (SDR), aussi appelé maladie des membranes hyalines, représente l'une des pathologies majeures dont peuvent souffrir les bébés nés prématurément. Il compte pour 75 % des cas de mort précoce chez ces enfants et peut conduire à des maladies pulmonaires chroniques [17].

Le SDR se définit par la présence d'une détresse respiratoire aiguë avec perturbation des échanges gazeux chez le prématuré. Cliniquement, elle est causée par une déficience dans la synthèse et la production du surfactant pulmonaire ou des éléments qui le composent, engendrant de ce fait une difficulté respiratoire apparente avec des geignements expiratoires, de la tachypnée et/ou de l'apnée. L'atélectasie pulmonaire et la réduction de la capacité pulmonaire sont les conséquences directes d'un déficit en surfactant. L'atélectasie est documentée selon une évolution clinique classique ou par radiographie : aspect en « verre dépoli » des poumons et bronchogramme aérien avec contraste bronche/parenchyme augmenté.

Plus la naissance est précoce, plus la sévérité et la morbidité du SDR risquent d'être élevées. L'occurrence du SDR sous toutes ses formes est approximativement de 80 % pour les enfants nés à 28 semaines de grossesse et moins, 65 % pour les enfants nés entre 29 et 30 semaines et 25 % pour ceux nés entre 31 et 34 semaines [18-20]. L'évaluation des risques de SDR est un enjeu majeur permettant d'améliorer les traitements visant à accélérer la maturation des poumons, ou d'essayer de retarder la délivrance. Dans une certaine mesure, il est possible d'évaluer la maturation des poumons de l'enfant à naître grâce à un décompte des corps lamellaires qui sont produits puis sécrétés par les cellules pneumocytes de type II (PTII) du poumon. Ces facteurs sont excrétés dans le liquide intrapulmonaire et se retrouvent dans le liquide amniotique d'où il est possible de faire un comptage [21-23]. La mesure du ratio lécithine/sphingomyéline (L/S) des phospholipides composant le surfactant est elle aussi possible dans le liquide amniotique et a longtemps servi de test de référence afin d'évaluer la maturation des poumons fœtaux. Selon le degré de maturation de l'organe, les niveaux de lécithine augmentent tandis que ceux des shingomyélines demeurent stables [24]. Les fœtus présentant un ratio L/S > 2 ont peu de probabilité de développer un SDR [25-27]. Une autre alternative de mesure est possible avec l'évaluation du rapport entre le surfactant et l'albumine dans le liquide amniotique grâce à une dépolarisation par fluorescence (Test TDx-FLM_{II}) [28, 29]. Cependant, cette technique présente parfois des résultats qui peuvent être biaisés par la présence de matières retrouvées naturellement dans le liquide amniotique [22, 30-32]. Finalement, la simple présence ou absence du phosphatidylglycérol peut servir de marqueur de maturation, car ce lipide n'est sécrété qu'à partir de la 35^e semaine de grossesse [24].

1.2.3.3.1 Approches thérapeutiques

Jusqu'à ce jour, une combinaison d'approches thérapeutiques a été développée et mise en place afin d'améliorer le pronostic respiratoire de ces nouveau-nés en assurant une fonctionnalité du poumon jusqu'à ce qu'il atteigne par lui-même un niveau de maturation suffisant. Différentes thérapies sont utilisées pour traiter le SDR notamment la corticothérapie anténatale, l'administration de surfactant exogène après la naissance et la ventilation assistée [33].

Les hormones glucocorticoïdes produites naturellement par l'organisme jouent un rôle important dans la régulation du développement et de la maturation pulmonaire. Dès 1969 il a été démontré chez l'agneau que les glucocorticoïdes régulaient positivement la maturation pulmonaire [33]. Ce n'est que quelques années plus tard que Liggins [34] a démontré que l'administration anténatale de glucocorticoïdes à des femmes présentant un risque d'accouchement prématuré avait la faculté d'accélérer la production de surfactant. Les niveaux de cortisol fœtaux, un glucocorticoïde actif, augmentent en fin de gestation, ce qui provoque une induction de la synthèse des composants du surfactant, une élimination du liquide intrapulmonaire et une différenciation des cellules du mésenchyme. De part leur effet de régulateur positif sur la maturation pulmonaire, les glucocorticoïdes ont été exploités avec succès dans des corticothérapies anténatales pour les grossesses à risque d'accouchement prématuré [34, 35].

En clinique, le protocole standard d'intervention recommandé en cas de risque d'accouchement prématuré au Canada, aux USA et en Europe [36, 37] préconise l'utilisation des glucocorticoïdes synthétiques suivant : la bétaméthasone et la dexaméthasone [38]. Leur structure est dérivée de celle du cortisol, mais comparativement à l'hormone naturelle, ces hormones synthétiques présentent une affinité supérieure pour le récepteur des glucocorticoïdes, une durée d'action plus longue, une activité anti-inflammatoire supérieure et des propriétés minéralocorticoïdes moindres, ce qui leur confère un pouvoir d'action plus rapide. Cependant, la bétaméthasone est souvent priorisée car elle présente un risque moins élevé de leucomalacie périventriculaire [39]. La corticothérapie anténatale permet une réduction

de 50% du risque de SDR, une diminution de la sévérité de cette pathologie ainsi que de la mortalité qui s'y rattache [40]. Toutefois, bien que des effets secondaires inhérents au traitement ont été rapportés par de nombreuses études (faible poids à la naissance, retard de croissance, réduction des mouvements fœtaux, etc.), le ratio bénéfice/risque reste en faveur de l'utilisation de cette thérapie [41, 42]. A l'heure actuelle, certains enfants ne répondent pas à la corticothérapie anténatale [43] et certaines questions persistent quant à l'utilisation de doses multiples et la meilleure période de la gestation pour les administrer [39, 41, 44-49]. En effet, des changements dans la morphologie pulmonaire (réduction du nombre d'alvéoles et augmentation de leurs tailles) peuvent être provoqués par les traitements répétés et entraîner l'apparition de maladies pulmonaires. Le prématuré qui présentera un SDR à sa naissance recevra des soins ventilatoires pour surmonter l'insuffisance respiratoire et bénéficiera d'un traitement avec du surfactant exogène pour contrer le déficit primaire en surfactant.

L'oxygénothérapie, la pression positive continue (CPAP), et la pression positive de ventilation sont les outils utilisés dans une thérapie respiratoire conventionnelle pour soutenir les poumons chez ces bébés prématurés [50]. Ces interventions ne sont toutefois pas sans conséquence et peuvent parfois mener à des inflammations chroniques et/ou changements morphologiques et physiologiques néfastes à la santé respiratoire future de ces patients. Le raffinement des protocoles de ventilation durant la dernière décennie a permis de faire chuter l'incidence de maladies causées par la ventilation à pression positive avec barotraumatisme et volu-traumatisme et l'utilisation de concentration d'oxygène élevée [51-54]. L'ensemble de ces paramètres peut déclencher une réponse inflammatoire du poumon et jouera un rôle dans l'inflammation et dans l'altération du poumon [55]. Parmi ces maladies associées à un développement pulmonaire altéré, on observe la dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) un trouble pulmonaire chronique du prématuré avec un faible poids à la naissance et ayant nécessité une ventilation mécanique souvent dans le cadre d'un SDR [56]. La DBP dite « classique » est définie par un processus d'inflammation sévère faisant suite à un SDR pour des enfants qui ont eu besoin d'une oxygénothérapie de longue durée. Pour ces enfants, des œdème pulmonaires, une fibrose péri-bronchiale, une métaplasie de l'épithélium aérien et une vascularisation anormale du poumon sont observés en plus de l'inflammation pulmonaire [57]. Il n'est pas inhabituel d'observer plus tard chez ces patients des séquelles comme un volume pulmonaire diminué en période néonatale, une

tolérance à l'effort limité pour le jeune enfant, de l'hypertension, une respiration sifflante et un risque important d'infection pouvant se prolonger jusqu'à l'âge adulte [58-60]. L'incidence de la DBP est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel à la naissance. Ce sont 30% des bébés nés prématurément avec un poids de naissance inférieur à 1500 g et 52% des bébés nés avant 28 semaines avec un poids de naissance de 501 à 750g qui présenteront une DBP [55].

Grâce au progrès en néonatalogie, notamment avec les traitements au surfactant exogène et les corticothérapies, la forme « classique » de la DBP, décrite comme sévère par Northway *et al.* [57] en 1967, est graduellement remplacée par une forme dite « nouvelle DBP » dont l'incidence clinique est caractérisée en 3 degrés. La DPB bénigne définie par une dépendance à la ventilation assistée passé 36 semaines d'âge gestationnel corrigé ou supérieur à 28 jours consécutifs d'oxygénothérapie, la DBP modérée pour un apport en oxygène inférieur à 30% à 36 semaines d'âge gestationnel et la DBP sévère quand l'apport en oxygène, à 36 semaines d'âge gestationnel, dépasse les 30% [61]. Chez ces patients qui ne souffraient pas nécessairement du SDR, la DBP se présente comme un défaut d'alvéolisation (simplification alvéolaire avec diminution du nombre d'alvéoles et une augmentation de leur taille), donc de septation, assorti d'une vascularisation pulmonaire anormale [62]. La pathologie est plus fréquente chez les prématurés extrêmes et les très grands prématurés [63]. Les traitements de la DBP visent à limiter les lésions pulmonaires grâce à une ventilation mécanique adaptée afin de fournir l'oxygène manquant et d'éviter les infections. L'administration de substances antioxydantes comme la vitamine A et l'enzyme superoxide dismutase, qui vont diminuer les radicaux libres, peut être envisagée pour le traitement dans le but de minimiser le stress oxydatif causé par l'oxygène [64, 65].

Le traitement par surfactant exogène est une pratique bien établie chez les prématurés souffrant de SDR. Le surfactant recouvre les surfaces alvéolaires des poumons, réduisant ainsi la tension de surface nécessaire à l'ouverture des voies respiratoires, ce qui augmente le volume pulmonaire et prévient l'atélectasie. Les préparations disponibles de surfactant exogène pour une utilisation clinique peuvent être naturelles ou synthétiques. La principale différence réside dans la composition de la

fraction protéique du surfactant. Le surfactant d'origine naturel est à base de produits animaux (bovins et porcins), qui sont des extraits lipidiques de tissus pulmonaires contenant les protéines du surfactant B (SP-B) et C (SP-C). La deuxième génération de surfactant d'origine synthétique contient essentiellement des phospholipides comme la phosphatidylcholine disaturée (DSPC) mais aucune protéine du surfactant. La recherche actuelle vise à développer une nouvelle génération de surfactant synthétique plus efficace en se rapprochant du surfactant naturel. En effet même si les deux types de surfactants sont efficaces dans la prévention et le traitement du SDR, le surfactant naturel semble être plus rapide et diminue le risque de mortalité et la durée de l'oxygénothérapie comparativement aux traitements avec des surfactants synthétiques. Toutefois, le surfactant naturel présente un risque de réaction immunologique due à la présence de protéines étrangères. Dans ces conditions, le développement d'un nouveau surfactant contenant à la fois des phospholipides et un peptide mimique de la protéine SP-B [66], ou des phospholipides et des analogues des protéines SP-B et SP-C combinées [67] est fortement encouragé.

1.2.4 Conclusion de la section

L'organisme du bébé né prématurément est par définition immature au moment de sa naissance. L'une des principales complications pour ces naissances est l'immaturité tant morphologique que fonctionnelle du poumon. C'est pourquoi la prématurité est associée non seulement à un taux de mortalité plus élevé que chez les enfants à terme, mais également à différentes séquelles pathologiques telles que la DBP. Pour toutes ces raisons, la décision de réanimer ou pas les enfants prématurés qui naissent à la limite de viabilité fait débat. Le taux plus élevé de séquelles chez ses enfants constitue un argument important dans la prise de décisions des praticiens et des parents. Afin de mieux comprendre le défi pour la survie dans lequel s'engage l'enfant né « trop tôt », nous ferons, dans la section suivante, une description des différentes étapes du développement pulmonaire amenant un simple bourgeon à devenir un organe essentiel à la vie.

1.3 Le poumon fœtal

Nécessaire à la survie sur terre, le poumon est un organe arborescent dont le développement commence dès les premiers jours ou premières semaines de gestation selon les espèces et qui se poursuit après la naissance. On désigne par le terme « organogenèse pulmonaire » la formation et le développement du poumon qui se divise en deux régions fonctionnelles dites région conductrice et région respiratoire (Figure 1). La partie conductrice comprend : la cavité nasale, le pharynx, la trachée, les bronches et les bronchioles. On retrouve dans cette région différents types cellulaires dont les fibroblastes dites cellules de soutien, les cellules ciliées, les cellules calciformes et les cellules basales. La région respiratoire est composée principalement de deux types cellulaires, les pneumocytes de types 1 et 2 (PTI et PTII) que l'on retrouve au niveau des alvéoles où ont lieu les échanges gazeux.

Durant la grossesse, c'est le placenta qui va être le siège d'échanges essentiels permettant d'apporter de l'oxygène au fœtus et d'évacuer le gaz carbonique. A sa naissance, le poumon du fœtus doit prendre la relève et assurer ses propres échanges gazeux nécessaires au fonctionnement de l'organisme. Il s'agit de fournir de l'oxygène aux cellules qui vont métaboliser le glucose et fournir l'énergie nécessaire au métabolisme des cellules. Un degré de développement et de maturation insuffisant du poumon, à l'origine des maladies pulmonaires du nouveau-né prématuré, peut se traduire par un apport insuffisant d'oxygène, une accumulation de dioxyde de carbone dans l'organisme. L'approvisionnement insuffisant du cerveau en oxygène peut conduire à la mort en quelques minutes.

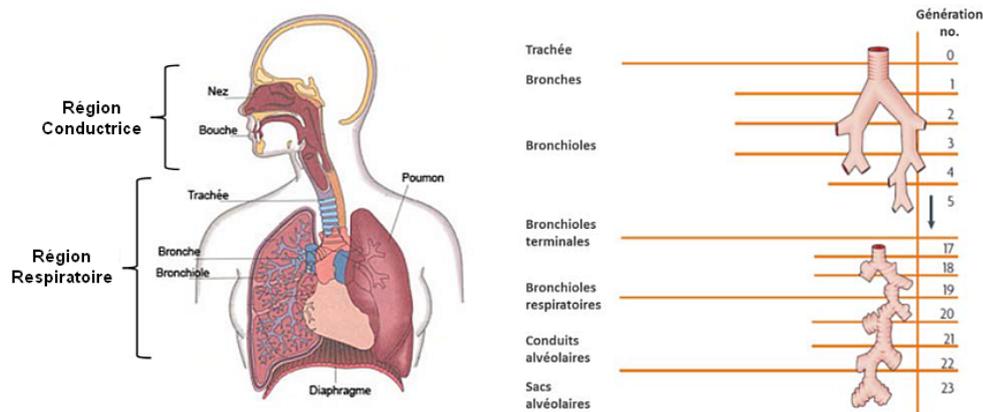


Figure 1 : Illustration des régions conductrices et respiratoires du poumon humain et nombre d’embranchements de la trachée aux sacs alvéolaires. Adapté de [68]

1.3.1 Le développement au cours du temps.

Le développement du poumon débute autour de la 5^e semaine de gestation chez l’humain, et au jour de gestation (JG) 9 chez la souris. La nomenclature des différents stades de développement pulmonaire est basée sur l’aspect morphologique de l’organe. Ainsi, le développement pulmonaire est subdivisé en cinq stades morphométriques : le stade embryonnaire, le stade pseudoglandulaire, le stade canaliculaire, le stade sacculaire et le stade alvéolaire [69, 70]. De plus, le dernier stade peut se diviser en deux étapes : alvéolaire et microvasculaire, caractérisé par une maturation microvasculaire [71]. Les limites des périodes de gestation associées aux différents stades du développement peuvent légèrement varier selon les auteurs [17, 72-75]. Le processus de différenciation du poumon fœtal ne s’effectue pas de façon synchronisée entre les différents lobes. Il commence au centre (partie rostrale) en s’en allant vers la périphérie (partie caudale), ce qui engendre un chevauchement temporel entre les stades de développement décrit. Bien que l’ensemble des mammifères partage les mêmes stades de développement pulmonaire, la synchronisation des évènements incluant le moment où la synthèse du surfactant survient et le moment où la naissance intervient par rapport au développement pulmonaire peut varier [76]. Dans les lignes qui vont suivre, nous ne décrirons que le processus chez l’humain en faisant le parallèle avec la souris (Figure 2). Leurs développements suivent le même schéma, mais dans une période beaucoup plus restreinte pour la souris. Notons que le stade alvéolaire chez

l'humain débute in utero dès la 36^e semaine de gestation tandis que chez la souris, ce stade ne débute qu'environ 5 jours après la naissance. Ceci signifie que la naissance des souris a lieu durant le début du stade sacculaire, ce qui fait de cet animal un excellent modèle pour les études se rapportant au stade sacculaire et au stade alvéolaire.

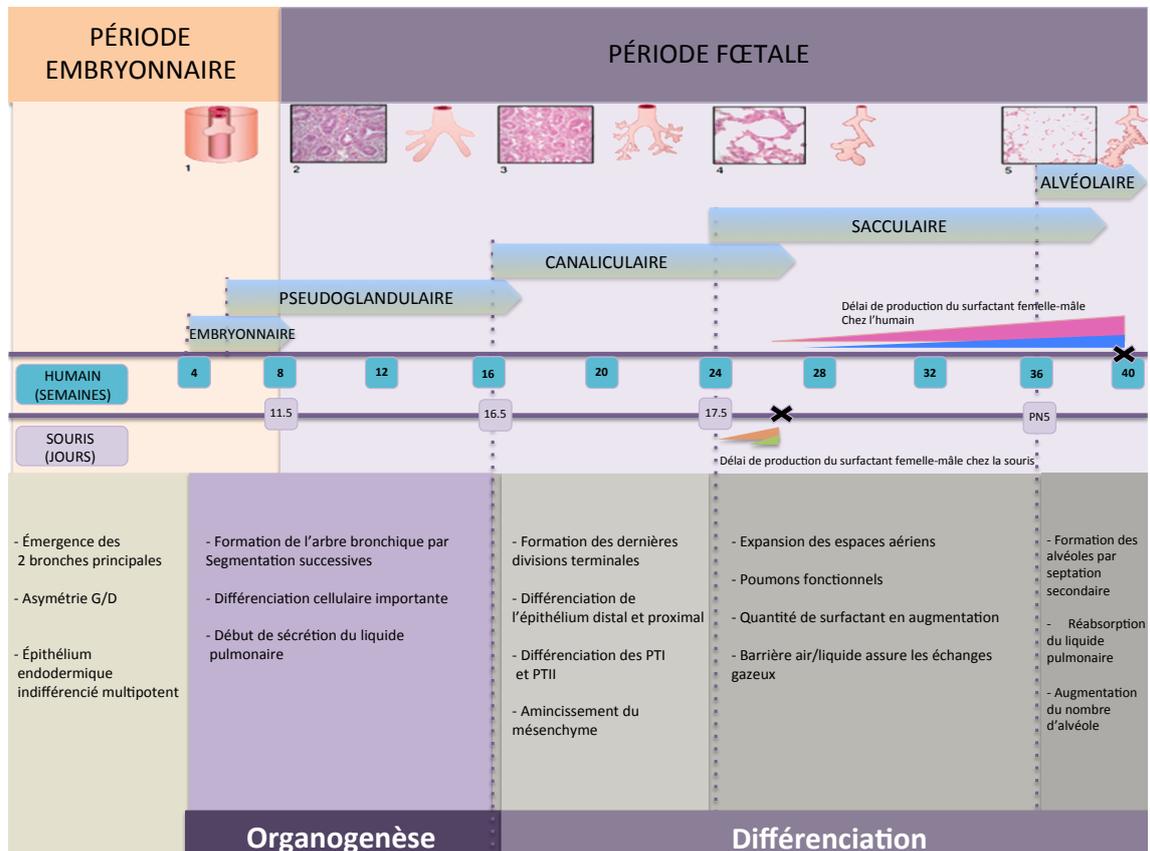


Figure 2 : Développement pulmonaire chez l'humain et chez la souris.

Les différents stades du développement pulmonaire sont présentés sur le schéma chronologique chez l'humain (en semaine de gestation) et chez la souris (en jours). Les événements importants du développement sont notifiés pour chaque stade et la montée de synthèse du surfactant est représentée par des triangles : roses et bleu pour l'humain filles et garçons, respectivement, et orange et vert pour la souris femelles et mâles, respectivement. La naissance est indiquée par une croix noire sur chaque schéma chronologique. Les différents stades sont présentés par des schémas et des images histologiques de tissus pulmonaires. Adaptée de Seaborn *et al.* [77].

1.3.1.1 Stade embryonnaire

De la 4^e à la 6^e semaine de gestation chez l'humain a lieu la phase embryonnaire qui est caractérisée par la formation des structures primaires du poumon : les bronches primaires et les lobes pulmonaires. La formation d'un diverticule ventral (environ 28 jours après la conception), par invagination de l'épithélium endodermique qui recouvre le pharynx primitif antérieur, marque le début du développement du poumon. L'ébauche

trachéo-bronchique (feuillet endodermique; vers le 30^e jour post-conception) est en interaction avec le feuillet mésodermique du mésenchyme. Les cellules épithéliales de l'endoderme vont envahir le mésenchyme et donner naissance aux bourgeons des deux bronches principales (33^e jour post-conception). Ces bourgeons deviennent asymétriques et définissent les poumons gauche et droit, ainsi que les différents lobes dont le nombre peut varier d'une espèce à l'autre [78]. Chez l'humain, le poumon gauche est formé de deux lobes et le droit de trois lobes. La souris a quatre lobes du côté droit et ne possède qu'un seul lobe du côté gauche. Durant ce stade, les cellules épithéliales et mésenchymateuses prolifèrent tandis que l'on observe de l'apoptose autour des régions où sont formés les nouveaux bourgeons et autour des zones de ramification des voies aériennes. Le mésenchyme est composé de cellules primitives qui se différencieront en cellules progénitrices des futurs vaisseaux sanguins et lymphatiques, en cartilage, en muscle lisse et en composants du tissu conjonctif. L'épithélium endodermique indifférencié de l'ébauche pulmonaire est multipotent à ce stade et pourra générer un grand nombre de types cellulaires spécialisés qui se différencieront au sein de l'organe. A l'issue de ce stade commence la période fœtale qui va persister jusqu'au terme de la grossesse.

1.3.1.2 Stade pseudo-glandulaire

Le stade pseudo-glandulaire est caractérisé par la complexification de l'arbre trachéo-bronchique et la formation des voies conductrices allant de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales selon une série de divisions dichotomiques [79]. Cette ramification du poumon fœtal s'accompagne d'une prolifération et migration des cellules épithéliales, d'une prolifération du mésenchyme et d'un remodelage de la matrice extracellulaire. Ce stade s'étend de la 7^e à la 17^e semaine de gestation chez l'humain et des jours de gestation 11.5 à 16.5 chez la souris (Figure 3).

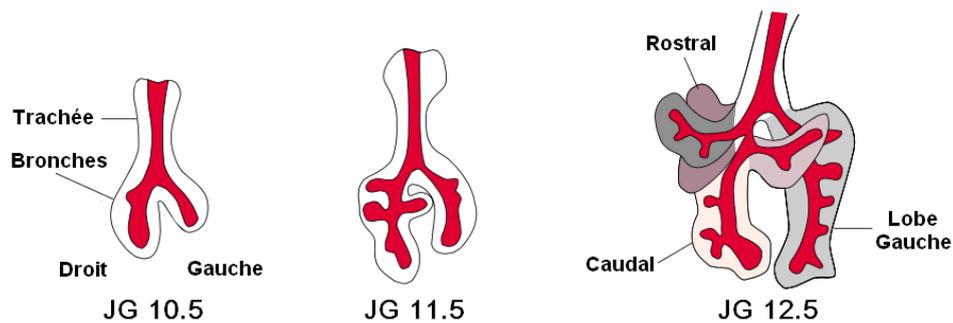


Figure 3 : Embranchement chez la souris durant le stade pseudoglandulaire.

Adaptée de Bellusci et al. [80].

Les 16 premières divisions de l'arbre bronchique seront complétées à la fin de ce stade chez l'humain tandis que, chez la souris, le processus « d'arborisation » a principalement lieu entre les jours de gestation 11.5 et 13.5. L'épithélium pseudo-stratifié des parties conductrices du poumon apparaît cylindrique dès la 13^e semaine de grossesse chez l'humain. L'épithélium se différencie en commençant par le centre de l'arbre bronchique vers les régions distales. Les cellules épithéliales apparaissent avec des phénotypes plus différenciés en cellules épithéliales ciliées, en cellules en gobelets et en cellules progénitrices des cellules sécrétrices appelées cellules de Clara. Durant cette période, l'épithélium différencié amorce la sécrétion du liquide pulmonaire qui remplit le poumon (90 à 95 % du poids du poumon). Le liquide pulmonaire est essentiel à la maturation, il provient de la sécrétion active d'ions chlore dans de l'eau. Ce liquide va largement participer à l'expansion des aires d'échanges. Au terme de ce stade, les premières cellules précurseurs des pneumocytes apparaissent dans l'épithélium tandis que certaines régions périphériques continuent à présenter un épithélium cubique peu différencié. Ces cellules peu différenciées de la région distale de l'arbre bronchique sont nécessaires pour que la division se poursuive dans le tissu conjonctif. La matrice extracellulaire se diversifie à ce stade, elle est désormais composée de différents glycosaminoglycanes et protéoglycanes, tels que la chondroïtine et l'héparane sulfate (héparine), mais aussi la laminine, la fibronectine, la ténascine et le collagène [81, 82]. Ces macromolécules vont jouer un rôle important dans les processus de prolifération, différenciation, adhésion et migration cellulaire durant le développement normal du poumon.

1.3.1.3 Stade canaliculaire

De la 17^e à la 25^e semaine de grossesse chez l'humain, le stade canaliculaire est caractérisé par 3 événements : l'apparition de l'acinus (structure de base pour les échanges gazeux), la différenciation des cellules épithéliales et le début de la synthèse du surfactant pulmonaire à la toute fin de cette période. Chez la souris, ce stade survient entre les jours de gestation 16.5 à 17.5. Le développement précoce du parenchyme pulmonaire débute par un élargissement et une division des voies aériennes distales qui formeront les régions respiratoires. L'acinus est formé à partir d'une bronchiole terminale qui se divise en bronchioles respiratoires, ces dernières étant des canalicules qui vont bourgeonner et qui sont à l'origine des futurs saccules terminales. Cette croissance en périphérie est accompagnée des premiers signes de différenciation des cellules épithéliales pulmonaires spécialisées et par une augmentation des capillaires. Dans les parties les plus distales du poumon fœtal, des cellules épithéliales de la future surface d'échanges commencent à se différencier en deux types cellulaires : les pneumocytes de types I et les pneumocytes de type II [83, 84]. Dans le mésenchyme, le réarrangement des capillaires par une atténuation de leur cytoplasme permettra le contact des capillaires avec la membrane de l'épithélium où se forment les PTI. Cette structure de base servira pour les futurs échanges gazeux. Les PTII cubiques se différencient en PTI pavimenteuses assurant la partie structurelle du poumon [84]. Dans les bronchioles terminales apparaissent des cellules sécrétrices dites cellules de Clara qui assurent une protection immunitaire au poumon [85, 86]. L'apoptose du tissu interstitiel contribue au développement du mésenchyme et à l'amincissement de la paroi parenchymateuse. Dans les régions plus distales, les PTII primitives accumulent du glycogène et des granulations typiques, les corps lamellaires (forme intracellulaire de stockage du surfactant), caractéristiques de la différenciation des PTII. La production de surfactant par les PTII débute à la fin de ce stade, en parallèle à l'augmentation de la surface des voies aériennes [84].

C'est durant cette période du développement que se situe la limite de la viabilité avec une assistance médicale. Le poumon ne possède que quelques régions fonctionnelles pour les échanges gazeux. Le développement de la membrane alvéolaire-capillaire est nécessaire à la survie du fœtus à une vie extra-utérine. Les échanges gazeux ne sont pas possibles tant que les capillaires ne sont pas suffisamment proches pour une diffusion optimale du gaz via leurs surfaces. Dans le cadre d'une naissance prématurée à ce stade du développement, le poumon n'est pas capable d'assurer seul ces échanges nécessaires au fonctionnement de l'organisme.

1.3.1.4 Stade sacculaire

Le stade sacculaire est marqué par une maturation active des épithéliums respiratoires où les cellules épithéliales vont acquérir une aptitude pour sécréter le surfactant. Durant ce stade (26^e à la 32^e semaine de gestation chez l'humain et de JG 17.5 au jour postnatal 5 chez la souris), des changements importants dans l'apparence des poumons surviennent. Son développement est tridimensionnel avec une partie distale qui s'allonge par l'addition des dernières générations bronchiques de l'arbre respiratoire. Il s'élargit en générant des points d'embranchements dichotomiques supplémentaires, amenant le nombre total d'embranchements à 23 chez l'humain. Le volume du poumon et sa surface croissent via la formation des conduits respiratoires composés des saccules terminaux. A ce stade du développement, un parenchyme relativement épais sépare les saccules les uns des autres qui vont se mettre à grossir. Deux réseaux vasculaires distincts reliés entre eux par diverses connexions sont observés dans le parenchyme avec les fibroblastes qui sont à l'origine de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire [75, 87, 88]. La prolifération générale ralentie en raison d'une forte diminution de la division des cellules épithéliales lesquelles se différencient. La maturation des PTII se poursuit et est associée à une augmentation de la synthèse des phospholipides du surfactant.

À cette étape, de nombreux types cellulaires se retrouvent dans le mésenchyme présent entre les parois des saccules, mais encore peu d'élastine et de collagène sont retrouvés dans l'interstitium aminci [84]. À partir de ce stade du développement, le

poumon fœtal devient fonctionnel grâce à la barrière air/ liquide des saccules qui vont permettre les échanges gazeux.

1.3.1.5 Stade alvéolaire et maturation microvasculaire

Le stade alvéolaire est la dernière phase du développement du poumon. Il débute quelques semaines avant terme chez l'humain et s'étend jusqu'à environ 2 ans après la naissance [89] tandis que, chez la souris, cette étape se déroule exclusivement après la naissance (PN5 à PN30). Le stade alvéolaire est caractérisé par une prolifération cellulaire, une multiplication importante du nombre d'alvéoles, le renouvellement de la matrice extracellulaire, une maturation microvasculaire et par la réduction du tissu interstitiel interalvéolaire (Figure 4).

Les saccules terminaux vont générer les conduits alvéolaires, puis les sacs alvéolaires. C'est le développement d'un dépôt suffisant d'élastine dans la matrice extracellulaire sous-jacente à l'épithélium respiratoire qui constituera l'étape initiale dans la formation des alvéoles [90]. Peu avant la naissance chez l'humain, les saccules vont augmenter de volume pendant une courte période et donneront les futures alvéoles. Durant cette étape, les parois des saccules alvéolaires (septa primaires) formant le parenchyme ne sont pas affectées [84]. La division des espaces aériens primitifs est causée par un bourgeonnement le long des septa primaires. L'expansion des bourgeons va constituer ce que l'on appelle les septa secondaires. Leur formation, le long des saccules, va augmenter la surface pulmonaire et mener à la formation des premières structures alvéolaires. Les petites sous-unités générées par les divisions successives des sacs alvéolaires par les septa sont appelées alvéoles. En parallèle, tant que le septum à partir duquel se forme un bourgeon possède un double réseau de capillaires, la formation d'alvéoles se poursuit. Ces alvéoles nouvellement formées augmentent peu à peu de volume et seront subdivisées par de nouveaux septa. Ce processus de développement présente une interdépendance entre l'alvéolisation et la maturation microvasculaire.

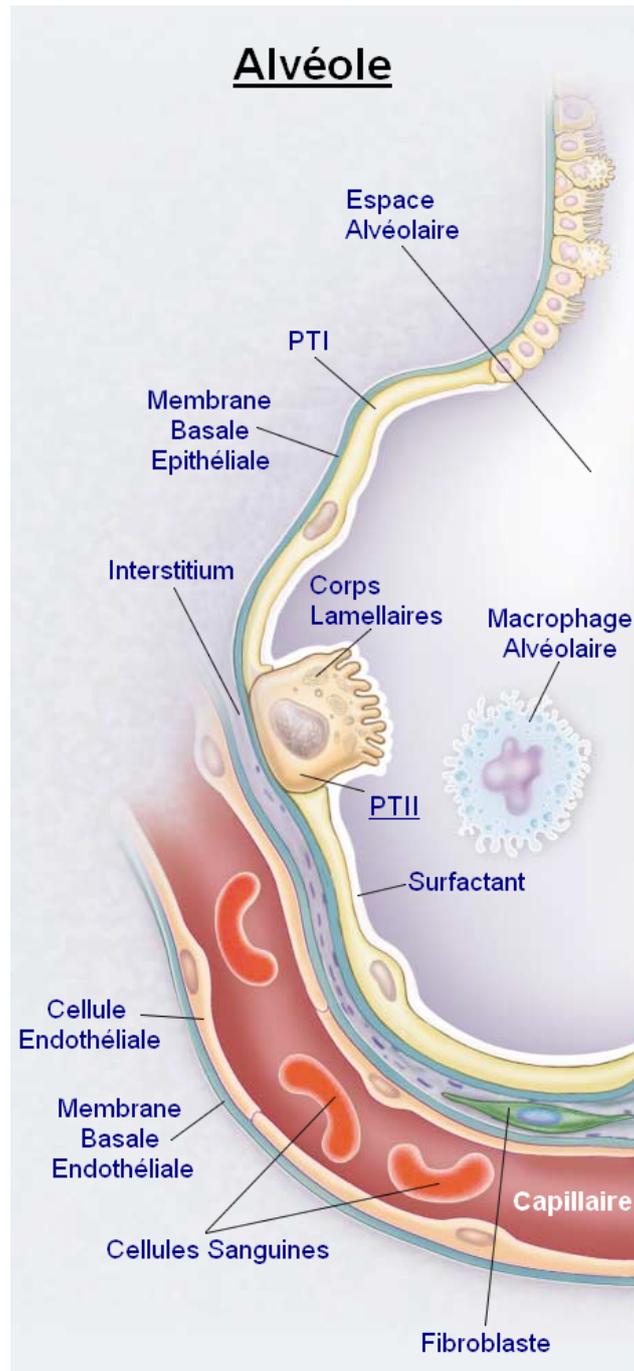


Figure 4 : Illustration d'une alvéole.

Extrait et adaptée de Ware et al. [91], PTI: pneumocyte type I; PTII: pneumocyte type II.

Une étape de maturation du double réseau capillaire est nécessaire afin de compléter l'alvéolisation. Le réseau se trouve dans une paroi interalvéolaire du septum secondaire qui va s'amincir et un dépôt d'élastine va se former à l'extrémité du septum [92]. L'amincissement des différents septa primaires et secondaires résulte de l'apoptose de plusieurs myofibroblastes et d'une dégradation de la matrice extracellulaire. La fusion des capillaires en un seul et unique réseau faisant face aux deux lumières alvéolaires confère une morphologie mature aux septa interalvéolaires. Le réseau unique est capable de procéder aux échanges gazeux des deux côtés du septum mature. Ce cheminement pouvant s'étaler jusqu'à deux ans après la naissance de l'enfant chez l'humain marque la fin du développement du poumon. La morphologie globale du poumon est alors établie et l'expansion ultérieure se poursuit avec une croissance proportionnelle de tous les composants du poumon jusqu'à l'âge adulte.

1.3.2 Conclusion de la section

Malgré les progrès récents en néonatalogie, de nombreux enfants présentent encore des dysfonctionnements pulmonaires causés par des anomalies du développement des poumons et une alvéolisation interrompue. De nombreux facteurs peuvent influencer le développement comme le sexe fœtal, mais il est aussi important de savoir qu'il existe une variabilité inter-individuelle puisque deux bébés ne présenteront pas de synchronisation parfaite dans le moment gestationnel de la maturation pulmonaire.

Des études moléculaires du développement pulmonaire ont commencé à percer la série d'évènements complexes qui contrôlent la bonne formation du poumon. Cependant, certains mécanismes restent inexpliqués. Une meilleure connaissance des évènements cellulaires, moléculaires et endocriniens dont dépend le développement adéquat du poumon peut contribuer à l'optimisation des approches thérapeutiques actuelles et peut guider les scientifiques dans la conception de stratégies permettant d'accélérer la maturation pulmonaire normale chez l'enfant prématuré.

1.4 Types cellulaires

Initialement, le poumon est constitué de cellules primitives multipotentes qui se différencieront en plus de 40 types cellulaires différents [93]. La différenciation des cellules se fait selon un axe proximo-distal et commence dès la 10^e semaine de gestation dans la trachée. L'épithélium s'amincit avec l'augmentation du diamètre des voies aériennes et les cellules épithéliales apparaissent avec des phénotypes plus différenciés. C'est au stade pseudo-glandulaire qu'apparaissent les premières cellules ciliées, les cellules en gobelets et les cellules de Clara. Au niveau de la future surface d'échanges gazeux apparaît quatre types cellulaires : deux types de cellules épithéliales, les PTI et PTII, ainsi que les cellules interstitielles, principalement les fibroblastes et les cellules musculaires lisses para-bronchiques qui font partie des cellules mésenchymateuses (Figure 5). On retrouve dans le poumon plusieurs autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules neuroendocrines de Kulchitsky [94], les cellules cartilagineuses, les macrophages alvéolaires, etc...

1.4.1 Les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules du mésenchyme que l'on retrouve en quantité importante dans le poumon en développement. Les fibroblastes interstitiels pulmonaires jouent un rôle structural important et sont la source majeure d'élastine, une protéine structurale nécessaire au développement des septa secondaires. Les fibroblastes fournissent les substrats métaboliques aux cellules épithéliales et assurent la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire nécessaires à la réparation tissulaire dans le poumon adulte. La théorie la plus acceptée est que ces cellules proviennent de progéniteurs mésenchymateux intrapulmonaires [95]. Plus récemment, il a été proposé que les fibroblastes puissent provenir des fibrocytes issus de la moëlle osseuse ou de cellules souches mésenchymateuses [95-99]. Les proportions des fibroblastes, retrouvés dans deux sous-populations de ce type cellulaire, varient de manière importante pendant la croissance pulmonaire [100].

Ces sous-populations sont les myofibroblastes, qui montrent un phénotype plus contractile, et les lipofibroblastes. L'identification de ces cellules est communément

basée sur la présence ou l'absence de la protéine THY-1, que seuls les lipofibroblastes expriment dans leur cytoplasme, et la présence de gouttelettes de lipides à la surface de la membrane [101]. Seule la protéine α -SMA (α -smooth muscle actin) du cytosquelette semble caractériser les myofibroblastes, mais cette protéine est également exprimée faiblement dans les lipofibroblastes [102, 103]. Ces deux sous-populations de fibroblastes produisent essentiellement les mêmes facteurs de croissance et protéines de la matrice extracellulaire, mais dans des quantités qui peuvent différer de manière importante entre les sous-populations durant le développement du poumon [104, 105]. Les fibroblastes pulmonaires sont une source importante de facteurs régulant la morphogénèse du poumon, incluant notamment les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF, de l'anglais *platelet derived growth factor*) [106], les facteurs de croissance transformants α et β (TGF α et β , de l'anglais *transforming growth factor alpha and beta*) [107-109], les facteurs de croissance épidermique (EGF, de l'anglais *epidermal growth factor*) [110, 111], les facteurs de croissance reliés à l'insuline I et II (IGF1 et IGF2, de l'anglais *insulin growth factors 1 and 2*) [112, 113] et les facteurs de croissance des hépatocytes (HGF, de l'anglais *hepatocyte growth factor*) [114].

1.4.2 Les cellules épithéliales

Différentes sous-populations de cellules tapissent l'épithélium respiratoire (Table 3). La région conductrice de l'appareil respiratoire est composée de cellules épithéliales pseudostratifiées qui sont toutes rattachées à la membrane basale. L'épithélium devient unistratifié au niveau des bronchioles. Auparavant cylindrique (13^e semaine de grossesse chez l'humain), il devient cubique dans les saccules terminales de la région respiratoire. Les cellules de Clara apparaissent dans la région respiratoire et sont progénitrices des cellules ciliées dans les bronchioles. Les cellules ciliées sont pyramidales et des microvillosités tapissent leur pôle apical leur permettant de participer à la clairance muco-ciliaire, via la sécrétion de facteurs présents dans le mucus, et à la réponse inflammatoire [115]. Dès la 19^e semaine de gestation, les cellules épithéliales alvéolaires apparaissent dans la partie distale de l'arbre bronchique (Figure 5). La paroi alvéolaire composée d'un épithélium de PTI joue un rôle important de barrière physique contre les agressions bactériennes, virales, des allergènes ou contre

toutes autres substances toxiques pour l'organisme grâce à des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules lui conférant une étanchéité.

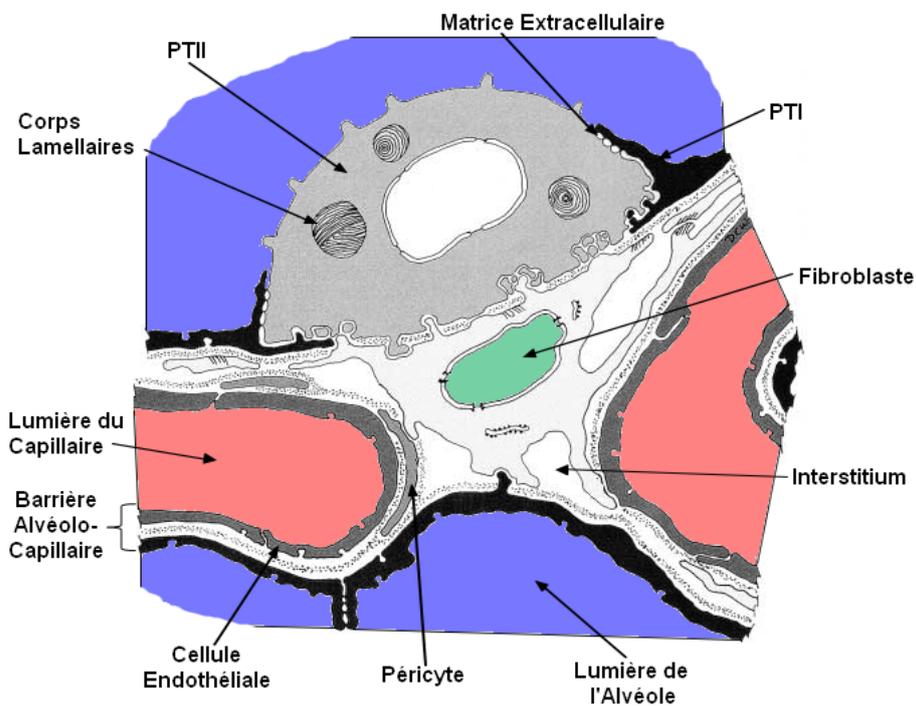


Figure 5 : Compartiments épithéliaux et mésenchymateux du poumon.

Extrait et adaptée de Sirianni et al. [116]. Les capillaires sont colorés en rouge et les lumières des alvéoles en bleu. PTI: pneumocyte de type I; PTII: pneumocyte de type II.

Table 3 : Les cellules de l'épithélium respiratoire.

Type cellulaire	Fonction(s)
Cellules ciliées	Clairance muco-ciliaire
Cellules calciformes	Sécrétion du mucus avec les glandes séro-muqueuses
Cellules basales	Renouvellement cellulaire, cellules progénitrices
Cellules neuroendocrines	Chémorécepteurs (Variation O ₂ et CO ₂)
Cellules endocrines	Sécrétion d'amines et de polypeptides (hormones/neurotransmetteurs)
Cellules de Clara	Cellules progénitrices, transport ionique, clairance muco-ciliaire, réponse inflammatoire
Pneumocytes de type I	Composant de la barrière alvéolo-capillaire, transport ionique
Pneumocytes de type II	Produit et sécrète les éléments lipidiques et protéiques du surfactant, transport ionique du sodium

1.4.2.1 Les pneumocytes de type I

Les PTI sont dérivés de cellules épithéliales provenant de l'endoderme et présentent un phénotype de cellule plate et allongée. Ils ne représentent qu'un tiers des cellules de l'épithélium alvéolaire, mais recouvrent 96% de sa surface. La face apicale des PTI est en contact avec l'air tandis que leur face basale est étroitement liée aux cellules endothéliales des capillaires sanguins formant une mince paroi de 0.1 à 0.2 μm , ce qui optimise les échanges gazeux entre les alvéoles et les capillaires pulmonaires (barrière alvéolo-capillaire) [117]. Sur le plan structural, ces PTI ont un cytoplasme peu abondant avec peu de mitochondries en position périnucléaire [118]. Leurs fonctions ne

sont cependant pas complètement connues en raison des difficultés engendrées par leur culture *ex vivo*. Des études récentes ont démontré leur rôle essentiel dans le transport ionique et aqueux [119] et il a été suggéré que les PTI pourraient jouer un rôle dans le processus de réparation alvéolaire [120]. À la naissance, les PTI contribuent à la résorption du fluide pulmonaire via l'expression de l'aquaporine V et de l'ATPase Na^+/K^+ [121-124].

I.4.2.2 Les pneumocytes de type II

Issus de l'endoderme, les PTII présentent une structure cuboïdale et sont à l'origine de la synthèse et sécrétion du surfactant pulmonaire. Ces cellules métaboliquement très actives apparaissent durant le stade canaliculaire et sont caractérisées, en microscopie électronique, par la présence de microvillosités apicales et de corps lamellaires dans lesquels sont assemblés et emmagasinés les lipides et protéines du surfactant [125]. A la naissance, l'épithélium pulmonaire distal qui sécrétait des ions chlorure devient un épithélium d'absorption via le canal sodique épithélial (ENaC, de l'anglais *epithelial Na^+ channel*) [126, 127] nécessaire à la clairance du fluide pulmonaire des alvéoles.

I.4.2.2.1 Le surfactant

Le terme « surfactant » est né de la contraction des mots anglais « surface active agent ». Le surfactant est constitué d'un mélange complexe protéo-lipidique dont la fonction principale est de réduire la tension à l'interface air/liquide [128]. La diminution de la tension a pour effet de prévenir le collapsus des alvéoles à l'expiration et permet d'augmenter la compliance pulmonaire (adaptation du volume pulmonaire en réponse à une variation de pression) [128-130]. La montée de synthèse du surfactant, synthétisé par les PTII, débute vers la 32^e semaine de grossesse chez l'humain et au jour de gestation 17.5 chez la souris. Les lipides représentent 80% du surfactant et 95% de ces lipides sont des phospholipides. Le 1,2- dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est le principal phospholipide pulmonaire dans le surfactant. Il a pour rôle d'éliminer les molécules d'eau à l'interface air-liquide, ce qui a pour effet d'atténuer la tension de surface [131, 132]. Il appartient à la famille des phosphatidylcholines (PC) qui

composent à 80% les phospholipides du surfactant. La fraction lipidique restante est composée de phosphatidylglycérol, qui joue un rôle dans la répartition du surfactant à la surface de l'alvéole, et de phosphatidylinositol (PI). Ces phospholipides acides et insaturés constituent, ensemble, 8 à 15% des phospholipides totaux du surfactant. Les autres lipides présents sont le cholestérol, les acides gras et le triacylglycérol [128, 133, 134]. La répartition des lipides peut varier selon l'espèce, selon l'état de maturation, et l'état physiologique du poumon et selon une variabilité interindividuelle rendant impossible la notion de surfactant dit « normal » [135]. Les protéines représentent 10% du surfactant pulmonaire. La plus abondante est l'albumine, mais il existe aussi 4 protéines spécifiques (SP : *Surfactant Protein*) : SP-A (28 à 36 kDa), SP-B (8 kDa), SP-C (4 kDa), SP-D (43 kDa) que l'on peut séparer en deux groupes [136]. Les protéines SP-A et SP-D sont hydrophiles et appartiennent à la famille des collectines qui agissent principalement sur la régulation de la sécrétion de PC par les PTII et sur la protection immunitaire du poumon. Les protéines SP-B et SP-C sont des petites molécules hydrophobes et sont principalement impliquées dans la dynamique de synthèse et dans le rôle mécanique du surfactant en aidant les phospholipides à atteindre l'interface air/liquide [128, 129, 137-140]. SP-A est la protéine la plus abondante dans le surfactant (6%) suivie de SP-C (1.5%), SP-B (1%) et enfin SP-D qui ne représente que 0.5% des protéines du surfactant [139]. En plus de son rôle dans la respiration, le surfactant tient un rôle important dans la prévention de l'œdème pulmonaire et possède des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires pour l'organe en développement [141].

1.4.3 Interactions mésenchyme-épithélium

Dans la plupart des systèmes en développement, il est reconnu que les interactions entre les cellules sont décisives dans la régulation de la croissance et de la différenciation normale de l'organe [142, 143]. Le poumon est un organe complexe dont le développement dépend de processus synchronisés qui sont profondément liées aux communications entre les fibroblastes et les cellules épithéliales [144]. Cette communication peut prendre différentes formes. Elle peut intervenir entre le mésenchyme et l'épithélium (type ligand-récepteur), via une variété de facteurs diffusibles. Parmi ces facteurs paracrines, on peut trouver des cytokines, certaines hormones stéroïdiennes et des facteurs de croissance. Plusieurs études ont mis en

évidence que la croissance épithéliale du poumon était sous le contrôle du mésenchyme. En effet, Rudnick [145] a démontré que l'élimination du mésenchyme de poumon de poulet greffé sur une membrane chorionique (chorioallantoïc) *in ovo* provoquait un arrêt du développement pulmonaire. Plus tard, Alescio et Cassini [146-148] ont démontré qu'une greffe d'épithélium distal sur du mésenchyme trachéal engendrait, chez les cellules épithéliales, un phénotype trachéal avec des cellules ciliées et des cellules calciformes. Les marqueurs des cellules épithéliales distales avaient tous disparu. Ces différentes études ont démontré que le mésenchyme est impliqué dans la morphogenèse et la différenciation de l'épithélium. L'épithélium présente une grande plasticité dans son phénotype éventuel dont dépend des signaux inductifs reçus du mésenchyme [149]. La variante inverse a été observée sur des explants de poumon de souris où il a été démontré que des facteurs de l'épithélium, FGF9 (facteur de croissance des fibroblastes 9 de l'anglais, fibroblast growth factor 9) et Shh (sonic hedgehog) étaient nécessaires au développement normal du mésenchyme [150]. D'autres facteurs importants pour la maturation du poumon et impliquant cette notion de communication cellulaire ont été identifiés. L'activité fibroblaste-pneumocyte (FPF, de l'anglais *fibroblast pneumocyte factor*) a longuement été étudiée. Elle a été détectée chez plusieurs espèces. Il a été démontré en culture cellulaire que l'activité FPF détectée dans le milieu de culture des fibroblastes était capable d'induire la maturation conduisant à la sécrétion de surfactant chez les PTII [151]. L'activité FPF est régulée négativement par le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (TGF $\beta 1$, de l'anglais transforming growth factor $\beta 1$) durant le développement [152].

Le facteur FPF n'a encore jamais été identifié. Dammann *et al.* [153] ont mis en évidence une protéine, la neuréguline-1 β (NRG1), qui présentait une activité similaire à celle de FPF. NRG1 est exprimée par les fibroblastes pulmonaires tandis que ses récepteurs (ErbB1-4) sont exprimés par les PTII. Comme pour FPF, la quantité de NRG1 sécrétée par les fibroblastes en bordure du mésenchyme augmente lors de la montée de synthèse du surfactant et stimule la maturation des PTII. Cette augmentation localisée suggère un rôle de la neuréguline-1 β dans la différenciation cellulaire via un mode de signalisation paracrine. Parce qu'elle est sécrétée par les fibroblastes pulmonaires fœtaux et qu'elle mime l'activité FPF paracrine, la neuréguline-1 β a été proposée comme étant la principale protéine contribuant à l'activité FPF [153].

I.4.4 Conclusion de la section

Le développement pulmonaire normal est le fruit d'une succession et d'un chevauchement de processus, eux-mêmes issus de plusieurs mécanismes susceptibles de les réguler, comme par exemple les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium. De nombreux facteurs de croissance induisent des signaux capables de moduler les interactions mésenchyme-épithélium et, par conséquent, la morphogenèse pulmonaire. En effet, les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF, de l'anglais *fibroblast growth factor*), les facteurs de croissance épidermiques (EGF), les facteurs de croissance dérivés des plaquettes sanguines (PDGF, de l'anglais *platelet derived growth factor*) et la neuréguline-1 β jouent des rôles primordiaux dans la synchronisation de fines interactions cellulaires et moléculaires afin de promouvoir la croissance et la différenciation du poumon.

1.5 Génétique du développement pulmonaire

Il n'existe pas de gène pour lequel la mutation génétique n'affecte que le poumon sans avoir aucun impact sur le reste du fœtus. Il n'y a donc pas à proprement parler de gène spécifique à la morphogenèse pulmonaire. L'organogenèse pulmonaire est le résultat d'une expression de gènes impliqués dans différents stades du développement. Plusieurs gènes impliqués dans la morphogenèse du poumon s'expriment dans d'autres tissus où ils ont fréquemment d'autres fonctions. Dans les lignes qui vont suivre, nous nous attacherons à décrire quelques familles de gènes qui dirigent la morphogenèse normale du poumon fœtal.

1.5.1 Les facteurs de croissance

Dans la section précédente, nous avons mis en lumière le rôle prédominant des communications entre le mésenchyme pulmonaire et l'épithélium durant le développement fœtal via des facteurs paracrines. Des études ont démontré en culture que l'ajout de certains facteurs de croissance induisait un développement et/ou une maturation du poumon [154, 155].

1.5.1.1 TGF β /BMP

La famille TGF β comprend plusieurs facteurs de croissance polypeptidiques incluant TGF β , BMP (protéine morphogénique osseuse, de l'anglais *bone morphogenetic protein*) et les activines, les inhibines, les facteurs de croissance de différenciation (GDF, de l'anglais *growth differentiation factors*), les facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales (GDNF, de l'anglais *glial derived neurotrophic factors*) et les protéines sécrétées Nodal et Lefty [156, 157]. Ces facteurs de croissance sont capables de moduler différents processus cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, l'apoptose et le remodelage de la matrice extracellulaire [158-161]. Les effets biologiques de TGF β sont médiés par les récepteurs TGF β RI (*ALK5*) et TGF β RII, qui activent la voie de signalisation Smad (Figure 6). TGF β possède 3 isoformes (TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3) qui présentent une homologie de séquence d'environ 60-80%. Ces trois isoformes sont très exprimés durant le développement tandis que seuls des traces sont observables dans le tissu adulte [162].

La voie de signalisation Smad est la voie classique de TGF β . Dans cette voie, les TGF β s se lient au récepteur TGF β R2 (TGF β R3, encore appelé bétaglycane, peut former un complexe initial avec TGF β R2) qui s'associe à TGF β R1 et le phosphoryle. TGF β R1 devient actif et est capable d'activer les récepteurs de Smad (R-Smad). R-Smad sont constitués des activines Smad 2 et Smad 3 dans la voie de signalisation TGF β . TGF β R1 activé va phosphoryler R-Smad qui va se lier à une importine et migrer vers le noyau. Au cours de la migration, R-Smad se lie à Co-Smad (Smad 4) ou à Smad 7. Smad4 est capable d'induire la translocation du complexe dans le noyau pour moduler l'expression de gène(s) cible(s), tandis que Smad7 est un inhibiteur de la voie de signalisation. Le récepteur TGF β R3 a pour rôle d'augmenter l'affinité entre le récepteur TGF β R2 et le ligand, tandis que le facteur protéique SARA associé à R-Smad augmente l'affinité de R-Smad pour le complexe ligand-récepteur tout en le rapprochant de la membrane [18]. Les voies de signalisation PI3K/MAP KINASE peuvent aussi être activées par la liaison TGF β à ses récepteurs et jouer un rôle dans la prolifération cellulaire [163, 164].

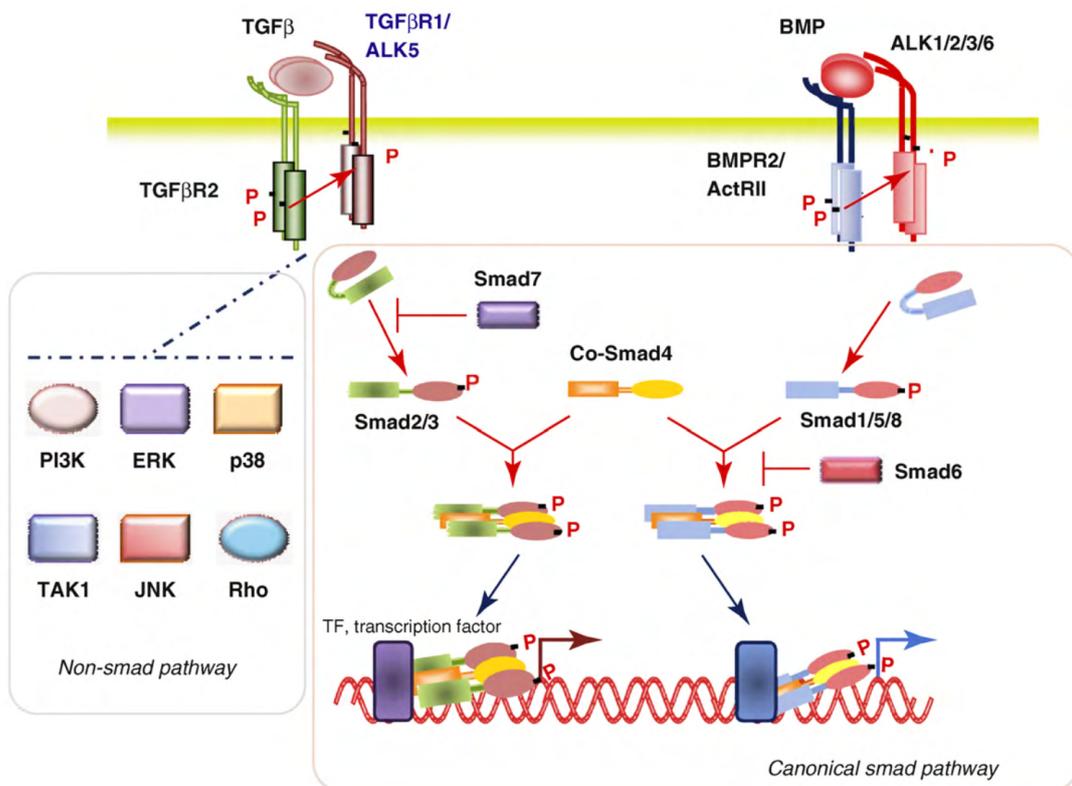


Figure 6 : La voie de signalisation TGF β /BMP.

Adaptée de Pardali et al. [165]. La ligne se terminant par un trait signifie inhibition tandis que la flèche indique une liaison.

Les KO des 3 isoformes de *Tgfb* sont mortels chez la souris. Les souris *Tgfb1*^{-/-} meurent à la naissance avec des difficultés respiratoires et intestinales, tandis que les fœtus *Tgfb2*^{-/-} meurent au jour de gestation 14.5 d'une dysplasie pulmonaire accompagnée d'anomalies cardiaques [166, 167]. Les souris *Tgfb3*^{-/-} présentent des difficultés de déglutition, un phénotype avec une fente palatine et des difficultés respiratoires causées par un retard de développement pulmonaire [168, 169]. Dans les cultures pulmonaires, *Tgfb1* et *Tgfb2* inhibent la ramification des voies aériennes du poumon chez la souris, tandis que l'inhibition des récepteurs *Tgfb* ou des molécules de signalisation *Smad* accélère la morphogenèse du poumon [170-172]. Les souris transgéniques qui surexpriment *Tgfb1* dans les cellules épithéliales présentent un délai dans la morphogenèse pulmonaire et une régulation négative du processus de différenciation cellulaire accompagnée par une diminution de l'expression de la protéine pro-surfactant SP-C [173]. Ceci suggère un rôle important des ligands *Tgfb*, en tant que régulateurs négatifs, dans le développement et la maturation du poumon fœtal. Le blocage de la signalisation TGFβ par mutation du facteur de croissance transformant β activant la protéine kinase liante 1 (TAB1, de l'anglais transforming growth factor β-activated kinase-binding protein 1) induit une morphogenèse anormale du poumon et du système cardiovasculaire [174]. Ainsi, un niveau d'activité de la voie de signalisation TGFβ semble essentiel au développement du poumon. Une étude sur la suppression de *Tgfb2* dans les cellules épithéliales du poumon a montré une diminution de la septation, ce qui semble indiquer qu'un niveau physiologique d'activité de TGFβ-Smad3 est essentiel à la formation des septa secondaires [175]. L'activité de la voie de signalisation TGFβ peut être régulée par de multiples facteurs. La libération des ligands TGFβ peut être régulée par les β-intégrines, les facteurs de croissance latents transformant β liant les protéines (LTBP, de l'anglais latent transforming growth factor β binding protein) et la thrombospondine. La bétaglycane, l'endogline et la décorine peuvent modifier l'affinité de liaison aux récepteurs TGFβ [176-179]. Les mutations de *Ltbp3*^{-/-} et *Ltbp4*^{-/-}, susceptibles de réguler TGFβ, induisent des phénotypes similaires à ceux observés pour les mutants *Tgfb*. Ces mutants montrent des anomalies d'alvéolisation et de structures des fibres d'élastine similaires au KO de *Smad3* [180-182].

Comme pour TGF β , BMP est impliqué dans différents processus du développement pulmonaire comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose [183-186]. Initialement, des études ont caractérisé BMP comme un facteur capable d'induire la différenciation de cellules souches du mésenchyme en cellules osseuses, ce qui lui a valu son nom [187, 188]. Les BMPs sont synthétisés sous forme de précurseurs avec un peptide signal en position N-terminale et un peptide mature en position C-terminale [189]. Le précurseur est ensuite clivé par une protéine convertase et le fragment mature C-terminal peut lier ses récepteurs. Plus de 15 ligands BMP ont été identifiés. Ils sont catégorisés selon la similarité de leurs nucléotides ou de leurs groupes d'acides aminés de la manière suivante : BMP1 (strictement impliqué dans le développement osseux et cartilagineux), BMP2/4, BMP5/6/7/8, BMP9/10 et BMP12/13/14 (aussi connu sous le nom GDF5/6/7, respectivement) [190]. Le ligand BMP se lie à ses récepteurs de surface et forme un complexe hétérotétramérique avec ses récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase de type I et de type II (Figure 6). Il y a 3 isotopes de récepteurs BMP de type I: type 1A (BMPR-1A, aussi connu sous le nom ALK3), type 1B (BMPR-1B, aussi connu sous le nom ALK6) et récepteur à l'activine de type 1A (ActR-1A, aussi connu sous le nom ALK2) [191]. Il y a trois récepteurs de type II pour BMP : BMPR2, le récepteur à l'activine type 2A (ActR-2A) et activine type 2B (ActR-2B). Les récepteurs de l'activine ActR-1A, 2A et 2B sont aussi des récepteurs de TGF β , tandis que BMPR-1A, 1B et BMPR2 sont spécifiques à BMP [192]. Suite à la formation du complexe tétramérique, le récepteur de type II phosphoryle le récepteur type I. Le récepteur type I ainsi activé va à son tour phosphoryler R-Smad constitué de Smad 1, Smad 5 et Smad 8 pour la signalisation BMP. R-Smad se déplace ensuite vers le noyau et s'associe avec Co-Smad (Smad 4) pour former un facteur de transcription qui régulera l'expression de ses gènes cibles [191]. Les I-Smad de BMP sont Smad 6 et Smad 7 et ils sont impliqués dans la régulation négative de la voie de signalisation BMP [193]. La signalisation de BMP peut être régulée par des facteurs intracellulaires, extracellulaires et membranaires [194]. Les facteurs extracellulaires agissent comme des antagonistes de BMP, on peut notamment citer Noggin, Gremlin et Chordin [195]. Les facteurs intracellulaires comme les Smad 6, Smad 7 et les phosphatases PP1 et PP2A inhibent l'internalisation du récepteur [196]. Les facteurs membranaires comme l'endogline interagissent avec les

récepteurs de type I et type II, ce qui ajoute un niveau de régulation supplémentaire [197]. Une voie de signalisation de BMP indépendante de Smad a été identifiée. Elle serait dépendante, entre autres, des voies MAP KINASE, PI3K/AKT et Rho-GTPases [198-201].

Beaucoup d'organes expriment une ou plusieurs BMP qui est /sont essentielle(s) à leur développement. BMP4 joue un rôle central dans le développement pulmonaire [202]. Le KO de *Bmp4* entraîne une hypoplasie pulmonaire se traduisant par une différenciation anormale des cellules épithéliales [203]. Des études ont mis en évidence que l'ajout de BMP4 dans des cultures d'explants de poumon stimulait la ramification des voies aériennes [204, 205]. *A contrario*, l'utilisation de Noggin ou Gremlin, des antagonistes de BMP, réduisait la différenciation des cellules épithéliales [206, 207]. Ces études suggèrent, comme pour TGF β , qu'un niveau d'activité régulé pour BMP4 est nécessaire au développement normal de l'organe. Le KO inducible du récepteur *Alk3* (*Bmpr-1A*) entraîne une détresse respiratoire à la naissance avec un collapsus des membranes [192, 208, 209]. Quand *Alk3* est inhibé tôt dans la gestation, on observe un délai dans le processus de ramification des voies aériennes du poumon et une induction de la prolifération et de la différenciation cellulaire [209]. Quand l'inactivation a lieu plus tardivement, *Alk3*^{-/-} induit une apoptose des cellules épithéliales accompagnée d'une diminution de la sécrétion du surfactant. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est régulée négativement par l'inhibition de *Alk3* [209]. La voie de signalisation BMP joue un rôle important dans la vascularisation et l'angiogenèse pulmonaire et lorsqu'elle est dérégulée, elle peut provoquer des malformations du poumon, de l'atélectasie et des difficultés respiratoires que l'on associe au SDR.

1.5.1.2 Wnt

La famille Wnt (de l'anglais Wingless-type MMTV integration site family) comprend 19 protéines différentes qui jouent essentiellement un rôle paracrine via leur liaison à un récepteur complexe appelé LRP (de l'anglais LDL- receptor protein) [210]. Le récepteur des LDL est composé d'une protéine appelée Frizzled (Fzd), comportant 7 domaines transmembranaires, associée à un récepteur appelé « protéine reliée aux lipoprotéines de faible densité (LDL, de l'anglais low density lipoprotein). La liaison

extracellulaire de Wnt à son récepteur conduit à l'assemblage de Fzd et LRP qui recrutent la protéine Dishevelled (Dvl aussi connu sous le nom Dsh) du côté intracellulaire. Dvl peut, d'une part, cesser de phosphoryler la β -caténine et activer la voie de signalisation des facteurs de transcription des cellules T de la β -caténine (TCF, de l'anglais β -catenine T-cell transcription factor) ou, d'autre part, se lier à d'autres facteurs et activer la voie de signalisation de la kinase N-terminal c-Jun (JNK, de l'anglais c-Jun N-terminal kinases) ou une voie de signalisation intracellulaire Ca^{2+} (Figure 7). L'inactivation de la β -caténine chez des souris mutantes induit la mort des fœtus à la naissance provoquée par une altération de la structure pulmonaire avec une diminution du nombre d'alvéoles et une vascularisation incomplète [211]. La délétion de la β -caténine dans l'épithélium proximal n'induit pas de modification observable de la structure, tandis que la délétion de la β -caténine dans l'épithélium distal induit une importante diminution de la différenciation de l'épithélium. Cette régulation négative dans le processus de différenciation est caractérisée par une diminution de l'expression de *Sftpc* (protéine du surfactant C de l'anglais, surfactant protein C), marqueur des PTII, une diminution de l'expression de *Pecam*, un marqueur des cellules endothéliales, et de α -*Sma*, une protéine servant à la contraction et à la formation du cytosquelette qui est impliquée dans le processus de ramification des voies aériennes et d'alvéolisation. L'expression de α -*Sma* est fortement régulée par les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium [212, 213]. Par ailleurs, la délétion du gène *Wnt7b* induit une mortalité à la naissance causée par des problèmes respiratoires. Les poumons des souris *Wnt7b*^{-/-} sont hypoplasiques, du fait d'une baisse de la prolifération du mésenchyme, et de défauts sévères dans la formation des vaisseaux sanguins et des cellules musculaires lisses [214]. La délétion de *Wnt5a* provoque une augmentation du nombre de branchements et un amincissement de l'espace mésenchymateux interstitiel [215]. De plus, des études ont démontré que *Wnt5a* pouvait inhiber l'action de Fgf10 sur les cellules épithéliales et que, chez les souris *Fgf9*^{-/-}, l'expression de *Wnt2* était régulée négativement, ce qui suggère un lien entre les deux voies de signalisation Wnt et FGF [216]. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine peut être inhibée par des facteurs de la famille Dickkopf (DKK, de l'anglais Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor). L'ajout de DKK1 à une culture d'explant induit une altération de la ramification des voies aériennes observable par un élargissement de la partie distale et par un arrêt de la division des branches chez la souris [217]. Au centre des branches, on observe une

diminution du dépôt de fibronectine responsable de la division. Le même phénotype est observé quand on inhibe la fibronectine avec un anticorps anti-fibronectine, ce qui suggère que la signalisation de Wnt joue un rôle important dans la ramification des voies aériennes en induisant le dépôt de fibronectine sur la branche lui permettant de se diviser à nouveau. De plus, il a été démontré que Wnt jouait un rôle important dans la différenciation cellulaire du tissu [218].

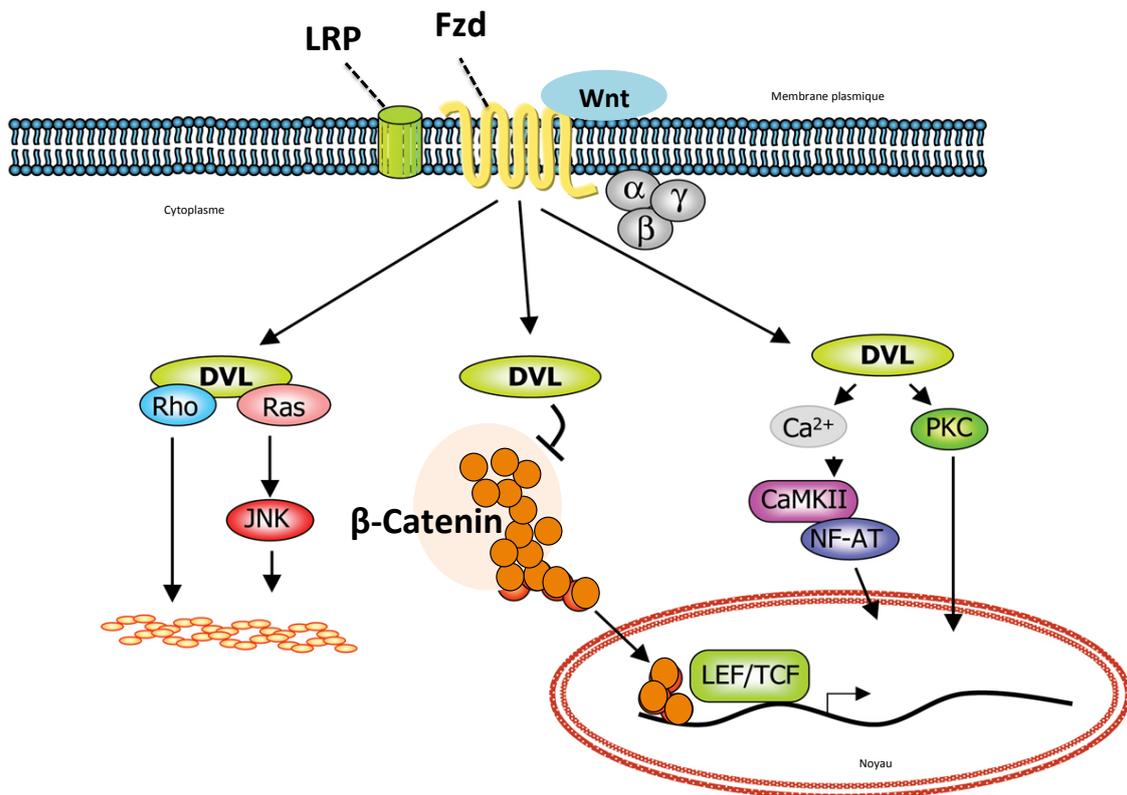


Figure 7 : Les voies de signalisation Wnt.
 Adaptées de Baron et Kneissel [219]. La ligne se terminant par un trait signifie inhibition tandis que la flèche indique une liaison ou une interaction.

1.5.1.3 FGF

Les facteurs de croissance des fibroblastes sont des protéines sécrétées qui jouent un rôle important dans de multiples processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire [220, 221]. Ils jouent aussi un rôle dans la ramification des voies de circulation des organes comme le pancréas, les reins ou le poumon [222-224]. 23 protéines FGF ont été identifiées à ce

jour (FGF1-23). L'activation de la signalisation FGF s'effectue via des récepteurs spécifiques à la surface de la membrane cellulaire encodés par 4 gènes (FGFR1-4). Ces gènes, à cause de leur épissage alternatif, possèdent plusieurs isoformes de FGFR (récepteur du facteur de croissance des fibroblastes de l'anglais, fibroblast growth factor receptor) qui diffèrent selon leurs affinités pour leurs ligands. Les récepteurs FGF sont des protéines transmembranaires avec une activité tyrosine kinase qui, une fois le ligand lié au domaine extracellulaire des récepteurs, initie une cascade de signalisation Ras-MAP kinase, PI3K kinase/AKT [225, 226] (Figure 8). Dans le poumon fœtal, FGF est un facteur de régulation essentiel impliqué dans la communication entre l'épithélium et le mésenchyme durant différents stades du développement. La perturbation de l'expression de FGF résulte en de dramatiques anomalies dans la ramification des voies aériennes et la différenciation de l'épithélium pulmonaire.

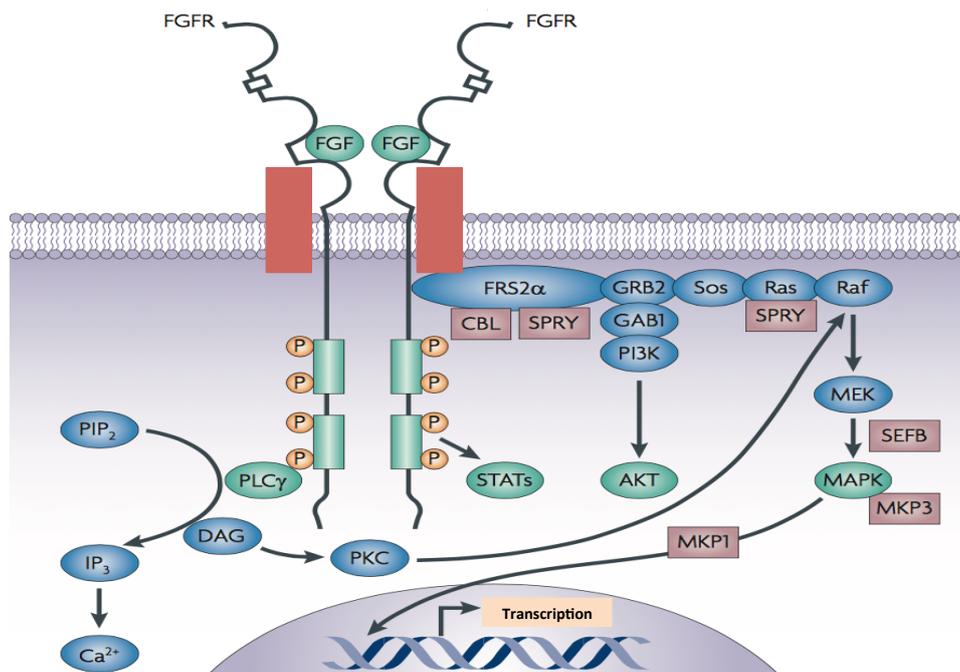


Figure 8 : La voie de signalisation FGF.

Adapté de Turner et Grose [227]. Les flèches indiquent des liaisons ou des activations.

Plusieurs FGFs sont exprimés dans le poumon fœtal: FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 et FGF18 [228, 229] mais seul FGF10 semble être absolument nécessaire au développement du poumon [230, 231]. En effet, le KO de *Fgf10* chez la souris est létal car il conduit à l'absence d'un développement pulmonaire [232, 233]. Durant la morphogenèse, *Fgf10* est exprimé dans le mésenchyme distal qui entoure les bourgeons

et agit comme un facteur chimiotactique de l'épithélium pulmonaire distal. Lorsque *Fgf10* lie *Fgfr2*, il spécifie la direction de croissance des nouveaux embranchements [231, 234]. La délétion de *Fgfr2* entraîne le même phénotype que *Fgf10*^{-/-} [235], tandis que les souris *Fgfr3*^{-/-} et *Fgfr4*^{-/-} présentent une alvéolisation normale [236]. Il a aussi été démontré que *FGF10* contrôlait la différenciation des cellules épithéliales et l'expression de *Sftpc* [237]. *FGF10* peut aussi réguler négativement l'expression de *BMP4* [237]. Le niveau d'expression de *FGF* ainsi que son niveau d'activité semblent être des facteurs critiques au développement normal comme il a été démontré dans une étude chez la souris où un vecteur d'induction ne permettait que 20% de l'expression normale de *FGF10* [238]. Dans cette étude, les souris présentaient une hypoplasie des poumons. Plusieurs régulateurs clés, comme Shh, BMP et TGFβ, collaborent à l'effet de FGF10 sur la morphogenèse pulmonaire [239-241].

Le gène *FGF7*, aussi connu sous le nom *KGF* (de l'anglais *keratinocyte growth factor*), semble contribuer à la différenciation des cellules épithéliales distales, comme l'ont montré les cultures pulmonaires où l'addition de FGF7 contribuait à la croissance de l'épithélium chez la souris [242, 243]. Cependant, les mutants *Fgf7*^{-/-} montraient un phénotype normal et pour le moment, il n'y a pas d'évidence connue sur l'impact négatif de l'abrogation du gène *Fgf7* sur la structure pulmonaire [244]. Les souris *Fgf9*^{-/-} montrent une réduction du mésenchyme et une diminution de la ramification des voies aériennes, mais les embranchements principaux demeurent présents et une différenciation des pneumocytes est conservée dans ce modèle [245]. Les gènes *FGF10* et *FGF9* font partie de la voie de signalisation impliquant les récepteurs *FGFR2B* et *FGFR2C*, respectivement, et activent les Raf, MAP ERK kinase (MEK) et les signaux de transduction régulés par les kinases extracellulaires 1 et 2 (ERK). Dans les cultures d'explants pulmonaires, l'inhibition de MEK entraîne une réduction de la ramification des voies aériennes et de la prolifération des cellules épithéliales, mais augmente l'apoptose dans le mésenchyme [246]. La signalisation FGF peut être régulée par différents facteurs comme Erm et Pea3 qui sont des facteurs de transcription avec des domaines ETS (se lie à la double hélice ADN avec une séquence GGA(A/T) [247, 248]. Les gènes de la famille Sprouty sont des régulateurs clés de la signalisation FGF. Il y a 4 gènes Sprouty (*Spry1-4*) qui régulent négativement la ramification des voies aériennes [249, 250]. *Spry1*, 2 et 4 ont des rôles suppresseurs de la signalisation Ras- MAP kinase.

L'inhibition de l'expression de *Spry2* induit la formation d'un nombre plus important de branchements [251], tandis que la surexpression de *Spry2* et *Spry4* inhibe la ramification des voies aériennes en réduisant la prolifération des cellules épithéliales [250]. Dans la voie de signalisation FGF, *SPRYs* et *FGFs* semblent fonctionner comme un couple activateur/inhibiteur afin de réguler le processus de croissance du poumon. Sprouty joue un rôle important dans les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium durant le développement du poumon [129, 130, 249].

1.5.1.4 SHH

Chez les mammifères, sonic hedgehog est une des 3 protéines impliquées dans la voie de signalisation Hedgehog. Dans le poumon, la protéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui contient une séquence signal en N-terminal qui est reconnue par la particule de reconnaissance du signal (SRP, de l'anglais signal recognition particule) durant sa translocation dans le réticulum endoplasmique, puis est clivée par une peptidase. Une molécule de cholestérol va fixer le fragment N-terminal et c'est la molécule de cholestérol qui va permettre l'ancrage à la membrane cellulaire. Le fragment N-terminal est responsable de l'activation de la signalisation de SHH, alors qu'aucune fonction biologique n'est attribuée au fragment C-terminal qui reste libre après la sécrétion. En l'absence de Shh, le récepteur Ptch empêche la transcription des gènes cibles de Shh en inhibant smoothed (Smo) [252, 253], une protéine transmembranaire impliquée dans la transmission du signal par les inhibiteurs de la transcription cubitus interruptus (Ci). *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* sont les 3 gènes orthologues de Ci chez les vertébrés [254]. Quand SHH est sécrétée dans l'épithélium [255], elle se lie à son récepteur Ptch dans le mésenchyme qui relâche son inhibition sur Smo, permettant ainsi l'activation des Gli qui vont réguler la transcription des gènes cibles de *Shh* [256, 257] (Figure 9). Cette localisation cellulaire ligand/récepteur (Shh dans l'épithélium ; Ptch et Smo dans le mésenchyme) met en évidence une communication entre le mésenchyme et l'épithélium pour cette signalisation SHH [258]. SHH joue un rôle important dans le développement du poumon fœtal [254]. Les mutants *Shh*^{-/-} présentent un phénotype d'hypoplasie pulmonaire avec des défauts de septation, une formation anormale des doigts, des fistules et une atrésie trachéo-oesophagienne, ce qui démontre le rôle important du gène dans la morphogenèse [240]. *Fgf10* est aussi régulé négativement chez les mutants *Shh*^{-/-}. Les souris *Shh*^{+/-}, où un seul allèle est délété, ont des fœtus montrant des poumons hypoplasiques [259]. La délétion d'un seul allèle de

Shh induit une expression de *Fgf10* diffuse dans tout le mésenchyme pulmonaire. *Fgf10* n'est alors plus localisé à proximité de l'épithélium distal [260]. La surexpression de *Shh* avec le promoteur de SP-C conduit à une hypoplasie alvéolaire sévère (absence d'alvéole fonctionnelle) ainsi qu'à une augmentation du tissu interstitiel causé par une augmentation de la prolifération de l'épithélium et du mésenchyme [261]. SHH joue donc un rôle de facteur de croissance des cellules mésenchymateuses, induisant leur prolifération. La signalisation SHH peut être régulée par la protéine interagissant avec Hedgehog (HIP1, de l'anglais Hedgehog interacting protein 1).

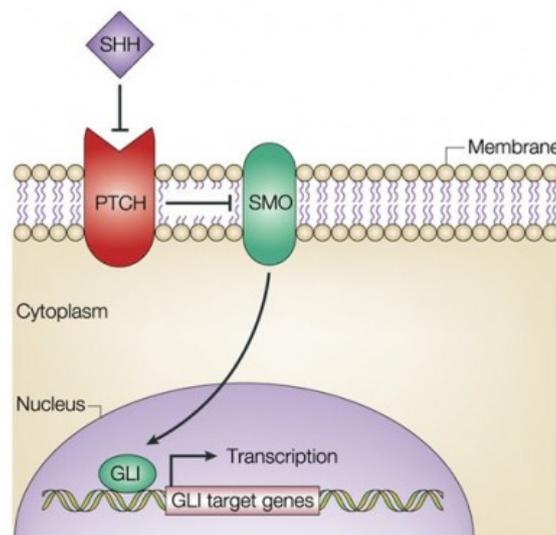


Figure 9 : La voie de signalisation SHH.

Extrait de Lingtingtung et Chiang [262]. La ligne se terminant par un trait signifie inhibition tandis que la flèche indique une liaison ou une activation.

HIP1 liée à SHH peut réguler négativement son action [263]. L'inhibition de *Hip1* va réguler positivement SHH et entraîner la mort néonatale par détresse respiratoire des souris [264]. Toutefois, dans ce modèle, l'asymétrie droite-gauche était conservée, mais l'embranchement initial des deux premiers bourgeons était absent chez ces souris. *Hip1* et *Ptch1* sont donc les régulateurs négatifs du signal SHH dans le développement du poumon et sont importants dans le processus de contrôle de la ramification des voies aériennes du poumon fœtal [264].

1.5.1.5 IGF

Les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (IGF1 et IGF2) contrôlent l'homéostasie du tissu en régulant les fonctions cellulaires essentielles dont la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire [265-271]. Les ligands se lient à leur récepteur tyrosine kinase IGF1R (récepteur du facteur de croissance ressemblant à l'insuline 1 de l'anglais, insuline growth factor 1 receptor). IGF2 peut interagir avec un second récepteur, IGF2R, qui va réduire la signalisation d'IGF2. La liaison de d'IGF1 sur son récepteur spécifique IGF1R peut être modifiée par liaison d'IGF à la protéine liant les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (IGFBP, de l'anglais insuline-like growth factor binding protein). A ce jour, il a été répertorié 6 IGFBPs qui peuvent influencer la biodisponibilité des IGFs et donc réguler leur signalisation [272]. L'action de d'IGF1 est médiée par les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et Raf/ERK (Figure 10). PTEN est un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K /AKT. Ainsi inhibée, la voie de signalisation va limiter la prolifération des cellules.

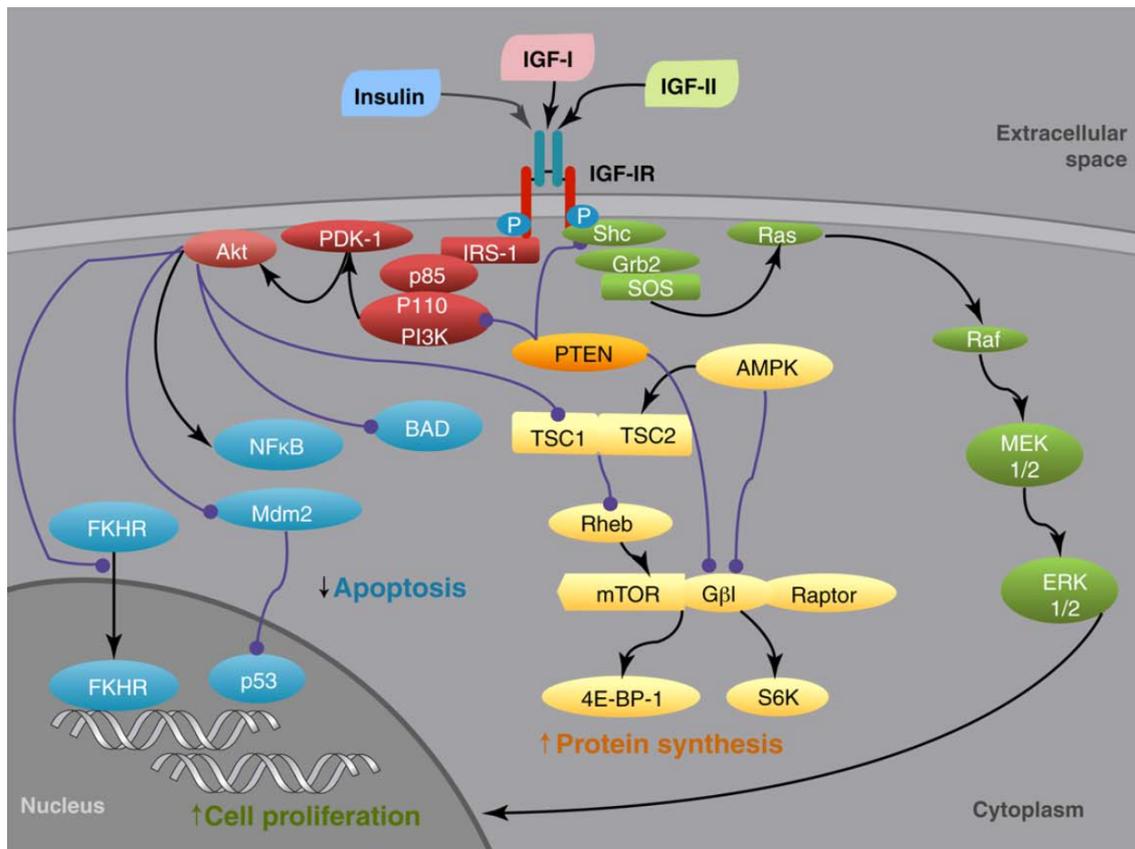


Figure 10 : La voie de signalisation IGF.

Extrait de Gallagher et LeRoith [273]. La ligne se terminant par un rond plein signifie inhibition tandis que la flèche indique une liaison ou une activation.

Le KO d'*Igf1r* est létal chez les souris qui vont présenter une insuffisance respiratoire et un retard de croissance avec un poids à la naissance 45% en dessous de la normale [274-277]. De la même manière, les souris *Igf1^{-/-}* présentent un retard de croissance et une hypoplasie pulmonaire menant à la mort après la naissance à cause d'un collapsus pulmonaire [266, 274]. Les poumons des souris *Igf1^{-/-}* présentent une prolifération anormale des cellules et une différenciation altérée de l'épithélium et des capillaires [274, 276, 278-280]. En comparaison avec les souris *Igf1^{-/-}*, les souris KO *Igf2* ne présentent qu'un léger retard de croissance, mais une altération du développement alvéolaire est observée avec des septa plus épais et une organisation alvéolaire modifiée en comparaison avec le développement normal [268]. Des études ont montré que la signalisation IGF induisait une maturation alvéolaire et vasculaire dans les derniers stades du développement pulmonaire [281] et que IGF1 était impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales [278, 282, 283].

I.5.1.6 EGF

Le facteur de croissance épidermique est une hormone qui, une fois fixée à son récepteur (EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique de l'anglais epidermal growth factor receptor), induit une activité mitotique dans son tissu cible. EGF est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est clivé pour donner la forme mature. Quatre ponts disulfures stabilisent EGF. EGF est une molécule soluble qui ne traverse pas la membrane plasmique. Elle se fixe à son récepteur spécifique EGFR et induit une dimérisation de celui-ci [284]. Cette liaison EGF/EGFR conduit à une transphosphorylation des résidus tyrosines du récepteur et permet l'ancrage des protéines qui ont un domaine SH2 (SRC homology 2 domain). L'interaction avec d'autres protéines va activer les cascades de signalisation PI3K/MAP kinase qui vont réguler la transcription des gènes (Figure 11). EGF, TGF α et l'amphiréguline sont les ligands de EGFR et sont capables de stimuler la prolifération des cellules fibroblastiques du poumon fœtal [285]. Ils sont aussi impliqués dans la différenciation cellulaire [286, 287]. EGF régule positivement le processus de ramification des voies aériennes du poumon chez la souris et la prolifération des PTII en culture et in vivo [111, 288, 289]. Il a été démontré par la suite que EGF pouvait stimuler la synthèse du surfactant dans les PTII fœtaux [290, 291]. Une autre étude a suggéré que la régulation de EGF-EGFR

jouait un rôle important dans le processus de communication entre l'épithélium et le mésenchyme résultant en une différenciation des PTII dans le poumon [292]. De plus, il a été observé que le niveau de liaison maximum EGF-EGFR se produisait au moment de la montée de synthèse du surfactant [293, 294].

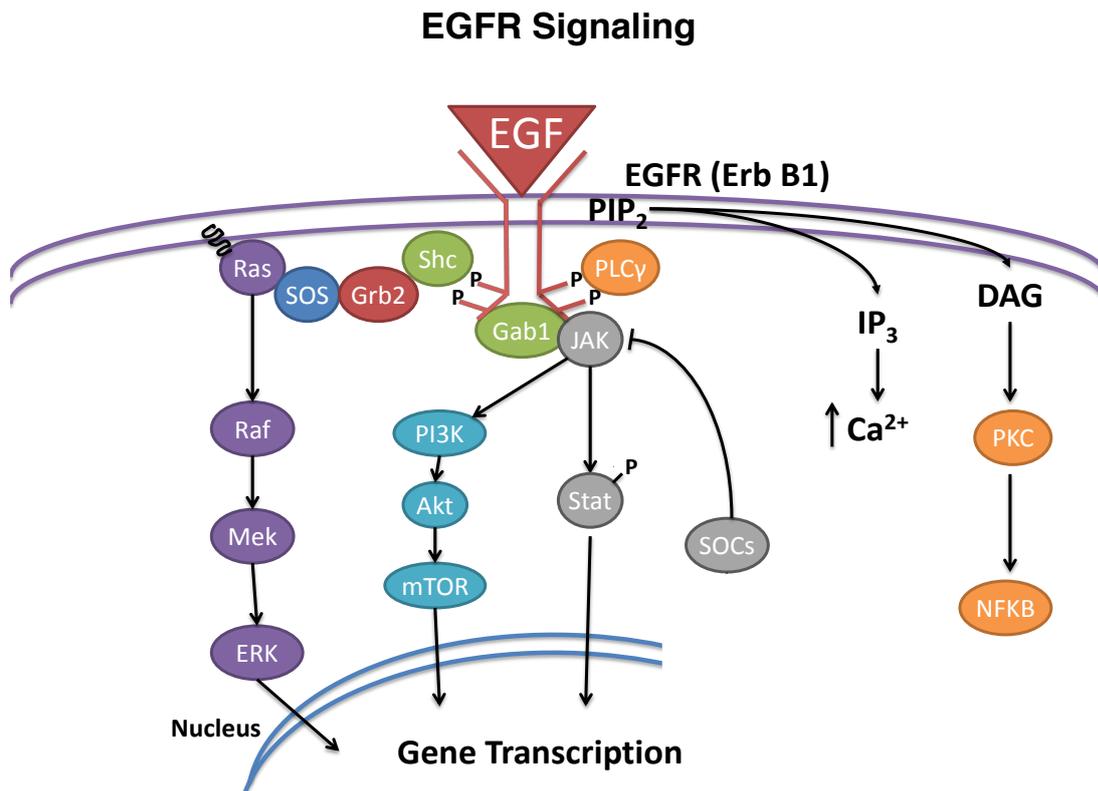


Figure 11 : La voie de signalisation EGF.
Provient du site internet : www.pancreapedia.org [295]. La ligne se terminant par un trait signifie inhibition tandis que la flèche indique une liaison ou une activation.

Les mutants *Egfr*^{-/-} montrent un phénotype avec une ramification des voies aériennes anormale du poumon et une faible alvéolisation [296]. Chez ces souris, on observe également une expression aberrante des protéines de la matrice métalloprotéases (MMP). Il a été démontré que l'effet positif sur la différenciation des cellules épithéliales induit par EGF était dépendante de l'activation de ERK. Le blocage spécifique de cette voie ERK ou de EGFR entraînait une diminution de l'expression de *Sftpc* [297].

1.5.1.7 PDGF / VEGF

PDGFA, PDGFB, PDGFC et PDGFD forment les 4 monomères inactifs des facteurs de croissance dérivés des plaquettes sanguines (PDGF). L'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des PDGFs permet la fixation sur leurs récepteurs tyrosine kinase (PDGFR α et PDGFR β , de l'anglais platelet-derived growth factor receptor alpha and beta). La fixation engendre une dimérisation des récepteurs selon 3 combinaisons ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ et $\beta\beta$). Chaque dimère PDGF a ses propres affinités pour un ou des récepteurs. Par exemple, PDGFAA se lie uniquement à PDGFR $\alpha\alpha$, tandis que PDGFCC ET PDGFAB se lient aux récepteurs PDGFR $\alpha\alpha$ et PDGFR $\alpha\beta$. Enfin, PDGFBB est le seul dimère capable de se lier à tous les récepteurs [298].

La famille PDGF impliquant 4 facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire a été identifiée (VEGFA-D, de l'anglais vascular endothelial growth factor A-D) et un facteur de croissance placentaire (PIGF, de l'anglais placental growth factor). La signalisation de VEGF commence par la fixation du ligand à un des deux récepteurs portant une activité tyrosine kinase (VEGFR1, aussi connu sous le nom Flt1, et VEGFR2, aussi connu sous le nom Flk1) [299, 300].

Les souris *Pdgfa*^{-/-} décèdent rapidement après la naissance en raison d'une avéolisation anormale causant un emphysème léthal [301, 302]. Ce phénotype témoigne du rôle important de PDGF dans le processus d'uvéolisation. De plus, une étude a mis en évidence le rôle important de PDGFB et de ses récepteurs dans le développement vasculaire durant le stade alvéolaire [302]. VEGF, qui comme PDGF se lie sur des récepteurs possédant une activité tyrosine kinase, régule certains processus du développement vasculaire du poumon fœtal [62, 75, 303, 304]. L'inhibition de la voie de signalisation VEGF montre une réduction de l'uvéolisation chez les souris après la naissance [305], ce qui suggère que les deux voies de signalisation PDGF et VEGF régulent des processus communs.

1.5.2 Les facteurs de transcription

Nécessaires à l'initiation ou à la régulation de la transcription, les facteurs de transcription sont des activateurs ou des répresseurs de la transcription qui agissent en se fixant ou non sur une séquence régulatrice située généralement en amont des gènes qui vont être transcrits. 4 groupes principaux de facteurs de transcription sont connus pour leurs rôles importants dans le développement pulmonaire: les facteurs de transcription homeobox Nkx et HOX, les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR), les GLIs et les facteurs de transcription de la boîte forkhead (forkhead box).

1.5.2.1 Nkx

Le facteur de transcription homeobox le plus connu dans le poumon est le facteur Nkx2.1 (NK2 homeobox 1) qui est un homologue du facteur Nkx2 (transcription factor related locus 2) découvert chez la drosophile [306]. Il est aussi connu sous le nom de facteur de transcription de la thyroïde (TTF1, de l'anglais *Thyroid transcription factor*) et T/EBP (thyroid enhancer binding protein). L'expression de *Nkx2.1* n'est pas spécifique au poumon. L'ARNm de ce gène a été détecté dans différents tissus dont l'ébauche thyroïdienne et le cerveau [307]. Dans le poumon fœtal, le gène est exprimé dans l'épithélium bronchique dès l'émergence des bourgeons bronchiques. *Nkx2.1* régule l'expression des protéines sécrétées par les cellules de Clara (CCSP, de l'anglais clara cell secretory protein) et les protéines du surfactant SFTPA, SFTPB et SFTPC (surfactant protein A, B and C) [308]. L'activité de Nkx2.1 est elle-même régulée par différents signaux intracellulaires comme, par exemple, la concentration en calcium (Ca^{2+}) [309]. Un modèle murin d'inactivation de *Nkx2.1* a mis en évidence que les souris présentaient à la naissance une hypothyroïdie congénitale avec une détresse respiratoire menant à la mort des nouveau-nés [310]. Chez ces souris, un phénotype d'hypoplasie pulmonaire avec une formation rudimentaire de l'arbre trachéobronchique explique ces problèmes pathologiques à la naissance. Ceci suggère que *Nkx2.1* joue un rôle important dans le développement précoce du poumon, notamment sur le processus d'embranchement pulmonaire [310]. Finalement, il a été démontré que *Nkx2.1* pouvait être activé par d'autres facteurs de transcription tels que HNF-3 β et GATA6 [311, 312].

I.5.2.2 Hox

Les gènes *Hox* sont des gènes homéotiques qui jouent plusieurs rôles durant l'organogenèse [313-318]. Dans le poumon fœtal, les gènes *Hox* sont exprimés selon un gradient d'expression le long de l'axe proximo-distal durant le développement. Chez les mammifères, il y a une quarantaine de gènes *Hox* répartis en 4 groupes. Les gènes membres de la famille *Hox* ont une grande homologie de séquence qui explique que seules les mutations de plusieurs gènes *Hox* permettent de voir des effets sur le phénotype [319]. Des études sur *Hoxa5*^{-/-} et *Hox*^{a5-/b5-} ont montré que les souris présentaient une croissance et une ramification des voies aériennes anormales [320, 321]. Enfin le triple mutant *Hox5* (*Hoxa5*⁻, *Hoxb5*⁻ et *Hoxc5*⁻) présentait un phénotype plus sévère que les simples ou doubles mutants précédents [320, 321], ce qui démontre la redondance fonctionnelle entre les gènes *Hox5* au cours du développement pulmonaire. Chez ces triples mutants *Hox5*, la croissance et la mise en place de l'axe proximo-distal étaient affectées dans le poumon fœtal.

I.5.2.3 RAR

L'acide rétinoïque (RA, de l'anglais retinoic acid) est une forme active de la vitamine A (ou rétinol) qui exerce de très nombreux effets transcriptionnels par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les RAR et RXR. Le rôle important des rétinoïdes dans de nombreux phénomènes durant l'organogenèse a été mis en évidence [322]. RA est capable de stimuler directement la synthèse d'élastine nécessaire au processus de septation [323]. Durant le développement alvéolaire, et plus précisément durant la septation, les niveaux d'expression pulmonaire des protéines cellulaires liant le rétinol (CRBP-I et -II) et des récepteurs RAR augmentent [324, 325], tandis qu'une augmentation plus tardive de l'expression de la protéine cellulaire liant l'acide rétinoïque (CRABP) est observée. Ce délai implique que l'acide rétinoïque est moins disponible sous sa forme libre à la fin du processus de septation [326]. L'administration d'acide rétinoïque après la naissance accélère la septation chez le rat [327]. Les études sur des souris transgéniques ont démontré que l'acide rétinoïque est capable de moduler à la fois l'accélération et le ralentissement de la septation. Les souris *Rarg*^{-/-} présentent une diminution du nombre d'alvéoles [328], tandis que les souris *Rarb*^{-/-} montrent une

accélération de la septation avec une augmentation plus rapide du nombre d'alvéoles et un nombre final d'alvéoles plus élevée [329]. Les rétinoides sont également impliqués dans la maturation des PTII. En effet, un déficit en vitamine A conduit à une diminution pouvant aller jusqu'à 50% du niveau de synthèse des protéines spécifiques et des phospholipides du surfactant pulmonaire [330].

I.5.2.4 GLIs

Il a 3 gènes qui encodent les facteurs de transcription de la famille GLI : *Gli1*, *Gli2* et *Gli3*. Les facteurs de transcription GLI activent ou inhibent la transcription par leur liaison Gli à leur séquence consensus sur l'ADN via leur domaine en doigts de zinc et par leur interaction avec un complexe de transcription. Les facteurs GLIs sont activés par la voie de signalisation SHH comme on a pu le voir dans la section I.5.1.4. Les souris *Gli2*^{-/-} présentent un poumon unique où les poumons gauche et droit ont fusionnés, ce qui implique que Gli2 régule la formation de l'embranchement principal [331]. Les souris *Gli3*^{-/-} sont viables mais on observe, chez ces animaux de petits poumons dysmorphiques, tandis que les doubles mutants *Gli2* et *Gli3* ne présentent aucune formation pulmonaire [256]. Cette agénésie confirme un rôle essentiel pour les facteurs de transcription GLI dans le développement du poumon fœtal.

I.5.2.5 Facteurs de transcription de la boîte Forkhead

Les membres de la famille des facteurs de transcription de la boîte Forkhead montrent des homologies de leurs domaines de liaison Winged à l'hélice d'ADN et sont connus pour réguler la prolifération et la différenciation cellulaire dans le poumon [332]. Parmi eux, on retrouve les gènes *FOXA1*, *FOXA2*, *HFH8* et *HFH4*. *FOXA1* et *FOXA2*, aussi connus sous les noms de *HNF-3 α* et *HNF-3 β* , respectivement, ont initialement été catégorisés comme des facteurs de transcription régulant la différenciation des hépatocytes [332]. *HNF-3 α* et *HNF-3 β* peuvent réguler l'expression de *CCSP* et des protéines du surfactant dans les PTII [333-335]. L'induction de *Hnf-3 β* par un interféron peut stimuler l'expression du gène *Nkx2.1*. *NKX2.1* va à son tour réguler l'expression des protéines du surfactant [311]. *FOXA2* semble donc être un activateur positif des gènes régulant la synthèse du surfactant. Les facteurs de

transcription Hth8 et Hth4 sont aussi importants pour le développement normal. Les souris *Hth8*^{-/-} meurent in utéro tandis que les souris *Hth4*^{-/-} présentent des anomalies de la ciliogenèse des cellules épithéliales alvéolaires. Ce phénotype pulmonaire est affilié au syndrome de Kartagener chez l'humain [336, 337].

1.5.3 Les autres facteurs

En plus des facteurs de croissance et de transcription connus pour réguler le développement pulmonaire, d'autres molécules sont considérées comme des acteurs pouvant jouer des rôles importants dans la régulation de la morphogenèse pulmonaire et les communications cellulaires qui y sont associées. Les ARN non-codants (ncRNAs) ont été longtemps considérés comme des acides nucléiques n'ayant aucun rôle dans les cellules, mais les recherches ont récemment montré qu'ils pouvaient jouer un rôle important durant le développement. De plus, les cellules embryonnaires sont reliées entre elles par le biais de protéines membranaires et la matrice extracellulaire (MEC). La MEC joue un rôle essentiel dans l'architecture tissulaire, mais aussi dans des processus aussi variés que la régulation des fonctions cellulaires, la différenciation et la prolifération via des interactions cellule-MEC. La MEC tient donc un rôle important au cours du développement pulmonaire.

1.5.3.1 Les microARNs

C'est en 1993 que les premiers microARNs ont été identifiés par Ambros et son équipe [338] chez le nématode *C. Elegans*. Les microARNs sont des acides ribonucléiques simple brin à chaîne courte (ARN) qui jouent des rôles clés dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes cibles et de leur propre expression. Certains microARNs ont la capacité d'activer ou bloquer la traduction en protéine des ARN messagers auxquels ils vont se fixer et leurs cibles peuvent être multiples [339]. D'autres microARNs peuvent déstabiliser les ARNm lorsque l'affinité est meilleure et entraîner la dégradation de l'ARNm cible [340]. Les microARNs sont impliqués dans différentes pathologies respiratoires [341] et régulent plusieurs processus cellulaires liés au développement [342]. Le rôle important des microARNs dans la mise en place des structures pulmonaires durant le développement a été mis en

lumière par Lu *et al.* [343]. Ils ont démontré dans leurs études que les protéines Ago1 et Ago2, impliquées dans la biogenèse des miARNs, montraient de forts niveaux d'expression dans le mésenchyme et dans l'épithélium au cours du stade pseudoglandulaire. Une autre étude portant sur l'inhibition de l'action de Dicer, une enzyme permettant de cliver le pré-microARN, montrait que l'inhibition non-spécifique entraînait un phénotype visible avec une diminution de la ramification des voies respiratoires [343]. Parmi les cibles pouvant réguler le développement pulmonaire, il a été démontré que le cluster miR-17-92, lorsque surexprimé *in vivo*, entraînait une augmentation du processus de prolifération des cellules épithéliales et une diminution de la différenciation de l'épithélium pulmonaire [344]. En revanche, la délétion du cluster miR-17-92 est létale dès la naissance due à une hypoplasie sévère du poumon [345]. Une étude plus récente menée dans notre laboratoire a mis en évidence des microARNs pour lesquels les niveaux d'expression variaient en fonction du sexe et du temps dans le poumon fœtal en développement [346].

1.5.3.2 La MEC

Les molécules de la MEC procurent, en premier lieu, un support structural et sont susceptibles de moduler la prolifération, l'adhérence, la polarité, le mouvement, le métabolisme et la différenciation des cellules [347]. D'autre part, les molécules de la MEC peuvent servir de barrière et de lieu de réservoir pour les facteurs de croissance [348]. Différentes protéines composent la membrane basale telles que les intégrines, les laminines, les entactines, le collagène IV, la fibromoduline et bien d'autres.

Le collagène XVIII est l'un des composants de la membrane basale épithéliale qui fait la jonction entre l'épithélium et le mésenchyme. Il a été démontré que l'inhibition du collagène XVIII induisait un arrêt du processus de ramification pulmonaire. Cette étude met en évidence l'importance de la liaison entre le mésenchyme et l'épithélium au cours du développement [349].

Les sulfates d'héparanes sont des polymères sulfatés que l'on retrouve à la surface de la majorité des cellules ainsi qu'au sein de la MEC. Les molécules de la MEC jouent un rôle fondamental dans la stabilisation de la liaison FGF/FGFR [350],

351]. La formation d'un complexe ligand/récepteur stable, menant à la signalisation de la voie FGF, requiert la liaison du ligand avec un sulfate d'héparane qui va ensuite pouvoir dimériser de façon stable les récepteurs. La voie de signalisation passant par FGFR est donc dépendante de la sulfonation des héparines, ainsi que de l'affinité des différents FGF avec les sulfates d'héparanes.

Lors de la morphogénèse du poumon, la fibronectine s'accumule aux sites de branchement [217, 352]. L'inhibition de la synthèse de fibronectine empêche le processus de branchement alors que son excès induit la formation de branchements surnuméraires. Cette molécule de « guidage » est donc essentielle au développement équilibré du poumon.

Les métalloprotéinases matricielles (MMP, de l'anglais matrix metalloproteinase) peuvent être inhibées par les inhibiteurs de la métalloprotéinase matricielle dans le tissu (TIMP, de l'anglais tissue inhibitors of matrix metalloproteinase). Le mutant *Timp3*^{-/-} présente une diminution de la ramification des voies aériennes et du processus d'alvéolisation [353]. Les souris mutantes *Timp3* développent progressivement un emphysème. Comme pour les mutants *Egfr*^{-/-} (section I.5.1.6), les souris *Mmp2*^{-/-} montrent une alvéolisation anormale [296]. Le rôle important des molécules de la MEC dans la régulation des interactions entre le mésenchyme et l'épithélium conduisant à une homéostasie constante dans le développement tissulaire est ainsi mis en évidence.

1.5.4 Conclusions de la section

Le développement d'un organe comme le poumon nécessite des communications et des interactions entre les cellules impliquant des facteurs et des voies de signalisation complexes. A quel instant et comment ces échanges sont-ils régulés au cours du développement ? Le sexe fœtal peut-il influencer ces régulations ? Quelles sont les réponses cellulaires qui s'y rattachent ? Autant de questions qui motivent les recherches actuelles.

1.6 Différences sexuelles et effets des androgènes sur le développement du poumon

Les premières données observant une différence sexuelle dans la maturation pulmonaire ont été publiées il y a plus de 30 ans. Malgré les traitements et les bons taux de survie des prématurés grâce aux progrès en néonatalogie, il a été rapporté qu'il persistait une plus grande incidence du SDR chez les nouveau-nés garçons par rapport aux filles d'âges gestationnels similaires [20, 354, 355]. Il a été démontré, dans une méta-analyse récente, que les garçons dont les mères ont reçu un traitement anténatal aux glucocorticoïdes sont toujours plus susceptibles de développer un SDR plus sévère que les filles d'âges gestationnels comparables [356-358]. Les garçons présentent donc plus de risques de succomber suite à un SDR ou d'y survivre avec des handicaps. Des études du liquide amniotique ont montré que les niveaux de cortisol étaient plus bas chez les garçons que chez les filles et que le temps d'apparition des lipides du surfactant (L/S décrit dans la section I.2.3.3) dans le liquide amniotique des garçons présentait un retard de deux semaines par rapport aux filles chez l'humain [359]. Ce dimorphisme sexuel, touchant la maturation pulmonaire, s'expliquerait par la présence d'androgènes à des niveaux plus élevés chez le mâle [360-362]. Grâce à différents modèles expérimentaux d'exposition aux androgènes et anti-androgène, Torday *et al.* [361] ont montré que la présence des androgènes retarde le début de la synthèse du surfactant pulmonaire. L'injection de flutamide, un anti-androgène pur, à des lapins mâles élimine la différence sexuelle et augmente les niveaux de surfactant chez le mâle à un niveau similaire ou plus élevé aux femelles au jour de gestation 26 (le temps de gestation moyen du lapin est de 31 jours) [360]. Nielsen a ensuite mis en évidence que la féminisation des souris par mutation du récepteur des androgènes provoquait une accélération du processus de maturation pulmonaire, caractérisée par des niveaux de synthèse des lipides du surfactant supérieurs pour les mâles mutants au jour de gestation 17.5 [363]. Par conséquent, l'effet des androgènes est dépendant de la présence d'un récepteur aux androgènes fonctionnel. Cette régulation par les androgènes n'est toutefois pas toujours délétère pour le développement pulmonaire. Il a été rapporté qu'un traitement à la dihydrotestostérone (DHT) sur des explants de poumons stimulait la ramification des voies aériennes et augmentait la prolifération de l'épithélium dans les premiers stades du développement pulmonaire [364].

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, la maturation du poumon fœtal est dépendante de fines régulations menées essentiellement par une communication entre le mésenchyme et l'épithélium. Au centre de cette régulation, l'activité FPF semble être un médiateur capable de conduire les cellules à sécréter du surfactant par les PTII. Il a été démontré sur un modèle cellulaire, que les androgènes sont capables de bloquer l'effet stimulateur des glucocorticoïdes, lorsqu'une activité FPF est secrétée par les fibroblastes [365]. L'activité FPF a donc été identifiée comme étant un des premiers médiateurs des effets androgéniques sur la maturation pulmonaire.

Une autre étude a mis en évidence dans les fibroblastes pulmonaires fœtaux femelles que la liaison du facteur de croissance épidermique EGF augmente au jour de gestation 18.0 tandis qu'elle augmente seulement au jour de gestation 19.0 chez le mâle [294]. Ce délai dans l'activité de liaison du récepteur d'EGF est induit par les androgènes durant le développement pulmonaire fœtal chez le lapin [366]. Il a aussi été démontré chez le lapin à l'aide d'un inhibiteur de l'activité 5 α -réductase que dans les mécanismes menant au retard de maturation pulmonaire chez le mâle, la conversion de la testostérone en 5 α -DHT n'est pas requise pour la différence sexuelle dans la production de surfactant [367].

1.6.1 Conclusion de la section

Durant la gestation, la différenciation gonadique résulte en la masculinisation du fœtus mâle et en la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Cette étape du développement survient plus tôt en gestation que la maturation du poumon fœtal. Chez le mâle exposé à ce processus d'androgénisation, certains processus dans le développement et la maturation vont être retardés par l'exposition aux androgènes. Cet aspect ajoute un niveau de régulation dans la génétique du développement pulmonaire et incite à prendre en considération le sexe fœtal dans les études de transcriptomique.

1.7 Études génomiques

Un certain nombre d'études ont déjà abordé l'expression génique globale du poumon fœtal. Les premières études à être publiées ne prenaient pas en considération le sexe fœtal, mais ont permis de mettre en évidence des groupements de gènes impliqués dans le contrôle de la structure pulmonaire. Mariani et Shapiro [368] dressèrent le profil d'expression de près de 11 000 gènes dans le poumon de souris en fonction des différents stades de développement pulmonaire, du jour de gestation 12 jusqu'à l'âge adulte. L'étude a mis en évidence des gènes impliqués dans le contrôle de la structure pulmonaire notamment des gènes dont l'expression régule la matrice extracellulaire. Bonner *et al.* [369] ont ensuite caractérisé l'expression pulmonaire sur des poumons complets en fonction des différents stades de développement. L'emphase fut mise sur les facteurs de transcription et l'identification de groupes fonctionnels et de gènes candidats dans la susceptibilité aux cancers pulmonaires. Ces données d'expression sur des poumons complets, ont permis d'identifier 1300 gènes comme étant variables entre au moins deux points temporels. Une étude menée chez la souris du jour de gestation 12 à la puberté a permis l'identification de signatures transcriptomiques [370]. L'analyse a permis de déterminer des groupements de gènes dont les profils d'expression permettent d'établir un programme de développement pulmonaire. Ce sont des signatures moléculaires du développement pulmonaire périnatal, notamment la signature de l'initiation de la formation alvéolaire que les auteurs ont nommé « molecular signature for Time-to-Birth » [370]. Des patrons d'expression en association avec l'initiation de l'alvéolisation ont aussi été déterminés. Une autre étude réalisée par le même groupe, sur des poumons fœtaux humains de 7 à 22 semaines de grossesse, a identifié plusieurs catégories fonctionnelles dont des fonctions immunologiques jusqu'alors insoupçonnées dans le poumon fœtal et des fonctions associées au surfactant [371]. Ces deux analyses ont mené à des approches de modélisation permettant de prédire l'état de développement de l'organe par sa signature moléculaire. D'autres études d'ontologie portant sur l'expression génique pulmonaire fœtale ont été menées en utilisant la technologie des biopuces ADN. La majorité de ces études s'intéressent au développement pathologique, principalement en ce qui concerne les études portant sur le cancer du poumon. Finalement dans un modèle de culture, Wade *et al.* [372] ont identifié 388 gènes qui sont modulés pendant la différenciation des PTII. Ces gènes sont associés aux canaux ioniques, à l'adhésion cellulaire, au film superficiel, aux

lysosomes, à la matrice extracellulaire et à la membrane basale. Les bases de données et modèles ainsi générés représentent des sources d'informations substantielles en ce qui concerne l'expression génique pulmonaire fœtale chez l'humain et la souris. Cependant, la majorité de ces études n'a pas pris en compte le sexe fœtal. Considérant le nombre important de gènes dont l'expression est influencée par le sexe, il est possible qu'un biais d'erreur ait conduit à de mauvaises interprétations dans ces différentes analyses.

1.7.1 Études génomiques selon le sexe fœtal

L'étude des différences sexuelles dans l'expression génique de différents organes a été faite chez l'embryon jusqu'à l'adulte. Plusieurs études ont utilisé les biopuces ADN pour faire l'analyse du transcriptome embryonnaire chez la souris. Ces études présentent des différences sexuelles qui sont indépendantes des hormones sexuelles, du moins des hormones circulantes provenant des gonades. En effet, il a été démontré que 591 transcrits étaient exprimés différenciellement entre les embryons mâles et femelles au jour de gestation 3.5 (embryon de 60 cellules) [373]. Toujours chez la souris, avant la formation des gonades, les niveaux d'expression génique dans le cerveau montrent qu'il y a 51 gènes différenciellement exprimés [374]. L'expression génique globale des ovaires et des testicules en formation a aussi été étudiée avec des biopuces ADN [375]. Un modèle du programme transcriptionnel des gonades en développement a donc pu être dressé à l'issue de l'étude, ce qui a apporté de nouveaux éléments dans la compréhension de la différenciation sexuelle. Il a pu être démontré que, durant une période de développement s'étalant sur quelques jours, l'expression de plus de 2300 gènes variait entre l'ovaire et le testicule. Une étude semblable menée chez l'adulte sur différents tissus somatiques (foie, rein, tissu adipeux, etc...) a permis l'identification de milliers de gènes différenciellement exprimés entre les sexes [376].

Il n'existe que très peu d'études portant sur la génomique du poumon en développement en fonction du sexe fœtal. Une analyse menée en 2006 avec une approche de biopuces ADN a mis en évidence qu'il existait au moins 83 gènes dans le poumon fœtal présentant une différence sexuelle dans leur profil d'expression pendant une période gestationnelle chevauchant la montée de la production du surfactant chez la souris [377]. Toutefois, pour de nombreux gènes connus pour être impliqués dans le

développement et la maturation du poumon, l'étude n'a pu montrer de différence sexuelle dans leur niveau d'expression. Une étude a montré qu'il existait une différence sexuelle plus tard en gestation dans l'expression des gènes suivants: *Klf5* (de l'anglais Kruppel-like factor 5), connu pour son rôle de régulateur dans le métabolisme du surfactant; *CCPI6* (de l'anglais clara cell protein 16), une protéine immunomodulatrice associée à la prématurité et: *GPX* (de l'anglais glutathione peroxidase), connue pour son rôle d'enzyme antioxydante [378, 379]. En 2010, l'étude de Bresson *et al.* met en évidence une liste de gènes qui présentent des différences sexuelles dans le poumon dans une période incluant la montée de synthèse du surfactant dans le développement fœtal murin [380]. L'étude a montré que 1844 gènes étaient exprimés avec une différence sexuelle au jour de gestation 17.0 et 833 gènes au jour de gestation 18.0. Dans la deuxième partie de l'étude, un traitement au flutamide a permis de montrer que de nombreux gènes étaient modulés par les androgènes: 1597 en JG 17.0 et 1775 en JG 18.0. À JG 17.0 et JG 18.0, les résultats ont mis en évidence que les poumons mâles présentaient une intense activité transcriptionnelle des voies prolifératives pour ces temps de gestation. Quelques gènes, modulés en fonction du sexe fœtal ou du traitement flutamide, étaient impliqués dans la régulation du développement pulmonaire notamment dans la différenciation de l'épithélium pulmonaire. Ces gènes étaient liés aux voies de signalisation SHH, FGF, TGF β et IGF [380]. Il semble donc que plusieurs voies de signalisation reconnues pour leurs rôles essentiels dans la morphogénèse pulmonaire soient régulées selon le sexe fœtal. Plus récemment, des différences sexuelles ont été mises en évidence dans l'expression de microARNs au stade canaliculaire et sacculaire. Ces microARNs sont associés à l'expression de gènes importants pour le développement tels que les rétinoïdes, *IGF1R*, *VEGF*, des médiateurs du métabolisme du glucose et la signalisation de la protéine tumorale p53 [381-383].

1.7.2 Conclusion de la section

De nombreux facteurs génétiques, épigénétiques ou hormonaux peuvent affecter le développement normal du poumon mâle et femelle. Il a été rapporté que la différence d'expression de certains gènes selon le sexe fœtal dans les derniers stades du développement pulmonaire pouvait influencer les perspectives de santé de l'enfant dépendamment de son genre [384]. Ces différents éléments complètent le contexte et les bases de mon étude qui vous est présenté au chapitre III.

1.8 Présentation du projet de recherche

À un stade avancé du développement du fœtus, l'épithélium alvéolaire des mammifères se différencie afin de préparer le poumon aux échanges gazeux. Ce changement d'environnement nécessite d'importantes adaptations morphologiques et fonctionnelles du poumon. Les changements qui s'effectuent alors dépendent de fines interactions entre le mésenchyme et l'épithélium pulmonaire pour promouvoir la croissance du tissu et la différenciation des PTII qui sont la cible des changements les plus notables à l'origine de la production de surfactant pulmonaire. Le synchronisme de ces processus peut être influencé par les androgènes qui affectent la maturation du poumon. Le sexe du fœtus devient alors un facteur déterminant dans les études, le risque de développer un SDR étant plus élevé chez les garçons que les filles nés prématurément.

Mon projet de doctorat s'insère dans le contexte des études de transcriptomiques du poumon en développement initiées dans la première moitié des années 2000 dans le laboratoire. Lors de mon arrivée, le laboratoire avait publié deux études de transcriptomiques du poumon complet lors de jours de gestation encadrant le début de la synthèse du surfactant chez la souris. La première étude sur les différences sexuelles dans le poumon foetal a été publiée en 2006 [377]. La deuxième étude publiée en 2010 [380] comportait 2 volets dont un sur la différence sexuelle et un autre sur l'effet du flutamide sur l'expression des gènes dans le poumon complet. La précision de la fenêtre de gestation était de +/- 8h pour la première étude et de +/- 30 min pour la seconde, ce qui a permis de détecter plus de gènes avec des différences sexuelles dans l'étude de 2010. L'intérêt de cette fenêtre de gestation repose sur le fait qu'elle correspond au moment où la structure du poumon se modifie afin d'assurer les futurs échanges gazeux tout en préparant en parallèle la montée de synthèse du surfactant. Durant cette période de changement rapide, des modifications clés vont survenir et améliorer la survie des enfants nés prématurément. Ces enfants auront alors moins besoin d'assistance car le poumon aura acquis une plus grande autonomie. Nous proposons de documenter au niveau moléculaire l'impact du sexe du fœtus et du temps de gestation (+/- 30 min) sur l'expression des gènes dans des cultures pulmonaires enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales chez la souris. Ces deux types cellulaires sont le siège

d'une communication entre le mésenchyme et l'épithélium impliquée dans les mécanismes de développement et de maturation du poumon fœtal.

1.8.1 Hypothèses de travail

Les hypothèses principales ayant fait l'objet de mes recherches présentées dans cette thèse de doctorat sont les suivantes :

- 1) Les transcriptomes pulmonaires des fibroblastes et des cellules épithéliales fœtaux évoluent en fonction du temps de gestation chez la souris dans la période concernée.**

Plus spécifiquement, nous pensons que les transcriptomes vont changer en fonction du temps de gestation en lien avec le développement pulmonaire.

- 2) Les transcriptomes pulmonaires des fibroblastes et des cellules épithéliales fœtaux présentent une différence entre les mâles et les femelles pendant une période gestationnelle encadrant la montée de synthèse du surfactant pulmonaire chez la souris.**

Plus spécifiquement, nous pensons que les transcriptomes vont présenter une différence sexuelle pendant la période où survient la montée de synthèse du surfactant et que ces gènes dont l'expression va varier en fonction du sexe pourraient contribuer à expliquer le délai de maturation du poumon observé chez le mâle.

1.8.2 Objectif général

Les connaissances acquises dans le cadre d'une étude fondamentale du poumon en développement nous permettront d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes régulant le développement et la maturation pulmonaire. L'objectif principal à long terme est d'améliorer le pronostic des nouveau-nés prématurés pour qui le poumon est en général responsable des mauvaises conditions de survie.

1.8.3 Objectifs spécifiques

Cette recherche permettra de :

- 1) Comparer les profils d'expression génique spécifiques aux cellules fibroblastiques du poumon murin en JG17.5, JG18.0 et JG18.5 en utilisant une approche de biopuces ADN.
 - a) en fonction du temps de gestation
 - b) en fonction du sexe pour chaque temps de gestation

- 2) Comparer les profils d'expression génique spécifiques aux cellules épithéliales du poumon murin en JG17.5, JG18.0 et JG18.5 en utilisant une approche de biopuces ADN.
 - a) en fonction du temps de gestation
 - b) en fonction du sexe pour chaque temps de gestation

- 3) Identifier des gènes ou des processus affectés par le sexe fœtal et/ou par le temps de gestation.

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

II.1 Animaux

Des souris BALB/C femelles et mâles (Charles River, St-Constant, QC) certifiées sans pathogène et âgées au minimum de 5-6 semaines ont été utilisées pour nos protocoles. Nos protocoles ont été approuvés par le comité de protection des animaux du Centre de recherche du CHU de Québec. Les animaux ont été hébergés dans des salles maintenues à 22 °C (+/- 3°C) avec 50% (+/- 20%) d'humidité. Afin de préserver la photopériode de ces animaux, des cycles de lumière de 12 h (300 lux) ont été appliqués à la salle. Les animaux avaient accès à l'eau et à de la nourriture pour rongeurs avec 18% de protéines (Teklad, Montréal, QC, Canada) *ad libitum*. Avant d'être accouplés, les nouveaux animaux ont été acclimatés à ces conditions de vie pendant 8 jours.

II.2 Protocole d'accouplement

Les mâles et les femelles ont été accouplés dans une fenêtre d'exposition d'une heure pour déterminer avec précision l'âge gestationnel. La fin de la période d'accouplement correspond au jour de gestation (JG) 0.0.

II.3 Nécropsie

Les femelles gestantes ont été sacrifiées au jour de gestation 17.5, 18.0 et 18.5 dans une cage à induction par exposition au CO₂. Le sexe fœtal a été déterminé avant l'extraction des poumons fœtaux par observation du tractus génital à l'aide d'un microscope binoculaire et a été confirmé par la suite avec une amplification PCR du gène SRY. Les poumons fœtaux et des morceaux de pattes des différents fœtus ont ainsi été collectés pour l'étude. Les morceaux de pattes et quelques poumons ont été congelés directement sur glace sèche avant d'être stockés à -80°C tandis que d'autres poumons fœtaux ont été utilisés pour la préparation des cultures enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales.

II.4 Détermination du sexe fœtal

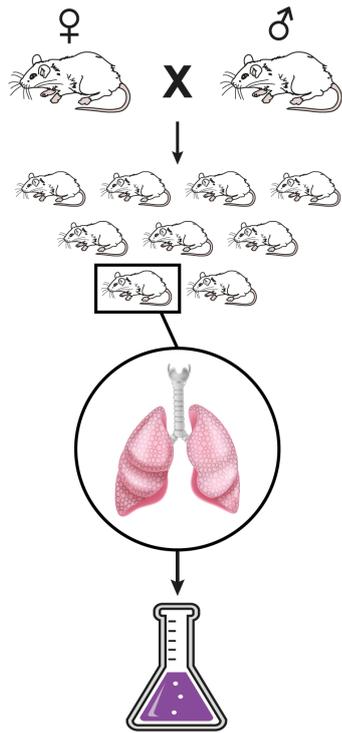
Avant de procéder à l'extraction des ARNs, le sexe fœtal a été confirmé par amplification PCR du gène spécifique au mâle *Sry* (GenBank no° X67204) en utilisant les morceaux de pattes congelés.

Dans un premier temps, l'ADN a été extrait des pattes à l'aide du kit Extract DNA Prep for PCR – Tissue (Quanta BioSciences) selon le protocole du manufacturier. Un amplicon de 282 nucléotides a été obtenu par PCR avec 0.04 nM de chaque amorce (sens: 5'-TATGGTGTGGTCCCGTGGTG-3'; antisens: 5'-ATGTGATGGCATGTGGGTTCC -3') en utilisant un kit AccuStart PCR SuperMix (Quanta BioSciences). Les conditions de PCR suivantes ont été utilisées: 94°C pendant 5 min, 10 min à 72°C suivi par 34 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 65°C et 72°C pendant 1 min. L'élongation finale a été faite à 72°C pendant 10 min. Une électrophorèse sur gel d'agarose a permis la visualisation de l'amplicon.

II.5 Préparation des cultures enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales isolées des poumons fœtaux de souris

Un protocole d'ensemencement et d'adhésion différentielle a été mis au point spécialement pour l'étude en modifiant un protocole préalablement établi par notre laboratoire. Brièvement, les poumons fœtaux étaient collectés et regroupés selon le sexe comme décrit dans la Table 1. Ils ont été conservés dans un premier temps dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (Multicell) contenant du HBSS 1X (HBSS 10X: 4 g/L de KCL, 0.6 g/L de KH₂PO₄, 80 g/L de NaCl, 0.477 g/L de Na₂HPO₄ anhydre et 10 g/L de D-glucose avec un pH de 6 et une osmolarité d'environ 275 mOsm/kg, Multicell, Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) dans une proportion de 5:1 à 4°C pendant 30 min. Ils ont été ensuite coupés en morceau d'approximativement 2 mm³ et conservés à 4 °C pendant encore 20 min avant d'être transférés dans une unité de trypsination contenant une solution de digestion.

Cette solution était composée d'HBSS (1x) (Multicell) contenant de la collagénase (1.7 mg/ μ l) (Sigma, St-Louis, MO, USA), de la dispase (2.4 U/ μ l) (Roche), de la pénicilline (1000 U/ μ l), de la streptomycine (1000 μ g/ μ l) (Multicell) et de la gentamicine (0.5 mg/ μ l) (Sigma). Le protocole a été optimisé pour qu'une unité de trypsination de 100 ml (Wheaton, USA) et a donné un bon rendement avec un minimum de 5 poumons dans 5 ml de solution. L'unité a été placée à 37°C pendant 20 min sous agitation magnétique puis les réactions enzymatiques ont été prolongées de 20 min suite à l'ajout de trypsine 1X (0.25% (poids/volume) trypsine 10X, EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 0.2M et Hepes 0.11M) (Multicell) et de DNase I (1 μ g/ μ l) (Sigma). La digestion a été stoppée par l'addition de 5 ml de DMEM contenant 20% de sérum fœtal bovin (FBS) (Multicell) et 10 ml de PBS 1X: EDTA 1 mM (4:1) (PBS 1X: 0.144 g/L de KH_2PO_4 , 9 g/L de NaCl et 0.795 g/L de Na_2HPO_4 anhydre avec un pH de 7.4 et une osmolarité d'environ 287 mOsm/kg). Le matériel a été filtré sur des filtres stériles avec pores de 100 μ m (cell strainer, VWR International, Montréal, QC, Canada) et les filtrats ont été centrifugés 7 min à 100 g. Les culots ont été resuspendus dans du DMEM contenant 20% de FBS, pénicilline et streptomycine (DMEM/SÉRUM/P/S),ensemencés dans des plaques de culture 6 puits, puis placés dans un incubateur humide à 37 °C avec 5% CO_2 pour 1 h afin de permettre l'adhésion des fibroblastes (Figure 12). À l'issue du temps d'adhésion des fibroblastes, les surnageants ont été récupérés puis réensemencés 2 fois pendant 1 h à 37°C. Les plaques contenant les fibroblastes ont été conservées dans le DMEM/SÉRUM/P/S dans l'incubateur. A l'issue des 3h de culture, les surnageants contenant la fraction enrichie en cellule épithéliale ont été récupérés, passés sur filtre de 45 μ m et centrifugés 7 min à 100 g. Les culots ont été resuspendus dans du DMEM/SÉRUM/P/S avant d'être ensemencés dans une nouvelle plaque de culture 12 puits. Les cellules épithéliales ont été conservées 4h à 37°C sous 5% CO_2 . Le phénotype des cellules a été confirmé par observation au microscope à contraste de phase puis les cellules ont été traitées à la trypsine afin de les décoller de la plaque. Les fibroblastes et les cellules épithéliales ont été centrifugés 5 min à 18,800 g dans des microtubes, puis les culots ont été directement congelés sur glace sèche avant d'être conservés à -80°C.



Accouplement de 1h

Sacrifice, sexage des fœtus et extraction des poumons

Digestion enzymatique

Culture cellulaire par adhésion différentielle

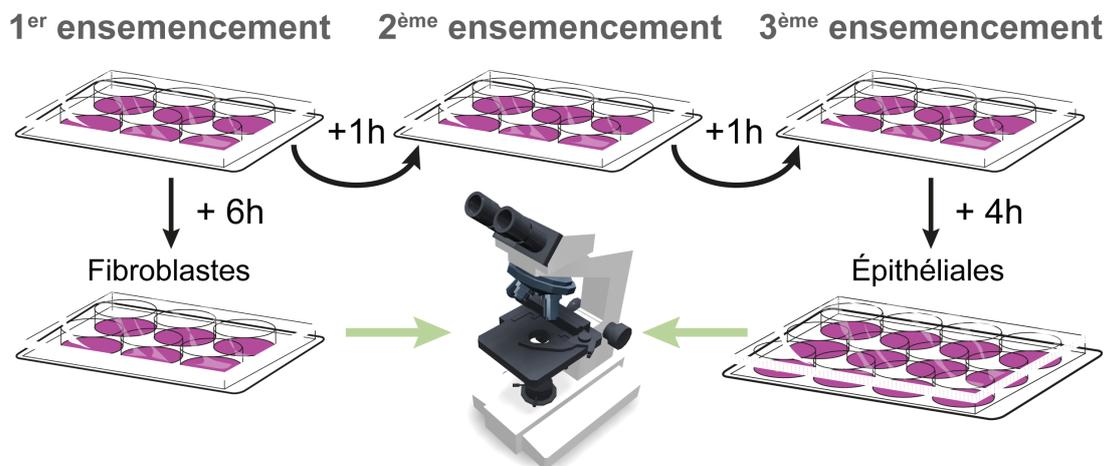


Figure 12 : Protocole expérimental utilisé pour les cultures enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales.

II.6 Isolation de l'ARN

Les échantillons de culture de fibroblastes et de cellules épithéliales pulmonaires ont été congelés séparément par portée et par sexe. Toutefois, le protocole de cultures enrichies en cellules fibroblastiques et épithéliales ne permet de récolter qu'un faible nombre de cellules épithéliales. Cet aspect du protocole a représenté notre plus grande difficulté. Dans ces conditions, nous avons convenu de constituer des pools.

A la demande de la plateforme de génomique du CHU de Québec, l'ARN des cultures cellulaires a été extrait à partir d'un kit *QIAGEN RNeasy mini kit* et purifié avec un kit *QIAGEN kit MinElute Cleanup Handbook* selon le protocole du manufacturier. Chaque pool a été constitué de plusieurs cultures de cellules provenant de différents fœtus de même sexe et issus de plusieurs portées. Chaque groupe expérimental (n=1) comptait 3 à 6 cultures présentées en Table 1 pour un total maximum de 1.34 µg d'ARN total obtenu par pool dans les cultures de fibroblastes et un maximum de 721 ng d'ARN total par pool pour les cultures de cellules épithéliales. Un triplicata biologique a été réalisé pour chaque condition. Finalement, 36 échantillons ont été utilisés pour l'hybridation des biopuces à ADN (Table 4).

Pour les expériences qPCRs, l'extraction de l'ARN à partir de poumons entiers de fœtus de souris a été réalisée selon un protocole qui utilise le TriReagent, un mélange de phénol et de thiocyanate de guanidine dans une solution monophasique (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). Les poumons fœtaux issus de la même portée et du même sexe ont été homogénéisés ensemble dans 5 ml de réactif TriReagent pendant 30-60 s à environ 20,500 tour.min⁻¹ avec un homogénéisateur (Ultra-Turax) muni d'une tige de 18 mm de diamètre. Cet appareil fait subir à l'échantillon à la fois agitation et torsion à forte vitesse permettant la rupture des cellules. En utilisant la solubilité différentielle des molécules entre deux phases non miscibles, un volume de 600 µl de chloroforme a été ajouté à chacun des échantillons afin de séparer les acides nucléiques des protéines et autres contaminants.

GD 17.5																	
POOL 1				POOL 2				POOL 3									
FEMELLES			MÂLES			FEMELLES			MÂLES			FEMELLES			MÂLES		
Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes
1	6	2	1	8	2	1	6	2	1	10	2	1	10	3	1	6	3
2	8	2	2	8	2	2	8	2	2	8	2	2	8	4	2	10	4
3	6	3	3	8	3	3	10	2	3	6	2	3	6	4	3	8	4
4	10	3	4	6	3	TOTAL	24	6	TOTAL	24	6	4	6	2	4	6	2
TOTAL	30	10	TOTAL	30	10							TOTAL	30	13	TOTAL	30	13
Quantité ARN fibroblastes = 848 ng Quantité ARN épithéliales = 597 ng			Quantité ARN fibroblastes = 803 ng Quantité ARN épithéliales = 623 ng			Quantité ARN fibroblastes = 789 ng Quantité ARN épithéliales = 605 ng			Quantité ARN fibroblastes = 801 ng Quantité ARN épithéliales = 619 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.02 µg Quantité ARN épithéliales = 592 ng			Quantité ARN fibroblastes = 993 ng Quantité ARN épithéliales = 579 ng		

GD 18.0																	
POOL 1				POOL 2				POOL 3									
FEMELLES			MÂLES			FEMELLES			MÂLES			FEMELLES			MÂLES		
Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes
1	6	2	1	6	2	1	6	2	1	10	2	1	6	2	1	8	2
2	6	2	2	6	2	2	8	3	2	6	3	2	6	3	2	8	3
3	6	2	3	6	2	3	8	3	3	6	3	3	6	3	3	8	3
4	6	3	4	6	3	4	8	2	4	8	2	4	8	2	4	6	2
5	6	3	5	6	3	TOTAL	30	10	TOTAL	30	10	5	10	2	5	6	2
6	6	2	6	6	2							TOTAL	36	12	TOTAL	36	12
TOTAL	36	14	TOTAL	36	14												
Quantité ARN fibroblastes = 1.11 µg Quantité ARN épithéliales = 617 ng			Quantité ARN fibroblastes = 987 ng Quantité ARN épithéliales = 609 ng			Quantité ARN fibroblastes = 892 ng Quantité ARN épithéliales = 601 ng			Quantité ARN fibroblastes = 926 ng Quantité ARN épithéliales = 579 ng			Quantité ARN fibroblastes = 997 ng Quantité ARN épithéliales = 634 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.26 µg Quantité ARN épithéliales = 703 ng		

GD 18.5																	
POOL 1				POOL 2				POOL 3									
FEMELLES			MÂLES			FEMELLES			MÂLES			FEMELLES			MÂLES		
Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes	Cultures	Nbre de poumons	Nbre de femelles gestantes
1	6	2	1	8	2	1	6	2	1	6	2	1	12	4	1	12	4
2	6	2	2	10	2	2	10	2	2	6	2	2	12	3	2	12	3
3	8	3	3	10	3	3	6	2	3	8	2	3	12	3	3	12	3
4	10	2	4	6	2	4	6	3	4	8	3	4	12	3	4	12	3
5	10	2	5	6	2	5	6	3	5	6	3	5	12	3	5	12	3
6	6	2	6	6	2	6	6	2	6	6	2	TOTAL	36	10	TOTAL	36	10
TOTAL	40	11	TOTAL	40	11	TOTAL	40	14	TOTAL	40	14						
Quantité ARN fibroblastes = 1.33 µg Quantité ARN épithéliales = 721 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.11 µg Quantité ARN épithéliales = 719 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.29 µg Quantité ARN épithéliales = 701 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.34 µg Quantité ARN épithéliales = 713 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.14 µg Quantité ARN épithéliales = 689 ng			Quantité ARN fibroblastes = 1.19 µg Quantité ARN épithéliales = 677 ng		

Table 4 : Échantillonnage des poumons fœtaux de souris pour les analyses de biopuces ADN. *Nombres de poumons fœtaux (au jour de gestation 17.5, 18.0 et 18.5) utilisés pour établir les pools selon le sexe. Le nombre de femelles gestantes utilisées le même jour est indiqué ici pour chaque culture. La quantité d'ARN total obtenue par pool de cultures et par type cellulaire est donnée pour chaque sexe. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.*

Après incubation de 15 min à la température pièce puis centrifugation à 5,000 rpm pendant 20 min à 4°C, la phase aqueuse contenant l'ARN a été transférée dans un nouveau tube où ont été ajoutés 3 ml d'isopropanol pour précipiter les acides nucléiques qui ont ensuite été récupérés par centrifugation (20 min, 5,000 RPM). Ainsi concentrés, les ARNs ont été lavés pour éliminer toute trace de sels, puis séchés et remis en solution dans 425 µl d'eau par échantillon. Un gradient de chlorure de césium (CsCl) a été réalisé afin d'éliminer toute trace de contaminant. L'ARN a été déposé sur un coussin

de solution de CsCl-EDTA (CsCl 5.6 M : EDTA 0.1 M). Les échantillons ont ensuite été centrifugés 4 h à 131,440 g à une température de 20°C dans une centrifugeuse Optima MAX (Beckman, Mississauga, ON, Canada) avec un rotor TLA120.2. L'ARN (culot) a été resuspendu dans 300 µl d'eau exempte d'ARNase et précipité à l'éthanol (1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 5.5 et 2.5 volumes d'ETOH). Après le dosage des ARNs, ceux-ci ont été directement utilisés pour la préparation des cDNAs ou ont été reprécipités à l'éthanol. Pour chaque monoplica, les échantillons d'ARN de 3 fœtus de même sexe et issus de la même portée ont été poolés avant l'homogénéisation et un triplicata biologique a été réalisé pour chaque groupe (n= 3).

II.7 Préparation des échantillons pour les biopuces à ADN d'Affymetrix « Mouse Gene 1.0 ST »

La quantité d'ARN total a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Il faut éviter toute trace de contamination (phénol, diéthyl pyrocarbonate (DEPC), ADN génomique...) ou de dégradation. Les valeurs du ratio de densité optique 260 nm/280 nm étaient uniformément au-dessus de 1,9 pour tous les échantillons. Le succès final de l'expérience étant étroitement lié à la qualité des échantillons d'ARNs, elle a été confirmée en utilisant un bioanalyseur (BioAnalyzer Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Pour nos expériences, nous avons utilisé les biopuces à ADN d'Affymetrix « Mouse Gene 1.0 ST » (Affymetrix, Santa Clara, CA) et le service de génomique du Centre de recherche du CHU de Québec. Les biopuces à ADN « Gene 1.0 ST » bénéficient d'un design simplifié basé sur les banques de données des séquences génomiques les plus récentes. Chaque gène est étudié par un set d'en moyenne 26 oligonucléotides ayant une concordance nucléotidique parfaite. Ces oligonucléotides de 25-mer correspondent à des séquences distribuées sur toute la longueur des ARNm (whole-transcript arrays). Lors de l'analyse, leurs signaux sont intégrés en une seule valeur représentant le niveau d'expression du gène. La biopuce interrogeait environ 28,853 gènes.

II.8 Préparation des sondes, hybridation des biopuces à ADN, balayage et analyse

L'ARN total (150 ng par échantillon) a été marqué selon le protocole du kit Ambion WT Expression utilisé pour produire l'ARNc biotinylé, puis hybridé aux biopuces (Genechips) d'Affymetrix « Mouse Gene 1.0 ST » comme décrit par le fabricant (pour informations supplémentaires, voir la Table 5). L'hybridation a été faite pendant la nuit dans un four à 45°C avec rotation. Après 16h d'hybridation, les puces ont été lavées et les molécules de sondes hybridées ont été détectées à l'aide d'un appareil « Affymetrix GeneChip fluidics station 450 » selon les recommandations d'Affymetrix (protocole EukGE-WS2v5_450). La réaction colorimétrique a été réalisée avec de la streptavidine conjuguée à de la phycoérythrine (SAPE; Molecular Probes), puis par l'amplification du signal avec un anticorps biotinylé anti-streptavidine (Vector Laboratories). Cette étape d'amplification a été réalisée 2 fois consécutivement. Finalement, les biopuces ont été balayées par un scanner Affymetrix GCS 3000 7G permettant le balayage à haute résolution. Les fichiers étaient ensuite traités au moyen du logiciel Affymetrix GeneChip Command Console utilisé pour générer des fichiers de niveaux relatifs d'expression des gènes (CEL files). Le contrôle interne de qualité des puces a été assuré par le logiciel AffyQCReport. Une qualité comparable entre chaque biopuce est exigée et a été obtenue pour toutes les puces, permettant la comparaison des valeurs relatives entre les puces.

Table 5 : Caractéristiques des ARNs totaux et des sondes pour les biopuces à ADN.

Quantité	Quantité optimale 1 µg Quantité minimale 500 ng
Concentration	≥ 50 ng/µl
Qualité	DO260/DO280 ≥ 1.8 Absence de signe de dégradation sur un gel d'agarose et ratio 28S/18S ≥ 1.6 et/ou RIN ≥ 6 sur un profil du Bioanalyzer d'Agilent
Réplicats biologiques	Nombre : 3

Qualité des sondes synthétisées^a

Rendement de la synthèse d'ARNc	≥ 20 µg à partir de 100-300 ng d'ARN total
Taille moyenne des ARNc	≥1000-1500 nt
Rendement de la synthèse d'ADNc simple brin	≥ 5.5 µg à partir de 8 à 10 µg d'ARNc

^aDonnées obtenues de la plateforme de génomique du Centre de recherche du CHU de Québec.

II.9 Analyse des données

L'analyse des biopuces a été réalisée en utilisant les valeurs relatives d'expression des fichiers CEL. Les fichiers CEL ont été importés dans le logiciel d'Affymetrix et les valeurs ont été normalisées en utilisant le RMA (Robust multiarray average). Le RMA est un algorithme utilisé pour créer une matrice d'expression à partir des données Affymetrix. Les valeurs d'intensité brute des transcrits couverts par la biopuce ont été corrigées et transformées en log₂ afin d'obtenir une distribution plus symétrique par rapport à la moyenne (distribution normale) et de diminuer l'influence des valeurs extrêmes. La transformation en log₂ des données des biopuces permet d'effectuer des analyses statistiques des résultats. Les données biopuces ont été analysées en utilisant le logiciel commercial Partek (Partek Genomics Suite, version 6.6; Partek Inc., St. Louis, MO). Pour chaque type cellulaire, une analyse de la variance à une variable (one way ANOVA) a été réalisée avec la variable temps (JG 17.5 et JG 18.5) et une analyse de la variance à deux variables (two-way ANOVA) a été réalisée avec les variables sexe (femelle et mâle) et temps (JG 17.5, JG 18.0 et JG 18.5). Un contraste entre deux variables a été calculé avec, pour chacun des gènes, une valeur de P

(P-value) et une valeur d'index de résistance (Fold Change, FC). Les résultats du test ANOVA ont été filtrés selon le taux de faux positifs (*False Discovery Rate*, FDR) obtenu par la méthode de Benjamini et Hochberg (Partek Inc.). Le FDR détermine le nombre de faux positifs parmi les différences déclarées significatives. Toutefois, en raison du peu de gènes proposés dans l'analyse de la variance selon le sexe avec FDR, j'ai effectué une deuxième analyse qui ne tient pas compte du paramètre FDR mais qui respecte les critères de sélection du P-value et du FC. Des listes ont ainsi été générées avec, pour paramètres, une différence supérieure ou égale à 1.2 (FC) et une P-value <0.05 avec et sans FDR pour l'analyse du sexe, et avec FDR pour l'analyse en fonction du temps.

Notre étude nous a amené à utiliser deux sources de données pour l'analyse bioinformatique de nos listes de gènes. La base de données Gene Ontology (<http://geneontology.org>) décrit les gènes impliqués dans les processus biologiques, les composants cellulaires et les fonctions moléculaires pour un certain nombre d'espèces. Nous avons utilisé les mots clefs suivant dans Gene Ontology afin de sélectionner des gènes de nos listes : « Lung », « Respiratory », « Communication », « Lipid », « Apoptosis » et « Proliferation ». La base de données du logiciel IPA Ingenuity (version ©2000-2016 QIAGEN) a été utilisée pour déterminer les voies de signalisation et les processus biologiques importants dans lesquels étaient potentiellement impliqués les gènes de nos listes.

II.10 Validation des données des biopuces ADN

Des PCRs quantitatives en temps réel (qPCR) ont été effectuées sur des échantillons d'ADNc préparés à partir de pools d'ARN de poumons complets qui ont été extraits selon le protocole décrit dans la section « *Isolation de l'ARN* » ci-dessus. Après purification des ARNs totaux, l'ADNc a été synthétisé à 42°C pendant 50 min en utilisant l'enzyme Superscript II (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et des amorces aléatoires hexamériques (pd(N)₆). Après avoir inactivé la transcriptase inverse à 70°C pendant 15 min, les échantillons d'ADNc ont été dilués 10 fois. Les mêmes échantillons d'ADNc ont été utilisés pour tous les gènes analysés. La liste des gènes étudiés est présentée en Table 5 de même que les séquences d'amorces spécifiques à chaque gène

ainsi que les conditions qPCR associées. Les amplifications PCR ont été réalisées avec un LightCycler 96 de Roche selon le protocole suivant; 5 s de dénaturation à 95°C; 5 s d'hybridation ; 20 s d'élongation à 72°C et 5 s d'acquisition du signal (les informations spécifiques à chaque gène sont données à la Table 6). Une estimation de la quantité d'ARNm du gène est donnée par le programme informatique de l'appareil qui se base sur le calcul du nombre de cycle où une mesure du point d'inflexion de la courbe d'amplification est enregistrée. Toutes nos efficacités qPCRs ont été estimées entre 1.83 et 1.91. Les produits de plusieurs qPCRs ont ensuite été testés sur un gel d'agarose 1.8%. Pour chaque gène, les amplicons ont été séquencés et leurs produits spécifiques ont été identifiés.

Pour accroître la similitude dans l'efficacité des réactions qPCRs entre les standards purifiés et les échantillons de cDNA, toutes les dilutions des courbes standards ont été préparées dans 0.1 % du tampon de la transcriptase inverse [377]. Les niveaux d'expression brute des quatre gènes de normalisation suivants ont été obtenus pour tous les échantillons: la sous-unité A du complexe succinate déshydrogénase (*Sdha*); l'hydroxyméthylbilane synthase (*Hmbs*); l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transférase 1 (*Hprt1*) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*Gapdh*). En utilisant le logiciel GeNorm, les deux gènes les plus stables (*Gapdh* et *Sdha*) ont été sélectionnés et leurs données d'expression ont été utilisées pour générer un facteur de normalisation spécifique pour chaque échantillon pour l'étude des différences sexuelles. Un deuxième ensemble de facteurs de normalisation a été obtenu par geNorm en utilisant les quatre gènes de référence pour l'étude des niveaux d'expression des gènes en fonction du temps.

Gene ^a	NCBI Accession Number	Oligonucleotides Sense/ Antisense ^b	Amplicon length (bp)	Ann ^c , T°C	Acq ^d , T°C	# of cycles
<i>Smad3</i>	NM_016769.4	CTGGGCCTACTGTCCAATGT/ GCAGCAAATTCCTGGTTGTT	239	56	84	40
<i>Bmp7</i>	NM_007557.3	GAAAACAGCAGCAGTGACCA/ GGTGGCGTTCATGTAGGAGT	165	56	83	40
<i>Chpt1</i>	NM_001146690.1	TGCTCATTGGCAGACTTACG/ ACCACCATGGAGGATCACAT	235	56	78	40
<i>Tgfb1</i>	NM_011577.1	TTGCTCAGCTCCACAGAGA/ TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC	183	56	82	40
<i>Pdgfb</i>	NM_011057.3	CCCACAGTGGCTTTTCATTT/ GTGGAGGAGCAGACTGAAGG	205	56	81	40
<i>Lpin1</i>	NM_015763.4	CCCCATTCTCATAGCTCAA/ CACTAGTGGCTCCTCCTTGC	195	56	82	40
<i>Dgat2</i>	NM_026384.3	TCTTGGGTATCTCGCTGCT/ AACGCCTCATAAAGGCACAC	231	56	84	40
<i>Egfr</i>	NM_207655.2	CAGTGGGCAACCCTGAGTAT/ GGGCCCTTAAATATGCCATT	175	56	81	40
<i>Rny3</i>	NR_024202.2	GGTTGGTCCGAGAGTAGTGG/ AAAGGCTGGTCAAGTGAAGC	101	56	76	40
<i>Rpl13a</i>	NM_009438.5	GGAGAAACGGAAGGAAATG/ ACAGGAGCAGTGCCTAAGGA	242	56	82	40
<i>Slc40a1</i>	NM_016917.2	CCCTGCTCTGGCTGTAAAAG/ GGTGGGCTCTTGTTCACATT	160	56	78	40
<i>Mmp10</i>	NM_019471.3	CAGGTGTGGTGTTCCTGATG/ GGAGAAAGTGAGTGGGGTCA	181	56	78	40
<i>Ankrd1</i>	NM_013468.3	TTGTGAAGGAGCCAGAACCT/ CGCCAAGTGCCTTCTAAGC	185	56	81	40
<i>Ch25h</i>	NM_009890.1	CACACACTGGGACAAAATGC/ TGTCAGGCTGCAAAAACAAC	214	56	85	40
<i>Spry4</i>	NM_011898.2	CCACACAGACCCTGTTTCCT/ TTCCTTCTCCCCCTTCCCTTA	207	56	80	40
<i>Exph5</i>	NM_176846.3	GTGCTGAGGACCAAGAAGC/ CTGCATTGCGAGCATCACTT	240	56	79	45
<i>Vim</i>	NM_011701	GATCAGCTCACCAACGACAA/ AAGACGTGCCAGAGAAGCAT	170	62	84	40
<i>K18</i>	NM_010664	GTGGAATCCAGACCGAGAAA/ GTTCTTCCTTGAGTGCCTCG	406	58	84	40
<i>Gapdh</i>	NM_008084.3	GTCGGTGTGAACGGATTTG/ AAGATGGTGATGGGCTTCC	215	61	84	40
<i>Hprt1</i>	NM_013556.2	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG/ AATCCAGCAGGTCAGCAAAG	228	64	82	40
<i>Sdha</i>	NM_023281	ACACAGACCTGGTGGAGACC/ CAAACGGCTTCTTCTGCTGT	179	58	82	40
<i>Hmbs</i>	NM_013551	GGAATGCATGTATGCTGTGG/ CAGGTACAGTTGCCATCTT	208	56	83	40

Table 6: Paramètres expérimentaux et oligonucléotides spécifiques des gènes sélectionnés pour l'analyse de PCR en temps réel des poumons de fœtus de souris.

^a*Smad3*, SMAD Family Member 3; *Bmp7*, Bone Morphogenetic Protein 7; *Chpt1*, Choline Phosphotransferase 1; *Tgfb1*, Transforming Growth Factor, Beta 1; *Pdgfb*, Platelet-Derived Growth Factor Beta Polypeptide; *Lpin1*, Lipin 1; *Dgat2*, Diacylglycerol O-Acyltransferase 2; *Egfr*, Epidermal Growth Factor Receptor; *Rny3*, RNA, Ro-Associated Y3; *Rpl13a*, Ribosomal Protein L13a; *Slc40a1*, Solute Carrier Family 40 (Iron-Regulated Transporter) Member 1; *Mmp10*, Matrix Metalloproteinase 10; *Ankrd1*, Ankyrin Repeat Domain 1; *Ch25h*, Cholesterol 25-Hydroxylase; *Spry4*, Sprouty Homolog 4; *Exph5*, Exophilin 5; *Vim*, Vimentin, *Krt18*, Keratin 18, Type I; *Gapdh*, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; *Hprt1*, Hypoxanthine guanine Phosphoribosyltransferase 1; *Sdha*, Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A flavoprotein; *Hmbs*, Hydroxymethylbilane Synthase.

^b Les séquences de nucléotides sont spécifiques pour chaque gène.

^cAnn. T°C, température d'hybridation; ^dAcq. T°C, température d'acquisition (fait référence à la température à laquelle la fluorescence est lue par l'appareil).

II.11 Validation technique du protocole d'isolation

Le niveau de pureté des cultures primaires a été estimé par qPCR en mesurant, pour chaque pool de culture, les niveaux d'expression de la vimentine (*Vim*) et de la kératine 18 (*K18*), marqueurs respectifs des cellules fibroblastiques et épithéliales. Pour les qPCRs, des échantillons d'ADNc ont été préparés à partir de chaque pool de culture. Les ratios d'ARNm de *K18 / Vim* ont été mesurés afin de déterminer l'enrichissement de la culture cellulaire. Un ratio *K18 / Vim* supérieur à 1 correspond à un enrichissement de la culture en cellules épithéliales tandis qu'un ratio inférieur à 1 correspond à une culture de fibroblastes enrichie.

II.12 Statistiques

Pour l'ensemble de nos expériences, il a été déterminé si les résultats obtenus étaient statistiquement significatifs. Un seuil de significativité noté p-value <0.05 a été choisis, ce qui signifie que nos résultats observés avaient moins de 5% de chances d'avoir été obtenus par le hasard. À chacun des points de temps, 5 femelles gestantes ont été utilisées (une par monoplica biologique) et les poumons entiers des fœtus ont été poolés pour chaque portée et chaque sexe. La normalité a été vérifiée par le test statistique de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances, caractérisée par la différence entre la distribution observée et la loi normale, a été contrôlée (test des résidus) afin de déterminer le test statistique applicable à chaque condition. Des modèles de *t*-tests non pairés ont été utilisés pour analyser les données de qPCR en fonction du temps (3 niveaux) et des *t*-tests pairés ont été utilisés pour l'analyse en fonction du sexe (femelles vs mâles) afin d'établir si la différence dans les niveaux d'expression des gènes était significative. La transformation de la réponse des variables a été appliquée quand l'hypothèse de normalité n'était pas respectée, on a alors utilisé des tests de rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés pour l'analyse en fonction du sexe et des tests de rangs signés de Wilcoxon classique pour l'analyse dans le temps afin d'établir si la différence dans les niveaux d'expression des gènes était significative dans ces conditions. Pour toutes nos analyses, on a considéré des p-values < 0.05 comme étant significatives en utilisant la procédure mixte du logiciel SAS (SAS 9.4, SAS Inc.).

CHAPITRE III : Résultats

Précédemment, l'analyse sur poumon entier de fœtus en JG 15.5 et 17.5 avait montré des différences sexuelles dans l'expression de plusieurs gènes. Toutefois, des gènes rapportés comme étant importants pour le développement et la maturation pulmonaire ne présentaient pas de différence [377]. L'étude de Bresson *et al.* [380] a quant à elle montré qu'il existait dans le poumon entier en développement un nombre considérable de gènes modulés en fonction du temps.

Dans le but de fournir une liste de gènes candidats impliqués dans la régulation du développement et de la maturation du poumon fœtal, nous avons fait une étude transcriptomique avec des cultures primaires enrichies en fibroblastes et en cellules épithéliales isolées entre JG 17.5 et 18.5 à partir de fœtus de souris mâles et femelles. Les résultats ont été analysés en fonction du temps de développement et en fonction du sexe.

III.1 Validation du modèle cellulaire et des données de transcriptomique par qPCR

III.1.1 Enrichissement des cultures cellulaires en fibroblastes et en cellules épithéliales

L'enrichissement cellulaire nécessaire à l'élaboration des échantillons a été confirmé par la mesure des ratios d'expression de l'ARN messager de *K18* (Cytokératine 18, marqueur des cellules épithéliales) sur l'ARN messager de *Vim* (Vimentine, marqueur des cellules mésenchymateuses) (Figure 13B). Les mesures ont été effectuées à partir des mêmes préparations d'ARN utilisées pour les biopuces en JG 17.5 et JG 18.5. Pour chacun des sexes et chacun des temps, une amplification quantitative par réaction en chaîne de la polymérase (qPCR) a confirmée l'enrichissement des cultures avec des ratios ARNm *K18/Vim* montrant une différence d'environ 49 fois entre les cellules épithéliales et fibroblastiques pour les mâles et de 35 fois pour les femelles. Les images observées en microscopie optique ont confirmé aussi cette différence avec une culture de cellules fibroblastiques majoritairement constituée de cellules en fuseaux et une culture de cellules épithéliales présentant un phénotype de cellules pavimenteuses et en amas (Figure 13A).

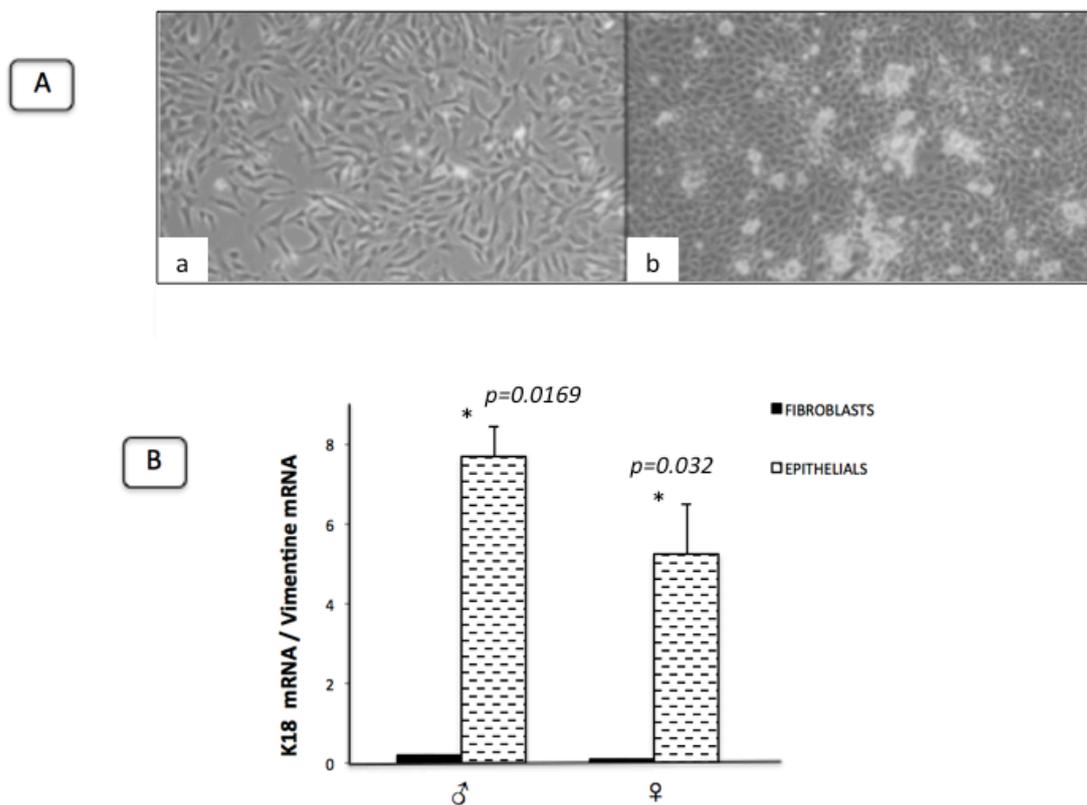


Figure 13 : Niveaux d'expression de *K18* et *Vim* dans nos cultures cellulaires enrichies issues de poumons fœtaux de souris. *A) Photographies des cultures cellulaires obtenues. Les cultures fibroblastiques (a) présentent un phénotype en fuseaux et les cultures épithéliales (b) sont identifiables par leur phénotype pavimenteux. Grossissement 200X. B) Mesure des ratios de quantité relative d'ARNm de *K18* (marqueur des cellules épithéliales) sur *Vim* (marqueurs des cellules fibroblastiques) dans les cultures selon le sexe fœtal.*

III.1.2 Niveaux relatifs d'expression des ARNm dans des poumons entiers

Les contrôles internes du logiciel AffyQCReport de la plateforme de génomique évaluant la validité et la reproductibilité des données des biopuces ont confirmé la qualité de chaque échantillon. En accord avec la détermination du sexe fœtal qui avait été confirmé en PCR (données non présentées), l'analyse de nos listes a permis de mettre en évidence des gènes associés au chromosome Y dans les échantillons mâles. Les gènes *Ddx3y* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked), *Eif2s3y* (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, Y-linked) et *Uty* (Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Containing, Y-Linked) sont exprimés comme

attendu dans nos biopuces avec une expression exclusivement chez le mâle pour chaque temps étudié.

Les patrons d'expression dans les poumons entiers ont été déterminés pour 8 gènes pour l'analyse des résultats en fonction du temps et pour 12 gènes pour l'analyse des différences sexuelles afin de comparer avec les résultats des biopuces. Les résultats sont présentés dans les figures 14 à 23. L'analyse en fonction du temps des gènes *Spry4*, *Ankrd1*, *Rny3*, *Rpl13a*, *Slc40a1*, *Ch25h*, *Mmp10* a confirmé les tendances des patrons d'expression des biopuces pour les cultures. Seul le gène *Exph5* a démontré une tendance inverse à la biopuce dans cette analyse, mais cette différence n'était pas significative en qPCR.

Afin de compléter nos analyses, les gènes *Spry4*, *Ankrd1*, *Rny3* et *Rpl13a* qui présentaient des différences sexuelles au temps de gestation 18.5 dans les biopuces ont été eux aussi sélectionnés pour une mesure des profils d'expression en poumon entier (qPCR) pour comparer les niveaux d'expression selon le sexe. Comme observé précédemment, nos gènes sélectionnés ont montré une tendance similaire ou identique dans le tissu entier (qPCR) et dans les cultures primaires (biopuces). C'est le cas du gène *Ankrd1* en qPCR qui présentait une différence sexuelle significative en faveur des femelles conformément au résultat donné par les analyses des biopuces (FC 1.55). Le Fold change positif correspond à une expression génique supérieure chez la femelle versus le mâle. Cependant, certains gènes présentent des différences entre les poumons entiers et les cultures primaires. Par exemple, le gène *Spry4* montrait 3 portées sur 5 avec un niveau d'expression (qPCR) supérieur chez les mâles *versus* les femelles conformément aux données de la biopuces (FC -1.84). Le Fold change négatif correspond à une expression génique supérieure chez le mâle versus la femelle. De la même manière, les niveaux d'expression en qPCR de 2 gènes, *Rpl13a* et *Rny3*, ne variaient pas dans le même sens que les résultats des biopuces (FC -2.83 et -2.52 pour *Rpl13a* et *Rny3*, respectivement).

A la lumière de ces résultats pour la validation des analyses de biopuces, nous avons effectué des analyses supplémentaires pour 8 gènes sélectionnés afin de déterminer dans quelle proportion les mesures des niveaux d'expression des gènes sur le

poumon entier (qPCR) corroboraient les résultats des analyses des biopuces. Ces gènes ont été sélectionnés sur les listes produites par le logiciel Partek à partir des analyses statistiques effectuées avec et sans le test FDR mais en ne conservant que les gènes présentant une différence dont la p-value était inférieure à 0.05 (risque d'erreur maximum de 5%). Les différences sexuelles observées pour 5 des 8 gènes (*Smad3*, *Bmp7*, *Egfr*, *Pdgfb* et *Dgat2*) en poumon entier (qPCR) étaient conformes aux résultats attendus. Il faut noter que, pour le gène *Bmp7*, une des 5 portées présentait une différence sexuelle différente du résultat des biopuces, mais qui n'affectait pas la significativité statistique de la variation observée sur la moyenne des 5 portées. Les 3 gènes *Lpin1*, *Chpt1* et *Tgfβ1* présentaient une variation des niveaux d'expression selon le sexe contraire aux résultats fournis par l'analyse des expériences de biopuce.

En conclusion, les tendances des PCRs quantitatives sur ARN provenant de poumons entiers corroboraient à hauteur de 7 sur 8 gènes (87.5%) les résultats de biopuces pour les analyses en fonction du temps (Table 7), et à hauteur de 7 sur 12 gènes (58.3%) pour l'analyse selon le sexe fœtal (Table 8). Sur les 12, on avait 2 gènes (*Pdgfβ* et *Tgfβ1*) qui ne passaient pas le test du FDR. En les éliminant, les résultats qPCR corroboraient les résultats de biopuces à hauteur de 60% au lieu de 58.3%.

Gene	Modulation according to time
<i>Ch25h</i>	+
<i>Exph5</i>	-
<i>Mmp10</i>	+
<i>Slc40a1</i>	+
<i>Spry4</i>	+
<i>Rpl13a</i>	+
<i>Rny3</i>	+
<i>Ankrd1</i>	+

Table 7 : Corrélation dans l'expression de plusieurs gènes en fonction du temps entre l'étude du poumon entier par qPCR et l'étude des cultures primaires par biopuces. + : *corrélation significative*; - : *aucune corrélation significative*.

Gene	Modulation according to sex
<i>Tgfβ1</i>	-
<i>Smad3</i>	+
<i>Pdgfβ</i>	+
<i>Lpin1</i>	-
<i>Egfr</i>	+
<i>Dgat2</i>	+
<i>Chpt1</i>	-
<i>Bmp7</i>	+
<i>Spry4</i>	+
<i>Rpl13a</i>	-
<i>Rny3</i>	-
<i>Ankrd1</i>	+

Table 8 : Corrélation dans l'expression de plusieurs gènes en fonction du sexe entre l'étude du poumon entier par qPCR et l'étude des cultures primaires par biopuces. + : *corrélation significative*; - : *aucune corrélation significative*.

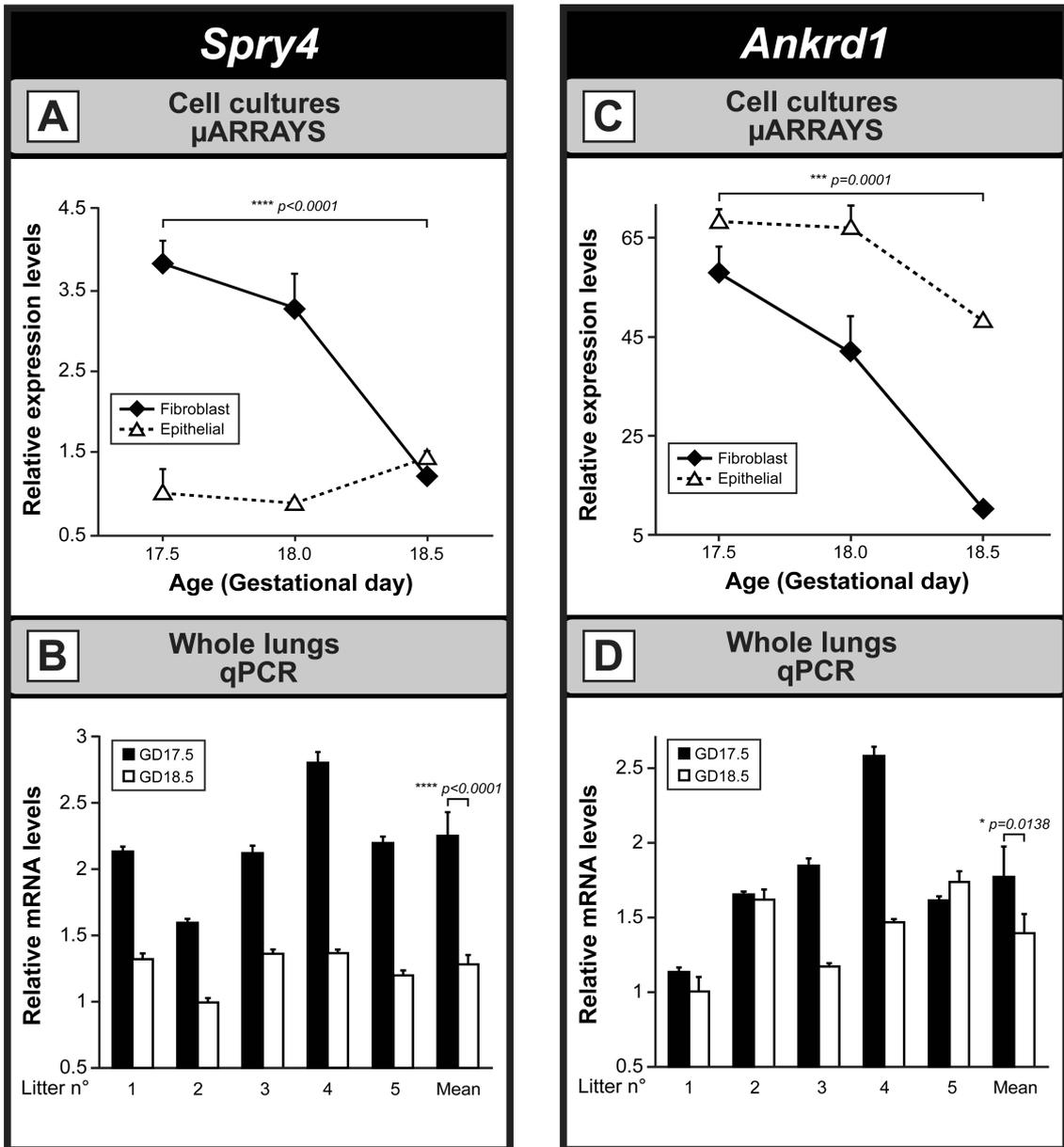


Figure 14 : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes *Spry4* et *Ankrd1* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Évolution de l'expression relative des gènes *Spry4* (A) et *Ankrd1* (C) (biopuces), chez les femelles dans les cultures cellulaires de fibroblastes et cellules épithéliales en fonction du temps de gestation 17.5, 18.0 et 18.5. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Spry4* (B) et *Ankrd1* (D) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers de femelles pour les jours de gestation 17.5 et 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

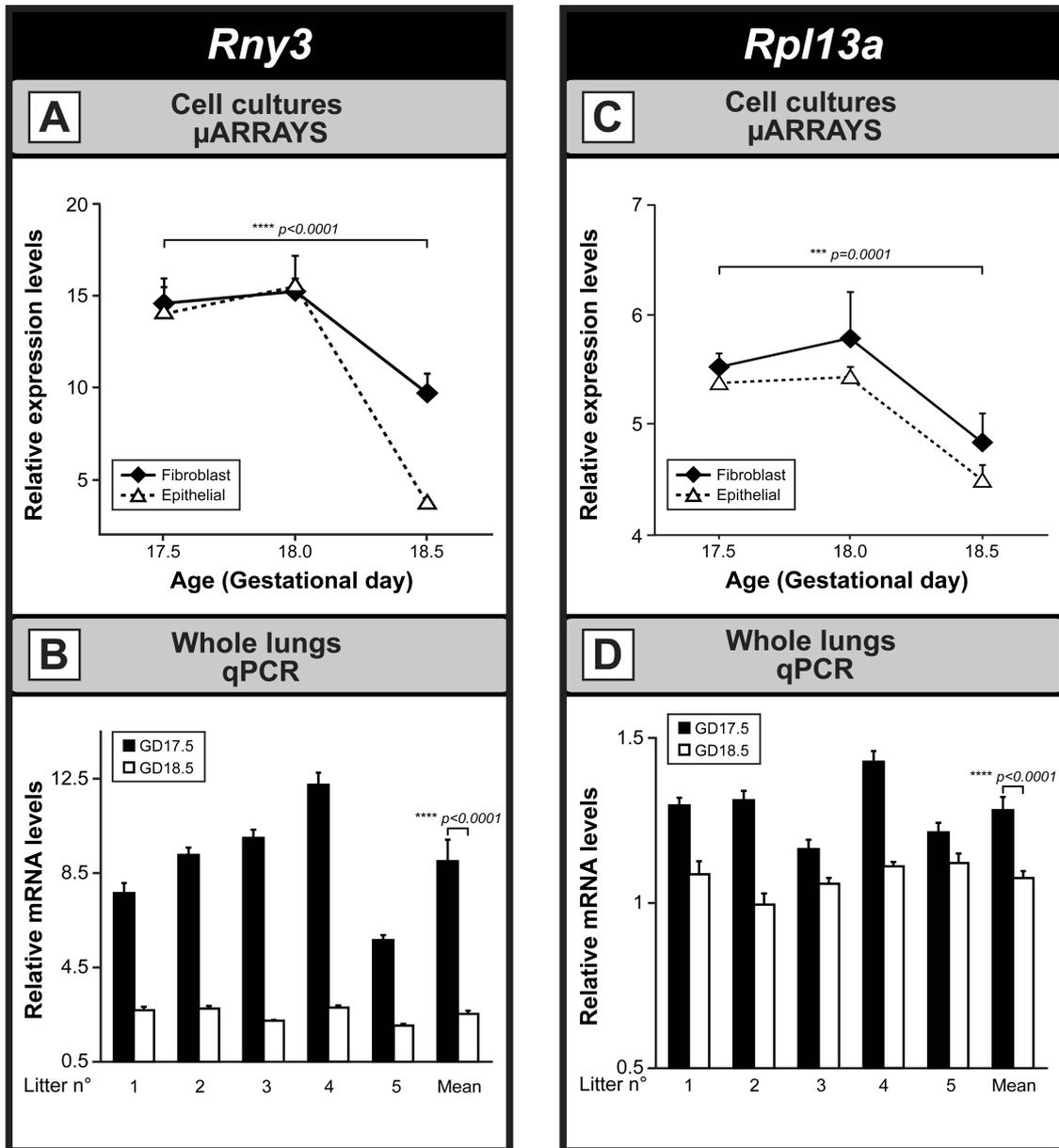


Figure 15 : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes *Rny3* et *Rpl13a* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Évolution de l'expression relative des gènes *Rny3* (A) et *Rpl13a* (C) (biopuces), chez les femelles dans les cultures cellulaires de fibroblastes et cellules épithéliales en fonction du temps de gestation 17.5, 18.0 et 18.5. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Rny3* (B) et *Rpl13a* (D) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers de femelles pour les jours de gestation 17.5 et 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

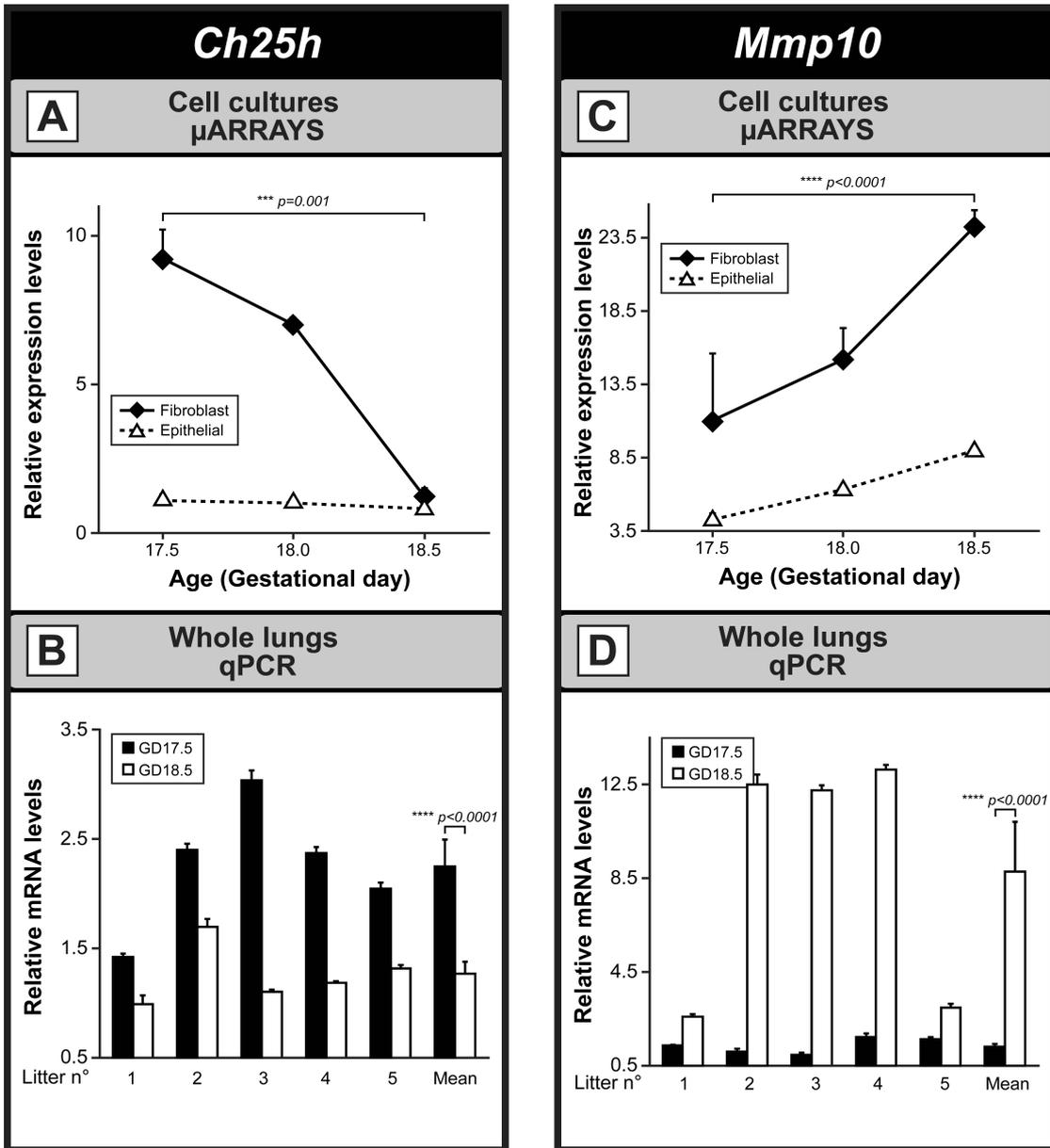


Figure 16 : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes *Ch25h* et *Mmp10* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Évolution de l'expression relative des gènes *Ch25h* (A) et *Mmp10* (C) (biopuces), chez les femelles dans les cultures cellulaires de fibroblastes et cellules épithéliales en fonction du temps de gestation 17.5, 18.0 et 18.5. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Ch25h* (B) et *Mmp10* (D) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers de femelles pour les jours de gestation 17.5 et 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

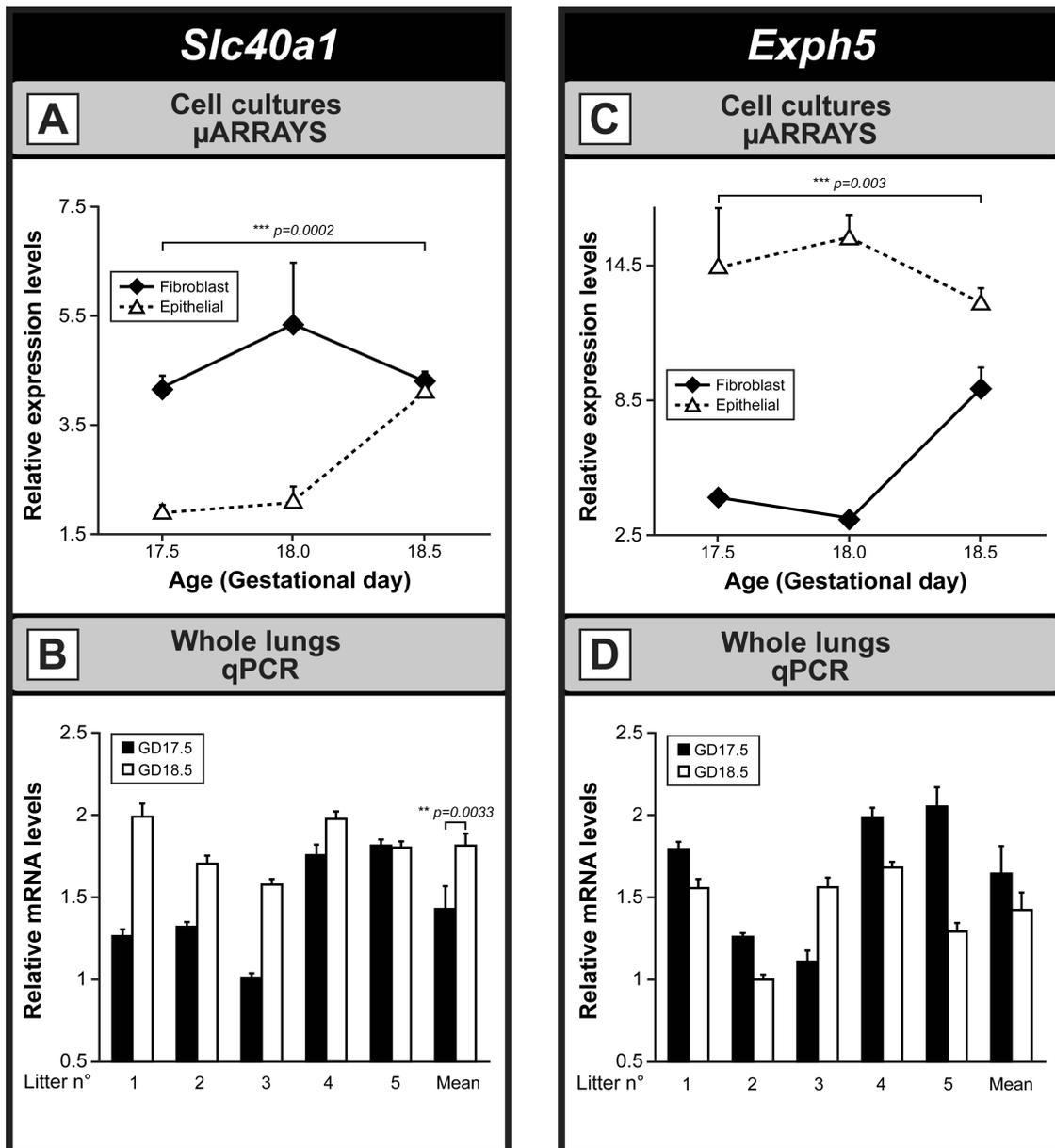


Figure 17 : Étude de l'effet du temps sur l'expression des gènes *Slc40a1* et *Exph5* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopses). Évolution de l'expression relative des gènes *Slc40a1* (A) et *Exph5* (C) (biopses), chez les femelles dans les cultures cellulaires de fibroblastes et cellules épithéliales en fonction du temps de gestation 17.5, 18.0 et 18.5. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Slc40a1* (B) et *Exph5* (D) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers de femelles pour les jours de gestation 17.5 et 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

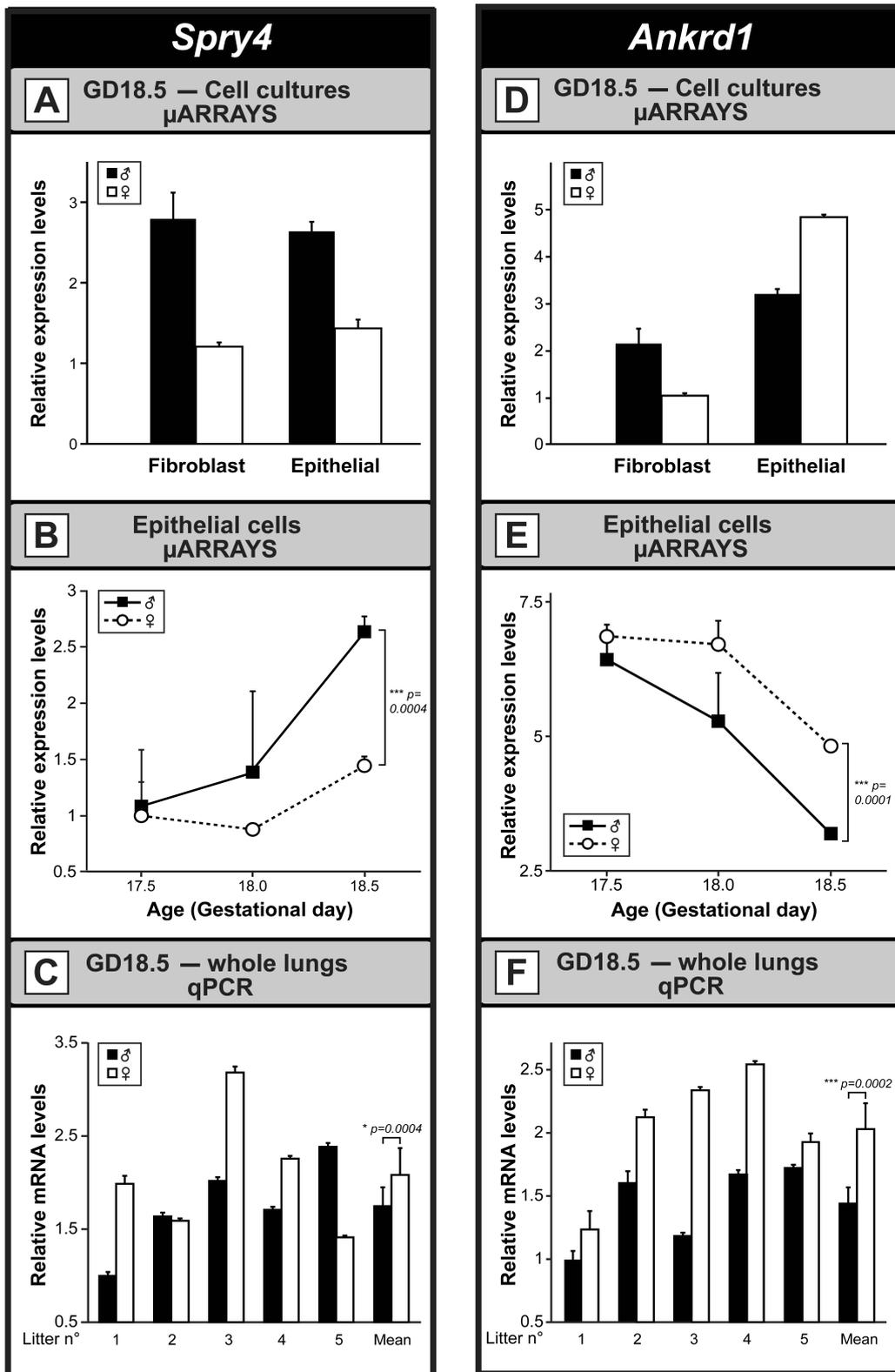


Figure 18 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes *Spry4* et *Ankrd1* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Niveaux d'expression relatifs des gènes *Spry4* (A) et *Ankrd1* (D) (biopuces) en fonction du sexe fœtal dans les cultures de cellules fibroblastiques et épithéliales au jour de gestation 18.5. Expression relative des gènes *Spry4* (B) et *Ankrd1* (E) (biopuces) selon le sexe fœtal dans les cultures cellulaires épithéliales en fonction du temps de gestation. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Spry4* (C) et *Ankrd1* (F) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers chez des mâles et chez des femelles en JG 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

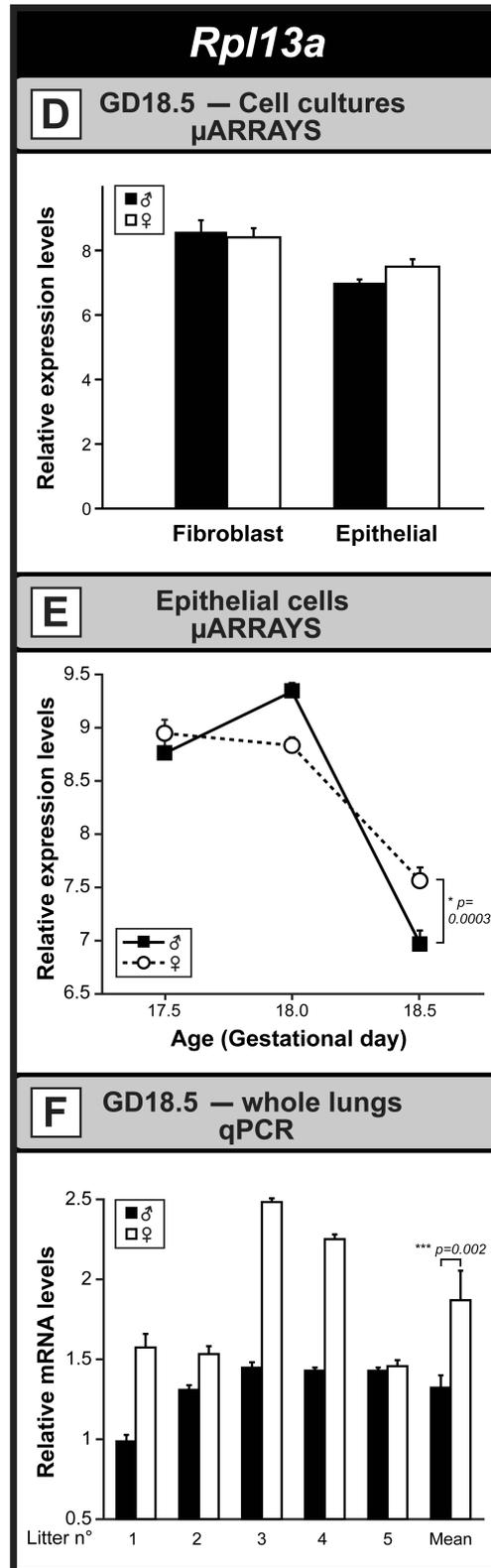
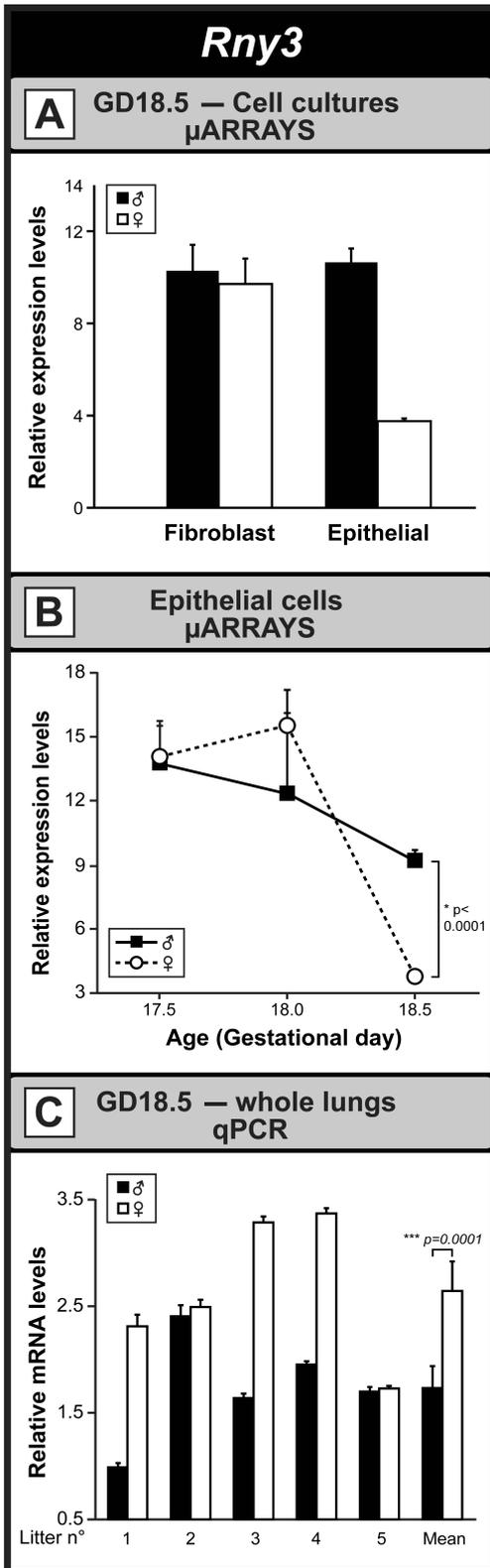


Figure 19 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes *Rny3* et *Rpl13a* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Niveaux d'expression relatifs des gènes *Rny3* (A) et *Rpl13a* (D) (biopuces) en fonction du sexe fœtal dans les cultures de cellules fibroblastiques et épithéliales au jour de gestation 18.5. Expression relative des gènes *Rny3* (B) et *Rpl13a* (E) (biopuces) selon le sexe fœtal dans les cultures cellulaires épithéliales en fonction du temps de gestation. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Rny3* (C) et *Rpl13a* (F) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers chez des mâles et chez des femelles en JG 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

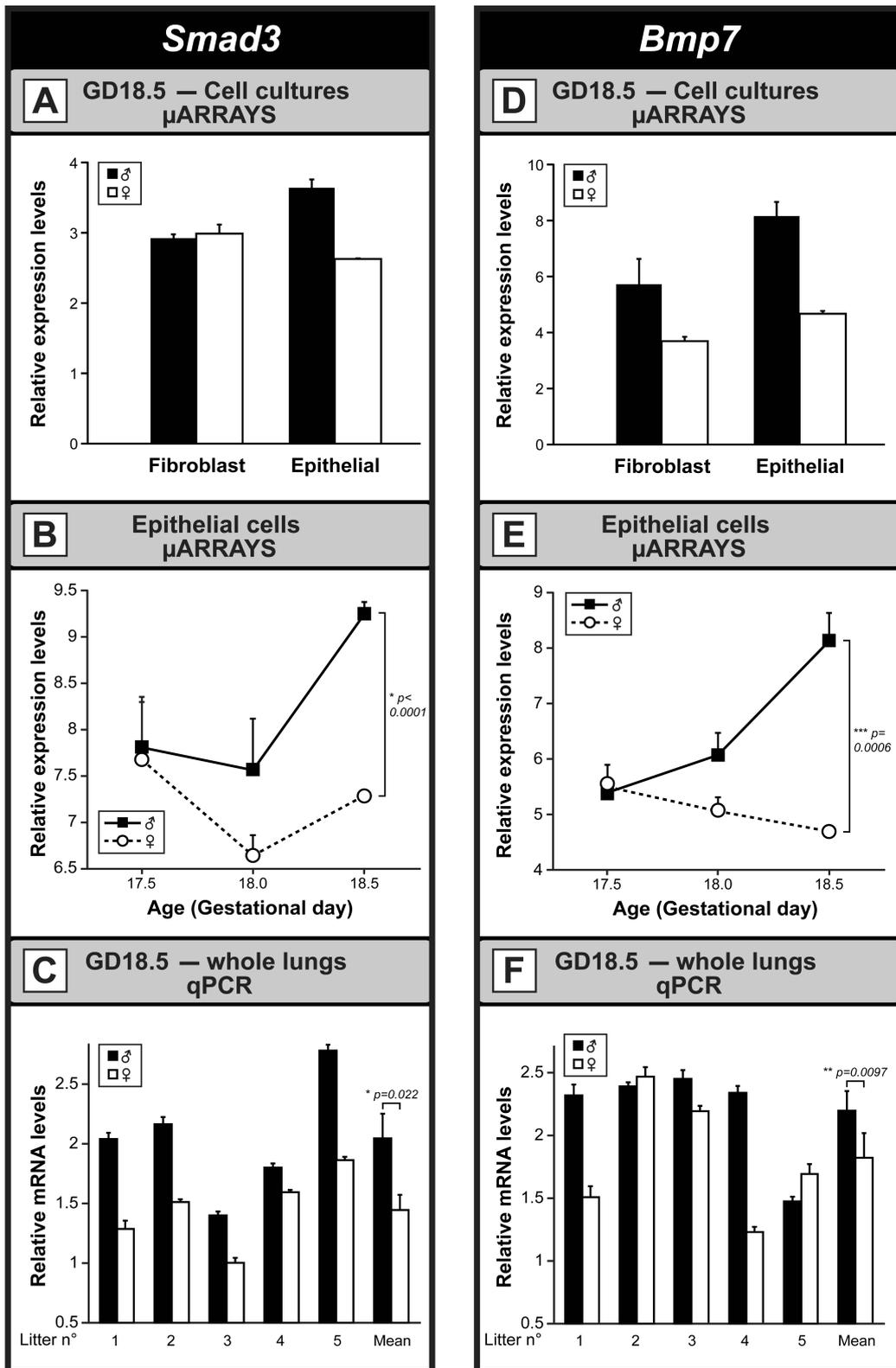


Figure 20 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes *Smad3* et *Bmp7* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Niveaux d'expression relatifs des gènes *Smad3* (A) et *Bmp7* (D) (biopuces) en fonction du sexe fœtal dans les cultures de cellules fibroblastiques et épithéliales au jour de gestation 18.5. Expression relative des gènes *Smad3* (B) et *Bmp7* (E) (biopuces) selon le sexe fœtal dans les cultures cellulaires épithéliales en fonction du temps de gestation. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Smad3* (C) et *Bmp7* (F) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers chez des mâles et chez des femelles en JG 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

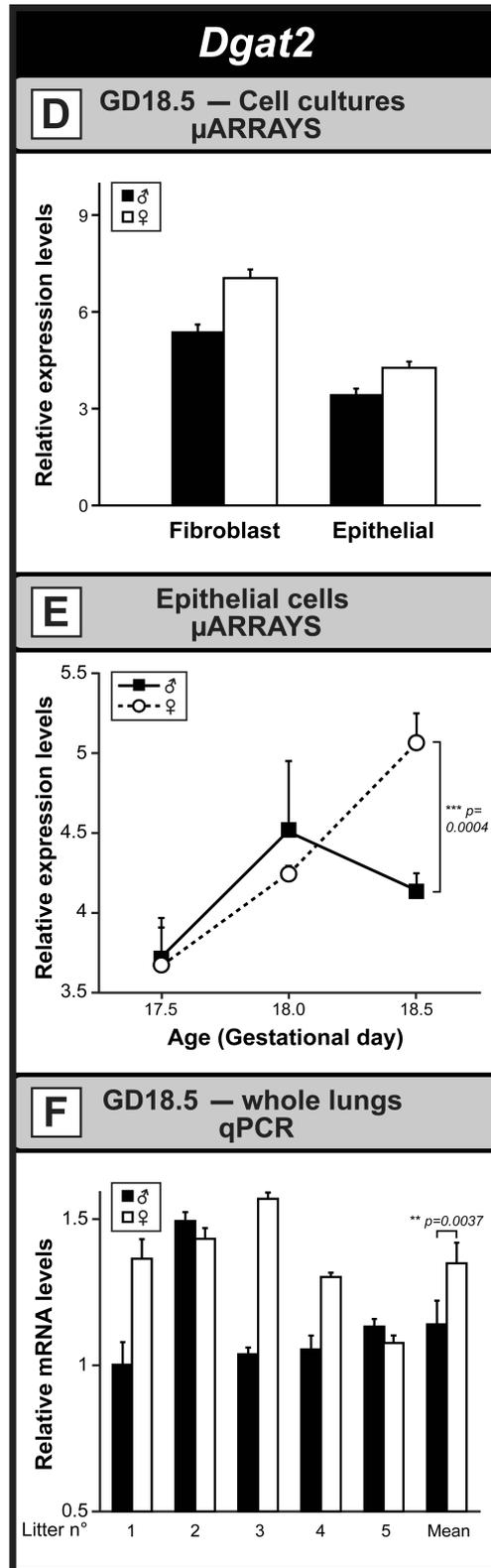
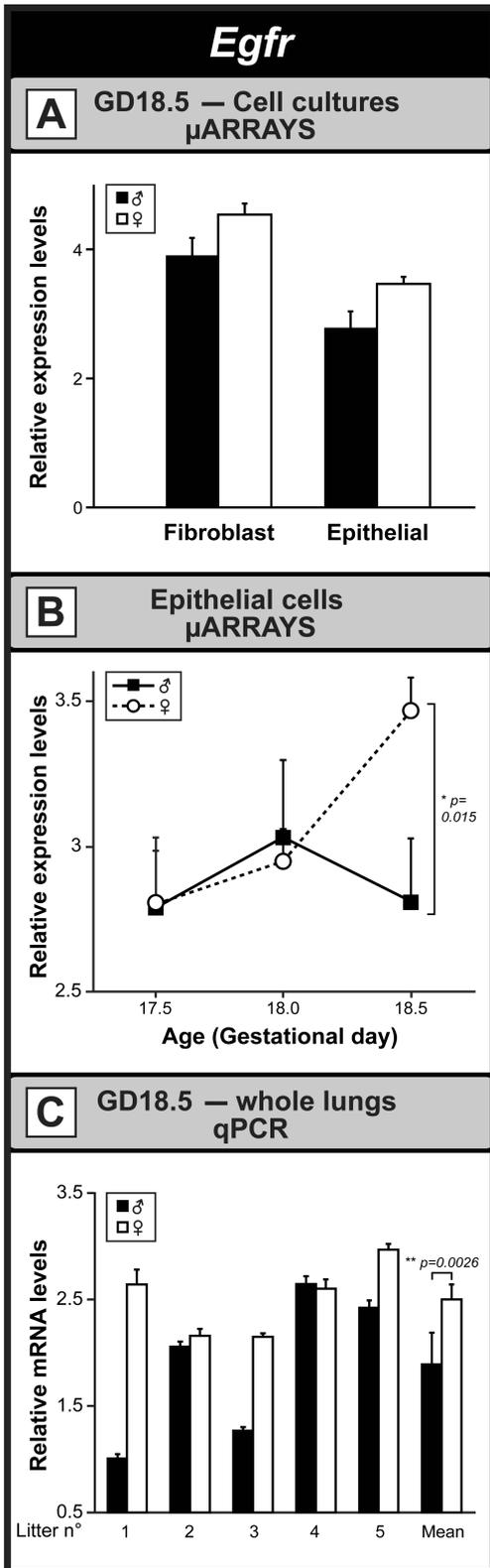


Figure 21 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes *Egfr* et *Dgat2* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Niveaux d'expression relatifs des gènes *Egfr* (A) et *Dgat2* (D) (biopuces) en fonction du sexe fœtal dans les cultures de cellules fibroblastiques et épithéliales au jour de gestation 18.5. Expression relative des gènes *Egfr* (B) et *Dgat2* (E) (biopuces) selon le sexe fœtal dans les cultures cellulaires épithéliales en fonction du temps de gestation. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Egfr* (C) et *Dgat2* (F) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers chez des mâles et chez des femelles en JG 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

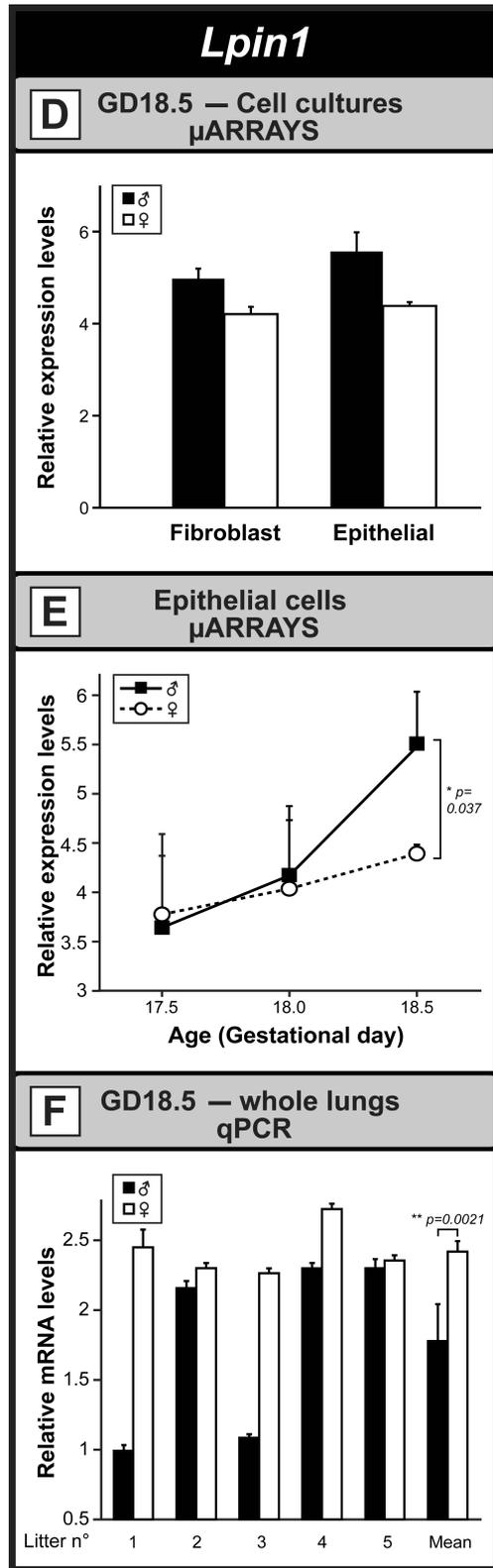
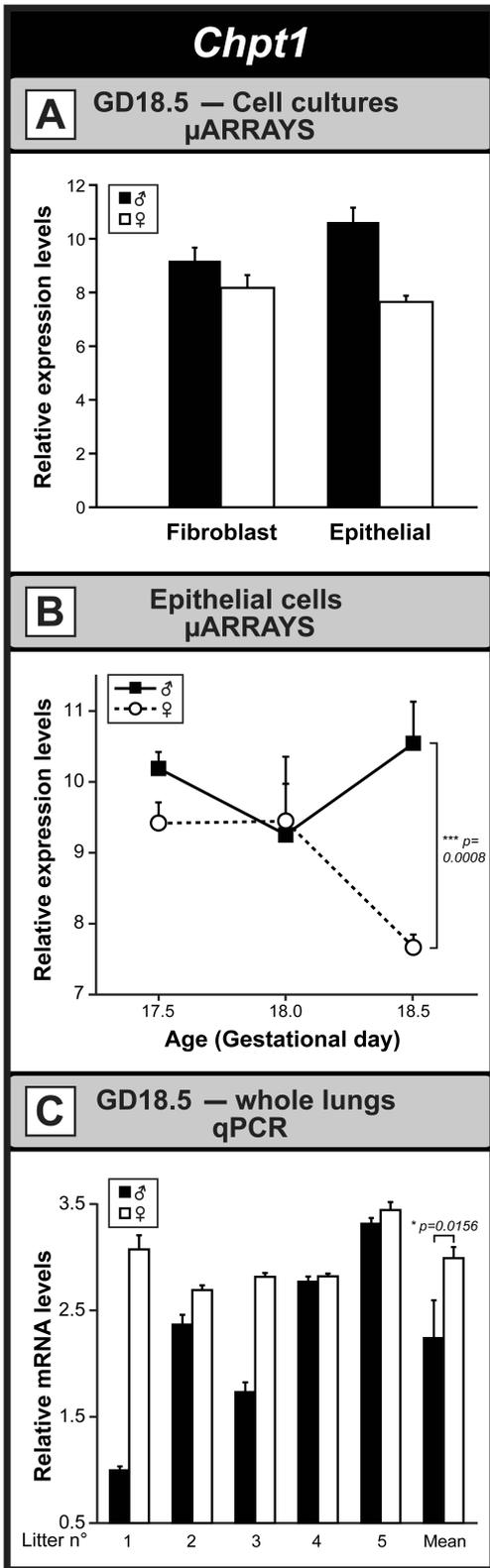


Figure 22 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes *Chpt1* et *Lpin1* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Niveaux d'expression relatifs des gènes *Chpt1* (A) et *Lpin1* (D) (biopuces) en fonction du sexe fœtal dans les cultures de cellules fibroblastiques et épithéliales au jour de gestation 18.5. Expression relative des gènes *Chpt1* (B) et *Lpin1* (E) (biopuces) selon le sexe fœtal dans les cultures cellulaires épithéliales en fonction du temps de gestation. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Chpt1* (C) et *Lpin1* (F) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers chez des mâles et chez des femelles en JG 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

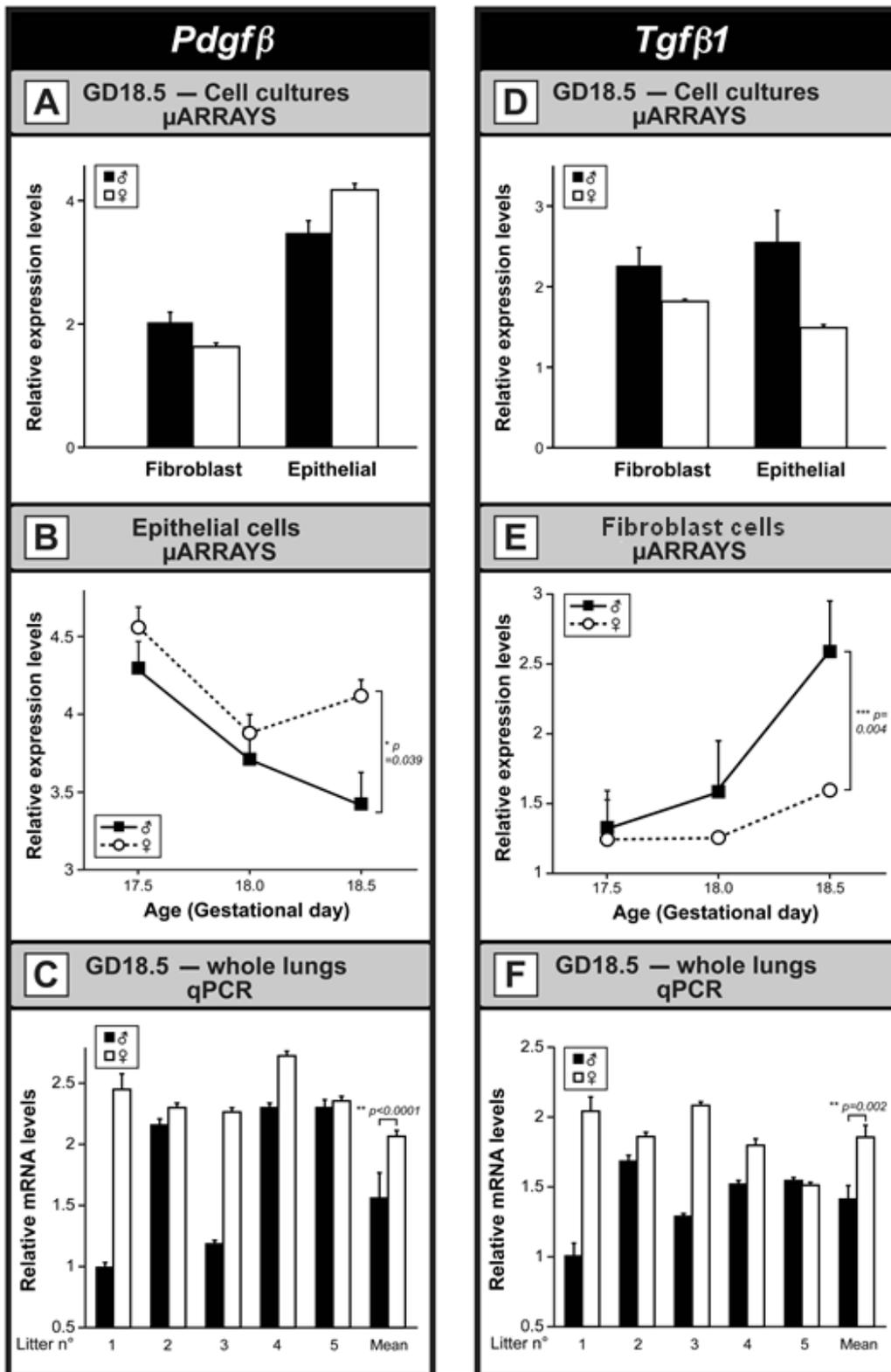


Figure 23 : Étude de l'effet du sexe sur l'expression des gènes *Pdgfb* et *Tgfβ1* dans des poumons entiers (qPCR) et dans des cultures primaires (biopuces). Niveaux d'expression relatifs des gènes *Pdgfb* (A) et *Tgfβ1* (D) (biopuces) en fonction du sexe fœtal dans les cultures de cellules fibroblastiques et épithéliales au jour de gestation 18.5. Expression relative des gènes *Pdgfb* (B) et *Tgfβ1* (E) (biopuces) selon le sexe fœtal dans les cultures cellulaires épithéliales et fibroblastiques, respectivement, en fonction du temps de gestation. Variation des niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *Pdgfb* (C) et *Tgfβ1* (F) mesurés par qPCR dans 5 pools de poumons entiers chez des mâles et chez des femelles en JG 18.5. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

III.2 Analyse bioinformatique des données de biopuces en fonction du temps

L'expression génique fœtale du poumon a été comparée chez des femelles entre les temps de gestation 17.5 et 18.5.

III.2.1 Variation de l'expression des gènes dans la fenêtre de gestation s'étendant du jour 17.5 au jour 18.5

L'analyse comparative des temps de gestation 17.5 *versus* 18.5 indique qu'il y a environ 3 fois plus de gènes qui présentent une différence d'expression dans le temps dans les cultures fibroblastiques par rapport aux cultures épithéliales. Parmi ces gènes, 16 sont communs aux deux types cellulaires. Le diagramme de Venn à la Figure 24 illustre ces différences. Au regard de ces données, on apprend que durant la période qui chevauche la montée de synthèse du surfactant, c'est dans le mésenchyme que l'on observe le plus grand nombre de gènes dont les niveaux d'expression variaient en fonction du temps dans la fenêtre étudiée.

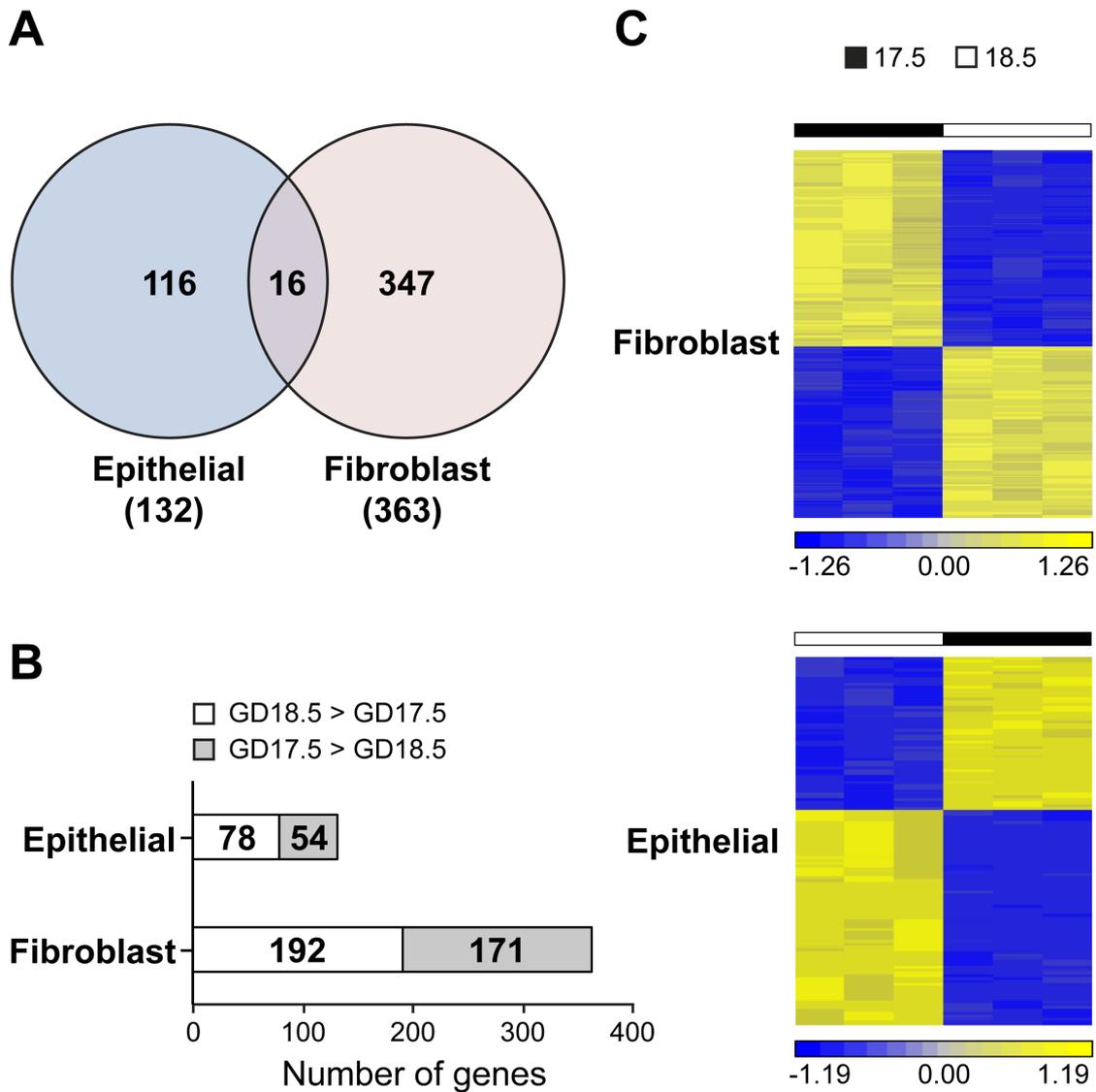


Figure 24 : Modulation de l'expression des gènes entre les temps de gestation 17.5 et 18.5 dans les cultures cellulaires de poumon fœtal de femelles. *A) Le diagramme de Venn montre la distribution des gènes qui présentaient des différences dans leurs niveaux d'expressions entre les temps de gestation 17.5 et 18.5. Le diagramme permet de visualiser les proportions de gènes modulés qui sont communs aux deux types cellulaires (épithéliale et fibroblaste) ou unique à un type de culture ($FC \geq 1.2$, FDR avec p -value < 0.05) B) Nombre de gènes qui sont surexprimés en JG 17.5 vs 18.5 et inversement. C) Aperçu graphique des niveaux d'expressions relatifs des gènes sur l'ensemble des réplicas selon le jour de gestation (17.5 et 18.5) et le type cellulaire (épithéliale et fibroblaste). GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.*

III.2.2 Études des gènes modulés en fonction du temps dans les cultures enrichies en cellules fibroblastiques issues de poumon fœtaux de femelles

III.2.2.1 Fonctions biologiques associées à la majorité des gènes en modulation temporelle chez les fibroblastes en culture

Les gènes présentant une expression différentielle en fonction du temps dans les fibroblastes ont été analysés en utilisant le logiciel Ingenuity Pathways Analysis (IPA) et le site web Gene Ontology (GO) afin de déterminer théoriquement à quels processus biologiques ils sont associés (Figure 25).

Dans les cultures primaires de fibroblastes, les gènes présentant des variations de leur expression entre les temps de gestation 17.5 et 18.5 appartenaient pour la plupart aux catégories « Prolifération et croissance cellulaire » (18%), « Apoptose » (17%) et « Développement/mouvement cellulaire » (24%). Durant cette période, la synthèse du surfactant est une étape clé dans la maturation du poumon fœtal. Sa régulation peut faire intervenir différentes catégories de gènes nécessaires au développement de l'organe. D'importants gènes impliqués dans ce processus pourraient être catalogués dans nos fonctions citées précédemment mais aussi dans les fonctions de « Communication cellulaire » (6%) ou « Métabolisme des lipides » (4%).

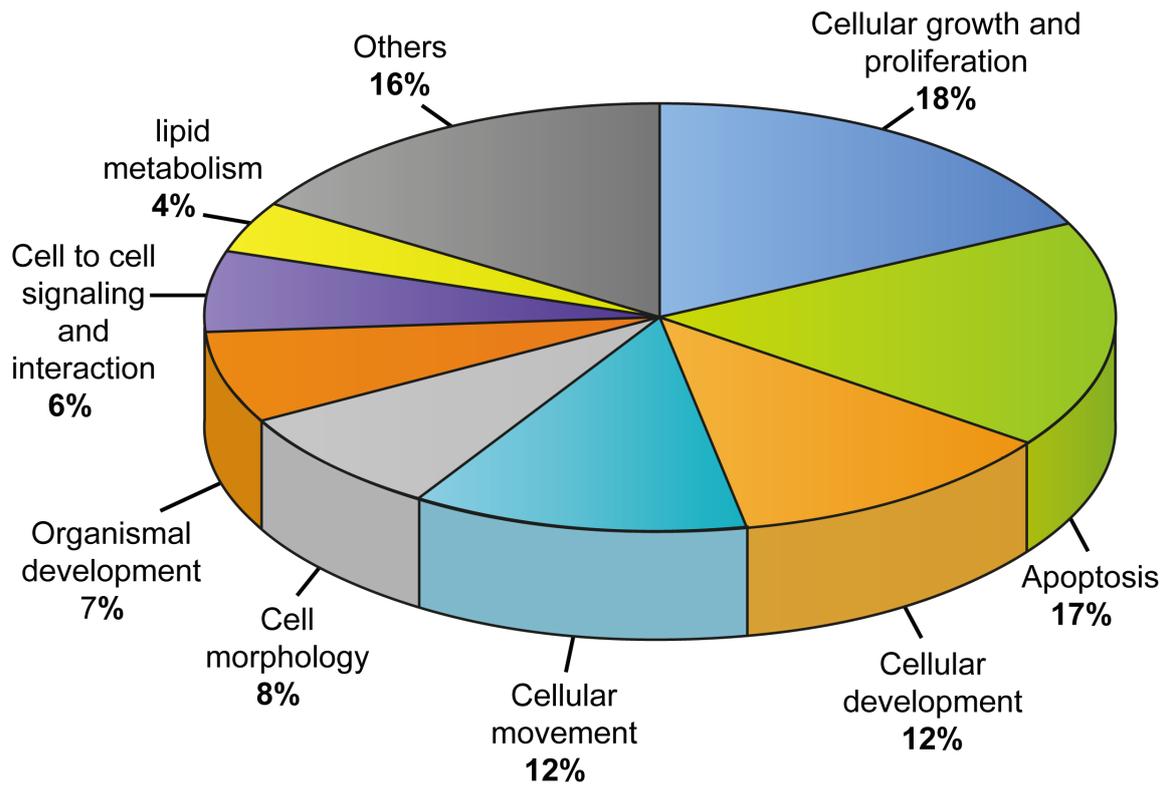


Figure 25 : Proportions des gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du temps dans les grandes fonctions biologiques selon le site GO. *Proportion des gènes impliqués dans les fonctions biologiques présentant des différences d'expressions entre les jours de gestation 17.5 et 18.5 dans les cultures enrichies en cellules fibroblastiques ($FC \geq 1.2$, FDR avec p -value < 0.05).*

III.2.2.2 Gènes fibroblastiques potentiellement importants pour le développement et la maturation du poumon fœtal

En accord avec les objectifs de l'étude, des processus biologiques importants dans le cadre du développement et de la maturation pulmonaire ont été ciblés (Figure 26). Comme attendu, certains gènes potentiels se sont retrouvés dans différents sous-ensembles.

Les gènes *Ikbkg* et *Zfp2* (aussi retrouvé sous le nom de *Fog2* dans la littérature) sont reconnus pour leur rôle dans le développement du poumon et présentaient une modulation de leur expression en fonction du temps de gestation dans le poumon en développement. Ces gènes sont aussi impliqués dans d'autres catégories qui peuvent être importantes dans le développement du poumon. Ainsi, on retrouve le gène *Ikbkg* dans la « Communication cellulaire » où l'on identifie également le gène *Stk40* qui est un gène reconnu dans ce processus biologique. *Stk40* est identifié comme un gène lié à la « Communication cellulaire » mais il joue également un rôle dans le « Métabolisme des lipides » avec une expression pulmonaire qui augmente en fonction du temps dans nos résultats de biopuces. *Ddit4*, connu pour son rôle dans le métabolisme des lipides pulmonaires, est un gène que l'on retrouve exprimé avec une différence en fonction du temps dans les catégories « Apoptose » mais aussi « Prolifération » où il côtoie le gène *Lemd2* reconnu pour son rôle régulateur dans la prolifération du tissu. Une analyse approfondie de nos listes avec Gene Ontology a été réalisée à partir des données de la littérature. Il a été ainsi possible de faire des recoupements entre les gènes modulés dans le temps dans notre étude et des processus biologiques spécifiques au développement pulmonaire (Table 9).

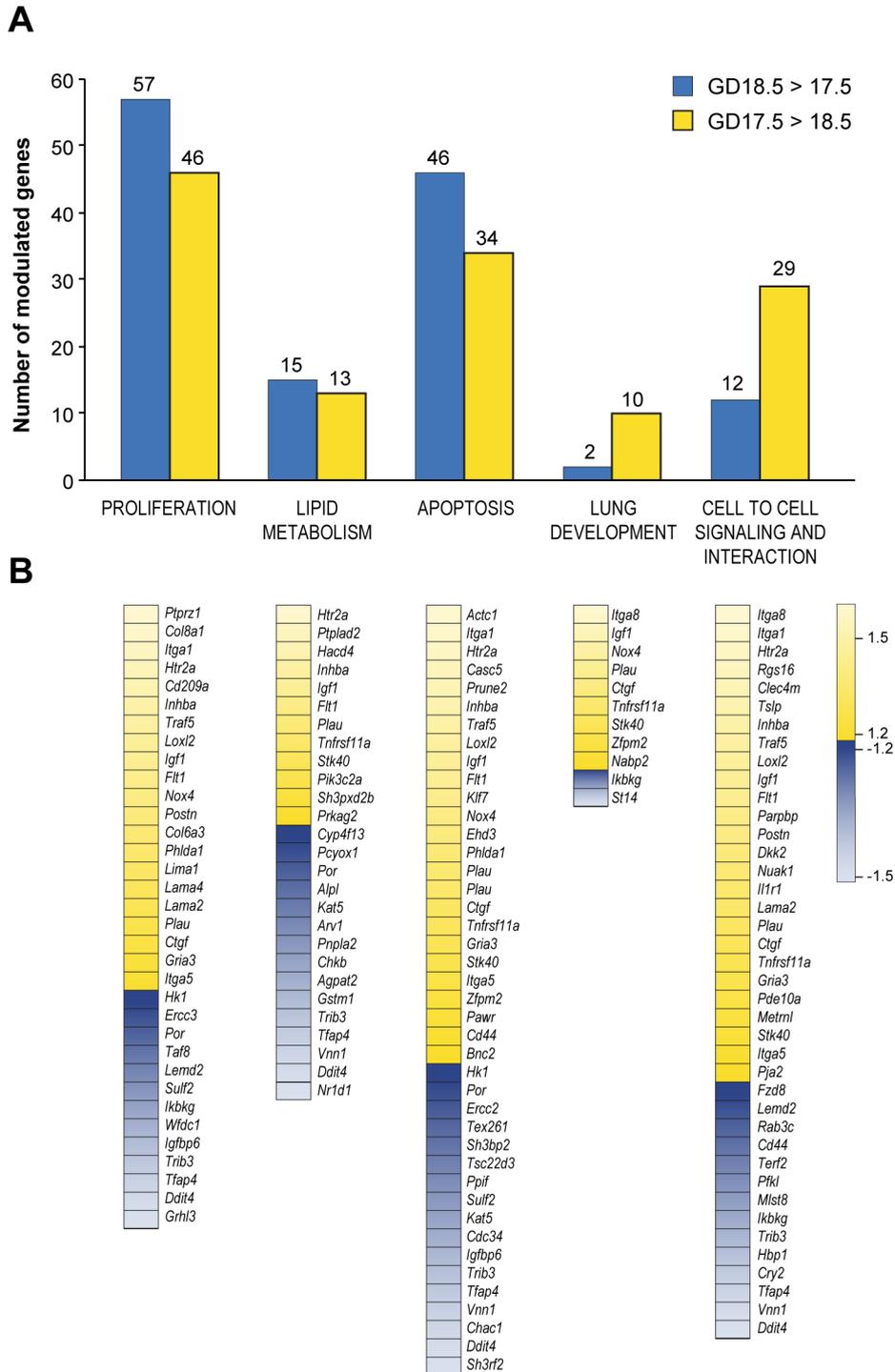


Figure 26 : Répartition des gènes fibroblastiques pulmonaires modulés en fonction du temps dans une sélection de fonctions biologiques. A) Histogramme montrant, pour chaque fonction biologique sélectionnée, le nombre de gènes dont l'expression est diminuée (bleu) ou augmentée (jaune) au jour de gestation 17.5 comparativement au jour de gestation 18.5. B) Gènes potentiels dans les différents sous-ensembles. Le gradient de couleur présenté dans les cadres représente le FC du gène dans l'analyse en fonction du temps des biopuces. Plus la couleur du gradient est claire, plus le FC est grand. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

Table 9 : Processus/fonctions biologiques dans lesquels les gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du temps sont impliqués. L'analyse des gènes modulés en fonction du temps a été réalisée sur le site web de Gene Ontology. Les sous-ensembles présentant un lien avec la maturation du poumon sont listés avec leurs gènes associés et leurs numéros Gene Ontology (GO). Les gènes surlignés en bleu seront abordés dans la discussion au chapitre IV.

PROCESS	GENE SYMBOL	GO ID
LUNG DEVELOPMENT		
Organ development	<i>Igf1, Ctaf, Stk40, Zfp2, Foxa2</i>	30324, 60425
Lung lobe morphogenesis	<i>Igf1</i>	60463
Lung alveolus development	<i>Igf1, Stk40</i>	48286
Lung epithelium development	<i>Fgfr3</i>	60428
LUNG CELL DIFFERENTIATION		
Differentiation of lung	<i>Igf1, Sox9, Foxa2</i>	60479
Lung epithelial cell differentiation	<i>Igf1, Sox9, Foxa2</i>	60487
Type I pneumocyte differentiation	<i>Igf1</i>	
Type II pneumocyte differentiation	<i>Igf1</i>	
CELL PROLIFERATION		
Proliferation	<i>Col8a1, Loxl2, Igf1, Ctgf, Foxc1, Gm13283, Shb, Taf8, Ercc2, Sox9, Ddit4</i>	8283
REGULATION OF CELL PROLIFERATION		
Proliferation of fibroblast	<i>Ptprz1, Itga1, Htr2a, Cd209a, Inhba, Traf5, Igf1, Nox4, Plau, Ctgf, Pawr, Serpine1, Pparg, Por, Cdon, Prkci, Optn, Fgfr3, Sox9, Wfdc1, Mcc, Tfp4, Ppargc1a, Nr1d1</i>	42127
Positive regulation of fibroblast proliferation	<i>Igf1, Serpine1</i>	48145, 48146
Positive regulation of mesenchymal proliferation	<i>Sox9</i>	2053
REGULATION OF CELL MIGRATION		
Positive regulation of fibroblast migration	<i>Slc8a1, Dmtn</i>	10763, 10762
REGULATION OF CELL COMMUNICATION		
Negative regulation	<i>Spry4, Itga1, Htr2a, Rgs16, Igf1, Dkk2, Pawr, Cd44, Pparg, Lcmd2, Ppif, Abhd6, Pgap2, Sul2, Fgfr3, Cdc34, Grb14, Sox9, Mcc, Ddit4l, Vnn1, Chac1, Ddit4, Nr1d1</i>	10648
Negative regulation of signal transduction	<i>Ankrd1, Spry4, Itga8, Htr2a, Rgs16, Inhba, Traf5, Igf1, Flt1, Nox4, Postn, Dkk2, Lama2, Plau, Ctgf, Tnfrsf11a, Pde10a, Stk40, Pja2, Pawr, Cd44, Serpine1, Sh3rf1, Fzd8, Pparg, Por, Shb, Cdon, Lcmd2, Cpt1a, Ppif, Abhd6, Pgap2, Sul2, Fgfr3, Cdc34, Grb14, Arfgef2, Ikbkg, Sox9, Dmtn, Mlst8, Pfk1, Trib3, Mcc, Ddit4l, Vnn1, Tfp4, Chac1, Foxa2, Ppargc1a, Ddit4, Nr1d1</i>	10646
Positive regulation of cell communication	<i>Ankrd1, Itga8, Itga1, Htr2a, Inhba, Traf5, Igf1, Flt1, Nox4, Dkk2, Lama2, Ctgf, Tnfrsf11a, Cd44, Fzd8, Por, Shb, Cdon, Sul2, Fgfr3, Grb14, Sox9, Dmtn, Mlst8, Foxa2</i>	10647

CELL MORPHOGENESIS INVOLVED IN DIFFERENTIATION

Epithelial to mesenchymal transition	<i>Loxl2, Loxl3, Fam101b, Sox9</i>	1837
Negative regulation of epithelial to mesenchymal transition	<i>Foxa2</i>	10719

LIPID

Synthesis of lipid	<i>Ch25h, Ptplad2, Pik3c2a, Pip4k2a, Prkag2, Cyp4f13, Nr1h2, Pparg, Por, Cpt1a, Abhd4, Pgap2, Serinc2, Arvl, Pnpla2, Chkb, Agpat2, Cdipt</i>	6629
Phospholipid binding	<i>Pik3c2a, Sh3pxd2b, Prkci, Wdr45, Vnn1</i>	5543
Glycolipid binding	<i>Vnn1</i>	51861
Lipid binding	<i>Igf1, Pik3c2a, Sh3pxd2b, Pparg, Prkci, Cdipt, Gstm1, Wdr45, Vnn1</i>	8289
Lipid biosynthetic process	<i>Ch25h, Ptplad2, Pik3c2a, Prkag2, Pgap2, Chkb, Agpat2, Cdipt</i>	8610
Negative regulation of lipid biosynthetic process	<i>Trib3</i>	51055, 45833
Positive regulation of phospholipid biosynthesis	<i>Htr2a</i>	71073
Regulation of shingolipid biosynthesis	<i>Htr2a, Igf1, Prkg1, Nr1h2, Por, Trib3, Nr1d1</i>	48890
Shingolipid metabolic process	<i>Arvl</i>	6665

REGULATION OF LIPID METABOLIC PROCESS

Positive regulation of lipid metabolic process	<i>Htr2a, Igf1, Flt1, Nr1h2, Pparg, Por, Cpt1a, Pnpla2, Fgfr3, Ppargc1a, Nrad1</i>	45834
Positive regulation of lipid biosynthesis	<i>Htr2a, Igf1, Nr1h2, Por, Nr1d1</i>	46889
Lipid catabolic process	<i>Abhd4, Pnpla2</i>	44242
Positive regulation of lipid catabolic process	<i>Cpt1a, Pnpla2</i>	50994, 50996
Positive regulation of lipid kinase activity	<i>Flt1, Fgfr3</i>	90218, 43550

SIGNAL TRANSDUCTION

Fibroblast growth factor receptor signaling pathway	<i>Ctgf, Fgfr3</i>	8543
Cellular response to fibroblast growth factor stimulus	<i>Ctgf, Cd44, Fgfr3</i>	44344, 71774
Negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling	<i>Sulf2</i>	40037, 40036
Inositol lipid mediated signaling	<i>Htr2a, Igf1, Pik3c2a</i>	48017

REGULATION OF TRANSPORT

Regulation of lipid transport	<i>Tnfrsf11a, Nr1h2</i>	32368
Negative regulation of lipid transport	<i>Nr1h2</i>	32369
Phospholipid transport	<i>Atp9a</i>	15914

GROWTH FACTOR BINDING

Fibroblast growth factor binding	<i>Fgfr3</i>	17134
Fibroblast growth factor activated receptor activity	<i>Fgfr3</i>	50071D

REGULATION OF ANDROGEN RECEPTOR SIGNALING PATHWAY

Negative regulation of androgen receptor signaling pathway	<i>Igf1</i>	60765, 60766
--	-------------	--------------

CIRCULATORY SYSTEM PROCESS

Respiratory system process	<i>Stk40</i>	3016
Respiratory gaseous exchange	<i>Stk40</i>	7585

III.2.2.3 Implication des gènes fibroblastiques pulmonaires dans les voies de signalisation impliquées dans la régulation du surfactant

Le surfactant pulmonaire est indispensable à une fonction respiratoire normale à la naissance. La différenciation cellulaire nécessaire à l'augmentation progressive des pneumocytes de type II responsables de la synthèse du surfactant est possible grâce à l'action combinée de différentes voies de signalisation ainsi qu'une communication de type paracrine entre le mésenchyme et l'épithélium. Nous avons sélectionné des voies de signalisation pour lesquelles les gènes associés présentaient des différences d'expression selon le temps de gestation (Table 10). Dans la voie de signalisation d'IGF1, les gènes *Igfbp2*, *Igfbp5* et *Igfr2* ne présentaient pas de différence d'expression en fonction du temps de gestation entre JG17.5 et JG 18.5. Toutefois d'autres gènes associés à cette voie sont modulés en fonction du temps comme *Igf1*, *Igfbp6* et *Ctgf*. Pour la voie de signalisation de PTEN, le gène du même nom ne présentait aucune différence d'expression dans la fenêtre de temps étudiée. Cependant, les gènes *Fgfr3* et *Ikkkg* qui sont impliqués dans la voie de signalisation de PTEN présentaient des modulations de leur expression selon le temps de gestation dans le poumon en développement.

Table 10 : Gènes fibroblastiques pulmonaires modulés en fonction du temps et leurs voies de signalisation impliquées dans la régulation du surfactant. (JG 17.5 et 18.5)

Process	Gene symbol	Gene name	Expression pattern
SURFACTANT REGULATION			
Igfl signaling	<i>Igfbp6</i>	Insulin like growth factor binding protein 6	18.5>17.5
Igfl signalling	<i>Ctgf</i>	Connective tissue growth factor	17.5>18.5
Igfl signaling	<i>Igfl</i>	Insulin like growth factor 1	17.5>18.5
Igfl signaling	<i>Pik3c2a</i>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha	17.5>18.5
Igfl signaling	<i>Prkag2</i>	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	17.5>18.5
Pten signaling	<i>Fgfr3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3	18.5>17.5
Pten signaling	<i>Flt1</i>	Fms related tyrosine kinase 1	17.5>18.5
Pten signaling	<i>Ikbkg</i>	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	18.5>17.5
Pten signaling	<i>Itga5</i>	Integrin subunit alpha 5	17.5>18.5
Pten signaling	<i>Tnfrsf11a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a	17.5>18.5

III.2.3 Études des gènes modulés en fonction du temps dans les cultures enrichies en cellules épithéliales issues de poumons fœtaux de femelles

III.2.3.1 Différences temporelles d'expression des gènes et répartition de ces gènes dans les grandes fonctions biologiques chez les cellules épithéliales pulmonaires

Comme pour les fibroblastes, une analyse des gènes modulés en fonction du temps dans les cultures enrichies en cellules épithéliales a permis d'établir la répartition des gènes selon leurs fonctions biologiques (Ingenuity et Gene Ontology).

Une dizaine de processus biologiques regroupent les gènes exprimés avec une différence en fonction du temps (Figure 27). 31% de ces gènes étaient impliqués dans le processus « Expression génique ». Plusieurs étapes du processus d'expression du gène peuvent être modulées comme la transcription, l'épissage de l'ARN, la traduction et la modification post-traductionnelle des protéines. Certains gènes peuvent également jouer des rôles importants dans les mécanismes de régulation qui vont activer ou inhiber l'expression de d'autres gènes.

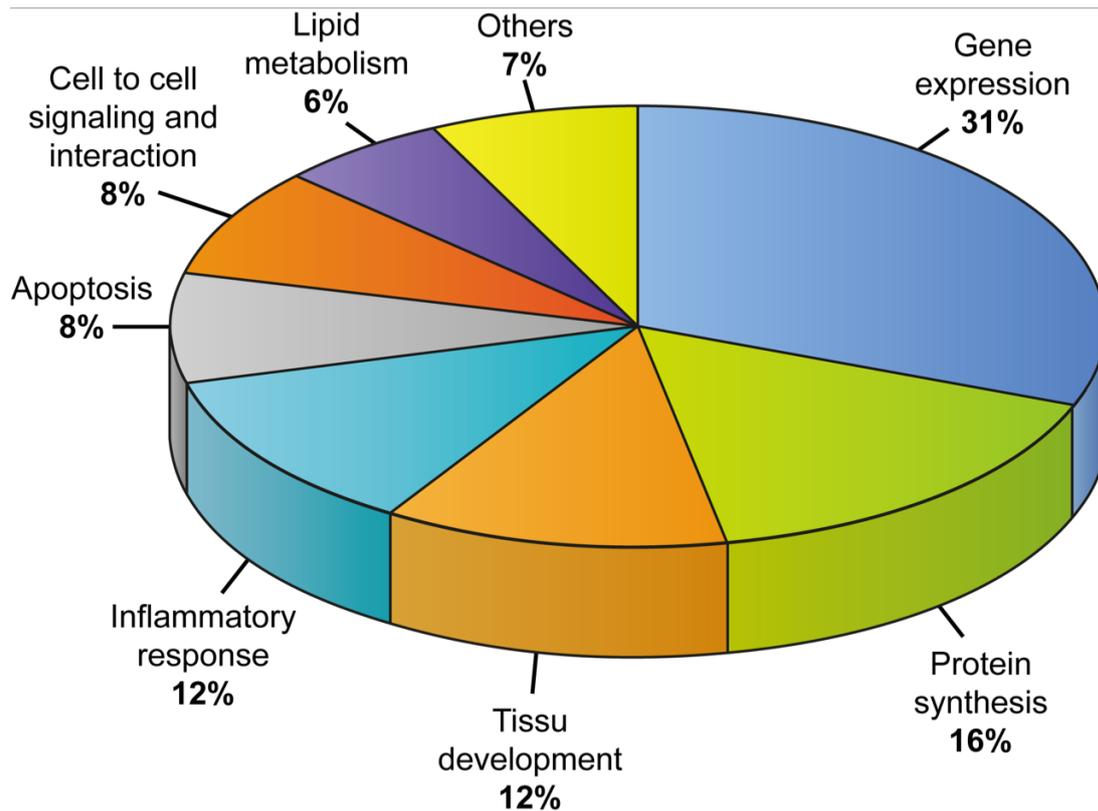


Figure 27 : Catégorisation des gènes modulés en fonction du temps dans des cultures épithéliales issues de poumons murins femelles selon le site GO. Les gènes des cultures enrichies en cellules épithéliales qui présentaient une modulation de leur expression entre les temps de gestation 17.5 et 18.5 étaient répartis dans différentes fonctions biologiques ($FC \geq 1.2$, FDR avec $p\text{-value} < 0.05$).

III.2.3.2 Gènes potentiellement importants dans l'épithélium pour le développement et la maturation du poumon fœtal

Les processus biologiques de la « Prolifération », de « l'Apoptose », de la « Communication cellulaire », du « Métabolisme des lipides » et du « Développement du poumon » ont été sélectionnés (Figure 28). L'analyse des données d'expression relative des biopuces a permis d'établir que les gènes de ces processus potentiellement importants pour le développement et la maturation des poumons avaient tous une expression dans les cellules épithéliales supérieure ou égale à l'expression relative mesurée dans les cellules fibroblastiques. Pour la voie de signalisation de *TGFβ* reconnue pour son rôle de stimulateur de l'apoptose, les 3 isoformes du gène *Tgfb* et le gène *Fas* ne présentaient pas de différences significatives (FDR) entre les jours de gestation 17.5 et 18.5 tandis que *Tgfb2*, l'un des récepteurs, était modulé en fonction du temps dans les cultures pulmonaires de cellules épithéliales. Le gène *Sema3a* montrait une expression relative (biopuces) qui augmentait dans le temps. *Sema3a*, reconnu dans la littérature pour son rôle dans l'apoptose et la prolifération du poumon fœtal, a été aussi observé dans d'autres catégories sur la Figure 16. Le gène *Clu* dont le rôle dans la communication cellulaire est établi a été retrouvé lui aussi dans différentes catégories avec une expression qui diminuait entre les temps étudiés. Enfin *Ptgs1* est aussi reconnu pour son rôle dans le métabolisme des lipides et présentait une diminution de son expression relative au jour de gestation 18.5.

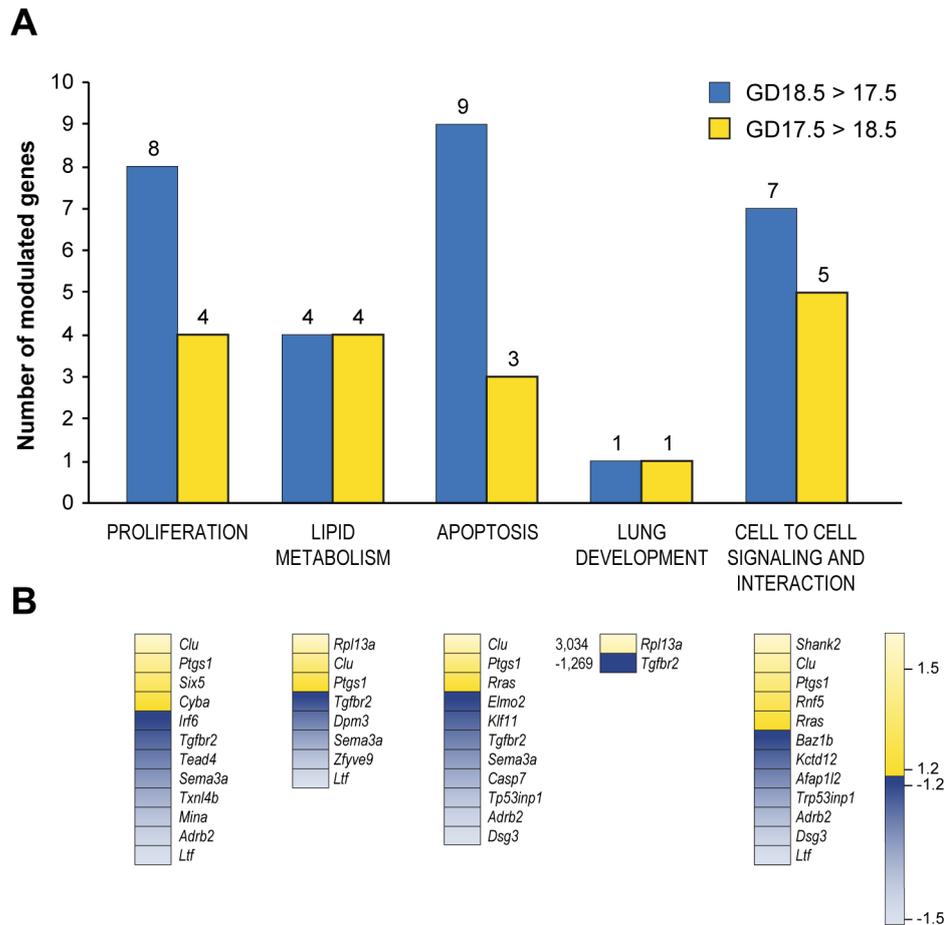


Figure 28 : Répartition des gènes des cultures épithéliales pulmonaires modulés en fonction du temps dans une sélection de fonctions biologiques. *A) Histogramme mettant en évidence, pour chaque fonction biologique sélectionnée, le nombre de gènes dont l'expression est diminuée (bleu) ou augmentée (jaune) au jour de gestation 17.5 comparativement au jour de gestation 18.5. B) Gènes potentiels correspondant aux catégories citées en A. Le gradient de couleur présenté dans les cadres représente le FC du gène dans l'analyse en fonction du temps des biopuces. Plus la couleur du gradient est claire plus le FC est grand. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.*

III.2.3.3 Implication de gènes épithéliaux des cultures pulmonaires dans les voies de signalisation impliquées dans le développement du poumon et la régulation du métabolisme des lipides

Le processus de développement du poumon implique plusieurs effecteurs qui exercent leurs actions par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation comme les voies BMP, *TGFβ* ou STAT3. Différents gènes pouvant appartenir à plusieurs de ces voies de signalisations sont modulés en fonction du temps dans les cultures enrichies en cellules épithéliales du poumon foetal (Table 11). *Tgfb1*, *Tgfb2* et *Tgfb3* associés à la voie de signalisation du même nom ne présentaient pas de différence significative en utilisant le test FDR dans la fenêtre de temps étudiée, mais les gènes *Tgfb2* et *Zfyve9* reconnus pour jouer des rôles importants dans cette voie de signalisation montraient une expression relative qui augmentait entre les jours de gestations 17.5 et 18.5. Comme pour *Tgfb*, aucun des gènes de la famille des *Bmp* ne présentait de différence significative (FDR) mais les gènes *Maged1* et *Rras* impliqués dans la voie de signalisation de BMP montraient une diminution de leur expression relative en JG 18.5 dans les cultures épithéliales des échantillons femelles. *Tgfb2* et *Rras* mentionnés précédemment étaient aussi impliqués dans la voie de signalisation JAK/STAT3 qui a un rôle dans le développement du poumon, mais *Stat3*, *Jnk* et *P38* impliqués dans cette voie, ne présentaient pas de modulation dans la fenêtre de temps étudiée. L'activation du récepteur GR par les glucocorticoïdes est essentielle au développement normal du poumon, mais le récepteur ne présentait pas de différence d'expression en fonction du temps. Cependant *Adrb2*, un des gènes associés à la voie de signalisation du GR, avait une expression qui augmentait en JG 18.5 versus 17.5. Finalement, le gène *Hist1h3c*, associé à la voie de signalisation du récepteur des estrogènes (ER) et reconnue comme impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides du poumon, montrait une modulation en fonction du temps que l'on ne retrouvait pas pour les deux gènes encodant les récepteurs des estrogènes: *Esr1* et *Esr2*.

Table 11 : Gènes de l'épithélium pulmonaire modulés en fonction du temps et leurs voies de signalisation impliquées dans le développement du poumon et le métabolisme des lipides. (JG 17.5 et 18.5)

Process	Gene symbol	Gene name	Expression pattern
LUNG DEVELOPMENT REGULATORS			
Bmp signaling	<i>Maged1</i>	MAGE family member D1	17.5>18.5
Bmp signaling Stat3 signaling Tgfβ signaling	<i>Rras</i>	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	17.5>18.5
Stat3 signaling Tgfβ signaling	<i>Tgfbr2</i>	Transforming growth factor beta receptor II	18.5>17.5
Tgfβ signaling	<i>Zfyve9</i>	Zinc finger, FYVE domain containing 9	18.5>17.5
LIPID METABOLISM			
Glucocorticoid receptor signaling	<i>Adrb2</i>	Adrenoceptor beta 2	18.5>17.5
Estrogen receptor	<i>Hist1h3c</i>	Histone cluster 1, H3c	17.5>18.5

III.3 Analyse bioinformatique des données de biopuces selon le sexe fœtal

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé si une différence sexuelle existait dans les 2 types de cultures enrichies pour chaque temps étudié. Une étude comparative des échantillons des femelles *versus* des mâles a été réalisée. Les expressions relatives des gènes du poumon fœtal ont été comparées pour chaque temps et selon le type cellulaire avec les logiciels IPA et Gene Ontology.

III.3.1 Variation de l'expression des gènes fibroblastiques pulmonaires selon le sexe pour une fenêtre de gestation s'étendant du jour 17.5 au jour 18.5

L'étude des cultures fibroblastiques indiquait que 36 gènes étaient modulés par le sexe dans le poumon fœtal en développement durant la période étudiée. Ces différences sont présentées en Figure 29A. En JG 17.5, il n'y avait pas de modulation dans l'expression des gènes en fonction du sexe qui était significative dans notre étude. Dans la Figure 29B, le nombre de gènes surexprimés chez le mâle et chez la femelle est présenté pour le temps JG 18.5. 80% des gènes présentant une différence sexuelle dans le mésenchyme étaient surexprimés chez le mâle alors que l'on sait qu'à cette période, ce dernier accuse un retard de maturation comparé à la femelle.

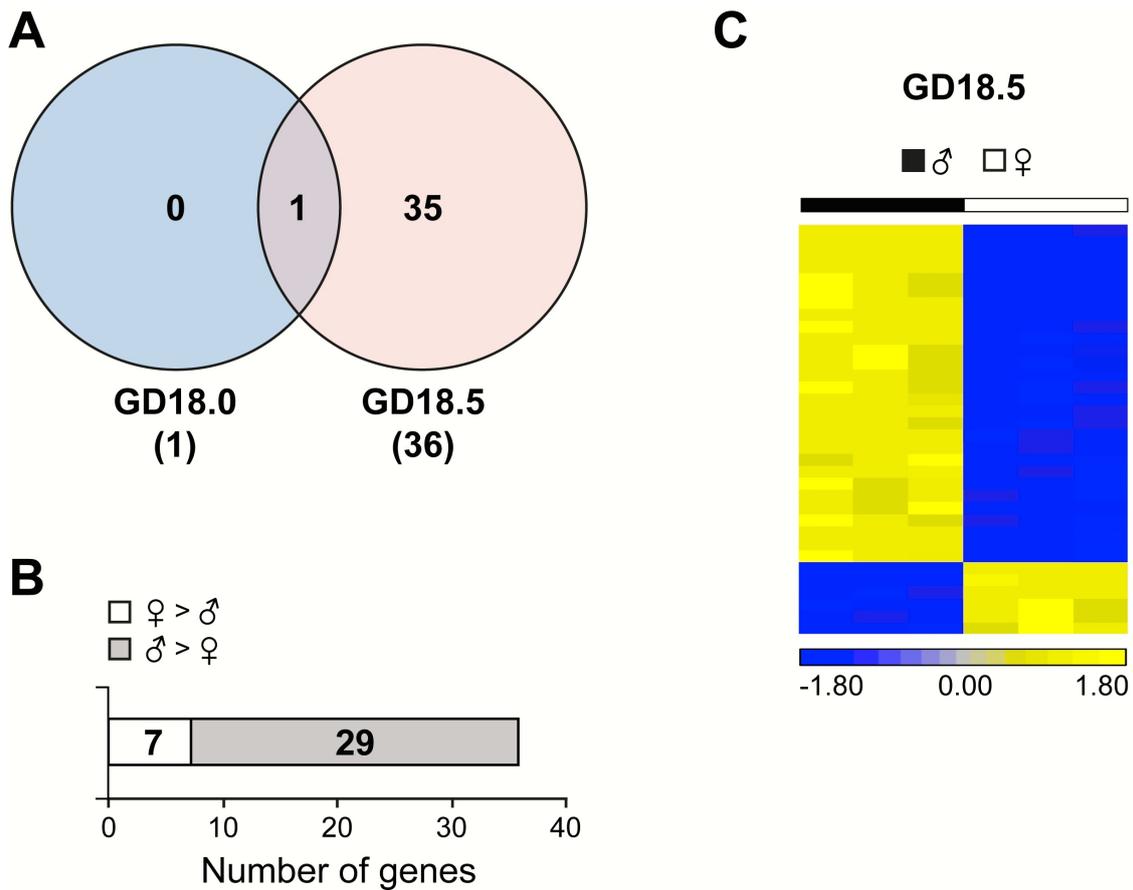


Figure 29 : Modulation de l'expression des gènes en fonction du sexe entre les temps de gestation 18.0 et 18.5 dans des cultures primaires de fibroblastes des poumons fœtaux. A) Le diagramme de Venn montre la distribution des gènes qui présentaient des différences dans leurs niveaux d'expressions entre le mâle et la femelle durant les temps de gestation 18.0 et 18.5. Le diagramme permet de visualiser les proportions de gènes modulés qui sont communs ou unique aux temps de gestation ($FC \geq 1.2$, FDR avec p -value < 0.05) B) Nombre de gènes surexprimés chez le mâle en gris et chez la femelle en blanc en JG 18.5. C) Aperçu graphique des niveaux relatifs d'expression des gènes sur l'ensemble des répliques selon le sexe en JG 18.5 dans les cultures de fibroblastes. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

III.3.2 Études des gènes modulés en fonction du sexe dans les cultures enrichies en cellules fibroblastiques issues de poumon fœtaux

III.3.2.1 Catégorisation des gènes modulés en fonction du sexe au jour de gestation 18.5 dans des cultures de fibroblastes issues de poumons murins

En JG 18.5, la majorité des gènes présentant des variations de leur niveau d'expression entre les mâles et les femelles appartenaient aux catégories de « l'Apoptose » (22%), des « Mouvements cellulaires » (21%), de la « Prolifération et croissance du tissu » (16%) et de la « Morphologie cellulaire » (14%). Dans cette fenêtre de gestation, les cellules du poumon se différencient sous l'influence d'une communication de type cellule-cellule où 8 gènes, soit 7% des gènes fibroblastiques présentant une différence sexuelle au jour de gestation 18.5, seraient modulés en fonction du sexe (Figure 30).

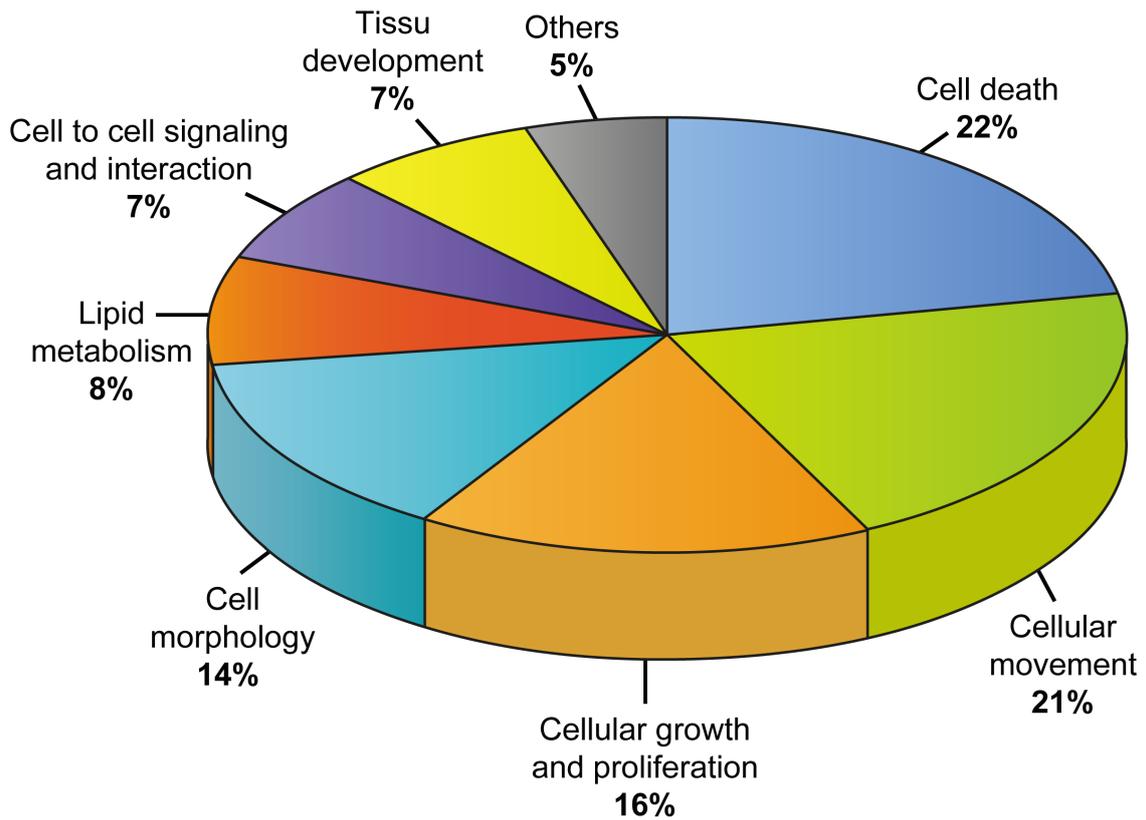


Figure 30 : Proportions des gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du sexe dans les grandes fonctions biologiques selon le site GO. *Proportion des gènes impliqués dans les fonctions biologiques présentant des différences d'expression entre les mâles et les femelles au jour de gestation 18.5 dans les cultures enrichies en cellules fibroblastiques (FC ≥ 1.2 , FDR avec p -value < 0.05).*

III.3.2.2 Gènes fibroblastiques modulés en fonction du sexe pouvant être impliqués dans le développement et le retard de la maturation du poumon fœtal observé chez le mâle au jour de gestation 18.5

Pour cette partie de l'étude, il a été ciblé 5 processus biologiques importants dans le cadre du développement et de la maturation pulmonaire où 21 gènes exprimés avec des différences sexuelles s'exprimaient dans le poumon fœtal au jour de gestation 18.5 (Figure 31). Comme observé précédemment, certains gènes se retrouvaient impliqués dans différentes catégories comme le gène *Lif* dont le rôle dans la ramification du poumon fœtal a été démontré, mais on retrouve ce gène dans les processus de « Prolifération » ou « d'Apoptose » où il pourrait jouer un rôle important dans le cadre du développement. *Lif* est surexprimé chez le mâle au jour de gestation 18.5.

Une autre analyse (données non présentées) ne prenant pas en compte le test du FDR mais conservant une p-value < 0.05 a été faite. Elle a montré que les gènes *Smad1*, *Smad7*, *Igf1* et *Igfbp6* appartenant à la famille BMP et IGF présentaient des différences sexuelles tandis qu'aucune de ces familles ne montrait de différence significative dans l'analyse avec FDR.

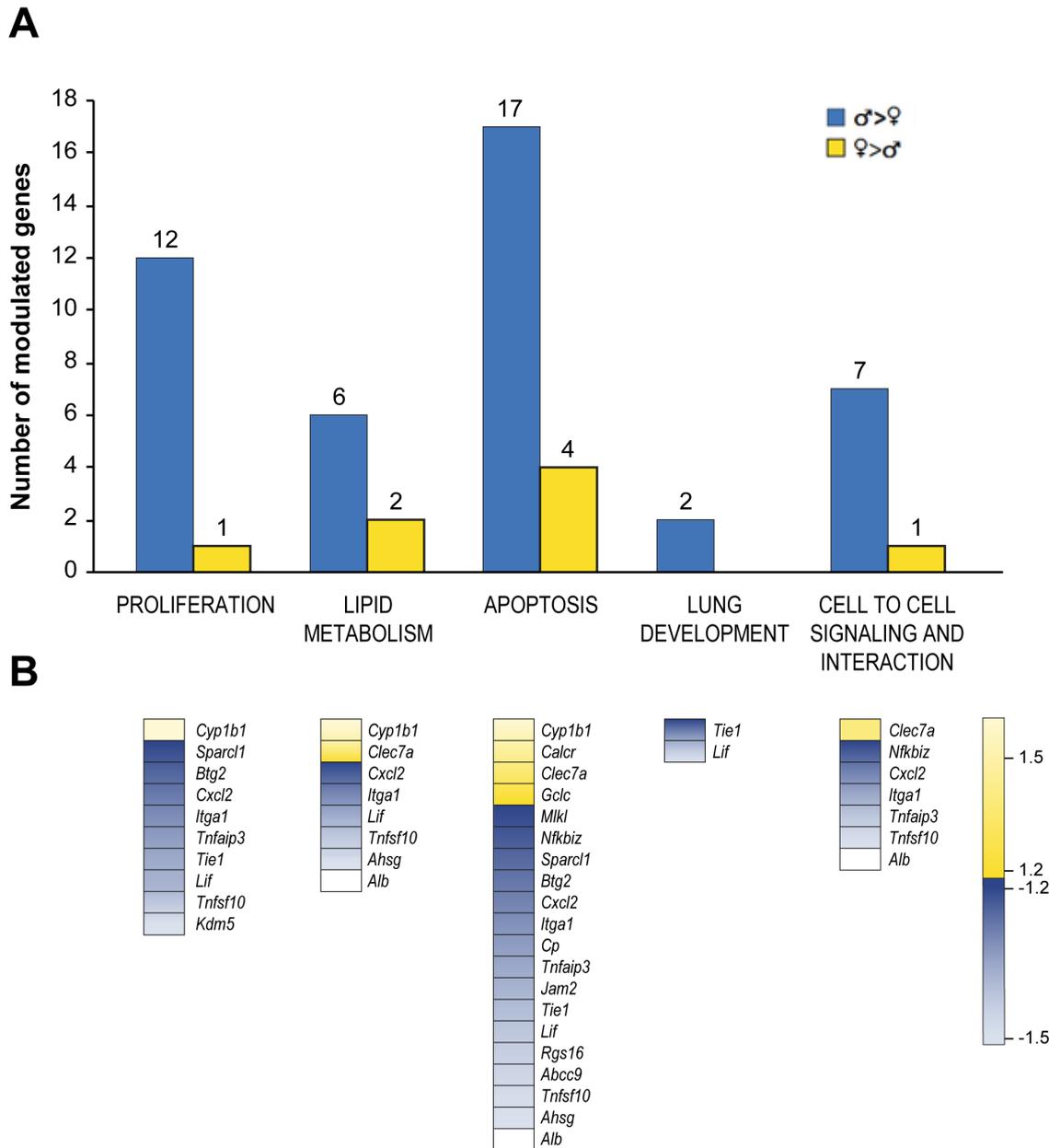


Figure 31 : Répartition des gènes fibroblastiques du poumon fœtal modulés en fonction du sexe dans une sélection de fonctions biologiques. A) Histogramme montrant, pour chaque fonction biologique sélectionnée, le nombre de gènes dont l'expression est augmentée (bleu) ou diminuée (jaune) chez le mâle comparativement à la femelle au jour de gestation 18.5. B) Gènes potentiels dans les différents sous-ensembles. Le gradient de couleur présenté dans les cadres représente le FC du gène dans l'analyse en fonction du sexe pour les études de biopuces. Plus la couleur du gradient est claire, plus le FC est grand. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

III.3.3 Différences sexuelles dans l'expression des gènes du poumon fœtal en développement dans la fraction épithéliale

Comparativement à l'étude précédente dans la fraction fibroblastique, l'analyse des profils d'expression des gènes des cultures enrichies en cellules épithéliales montrait des différences sexuelles pour deux des temps de gestation étudiés. 985 gènes étaient exprimés avec une différence sexuelle uniquement en JG 18.5 avec un test FDR ($FC \geq 1.2$, $p\text{-value} < 0.05$) (Figure 32A) et à peine plus de la moitié de ces gènes étaient surexprimés chez le mâle (figure 32B).

Cependant, une analyse parallèle ne prenant pas en compte le FDR a été menée pour ne pas exclure de potentiels candidats importants dans notre étude. Il existait alors des différences sexuelles pour tous les temps de gestation (Figure 32D). Tandis que la majorité de ces gènes était exprimée à un niveau supérieur chez la femelle comparé aux mâles en JG 17.5 (13 gènes versus 5 gènes) (données non présentées), on remarquait le phénomène inverse en JG 18.0 où sur les 409 gènes présentant des différences sexuelles, 251 gènes étaient surexprimés chez le mâle (158 chez la femelle). Finalement en JG 18.5, environ 47% des gènes avaient une différence sexuelle en faveur du mâle (1629 gènes versus 1815 gènes surexprimés chez la femelle).

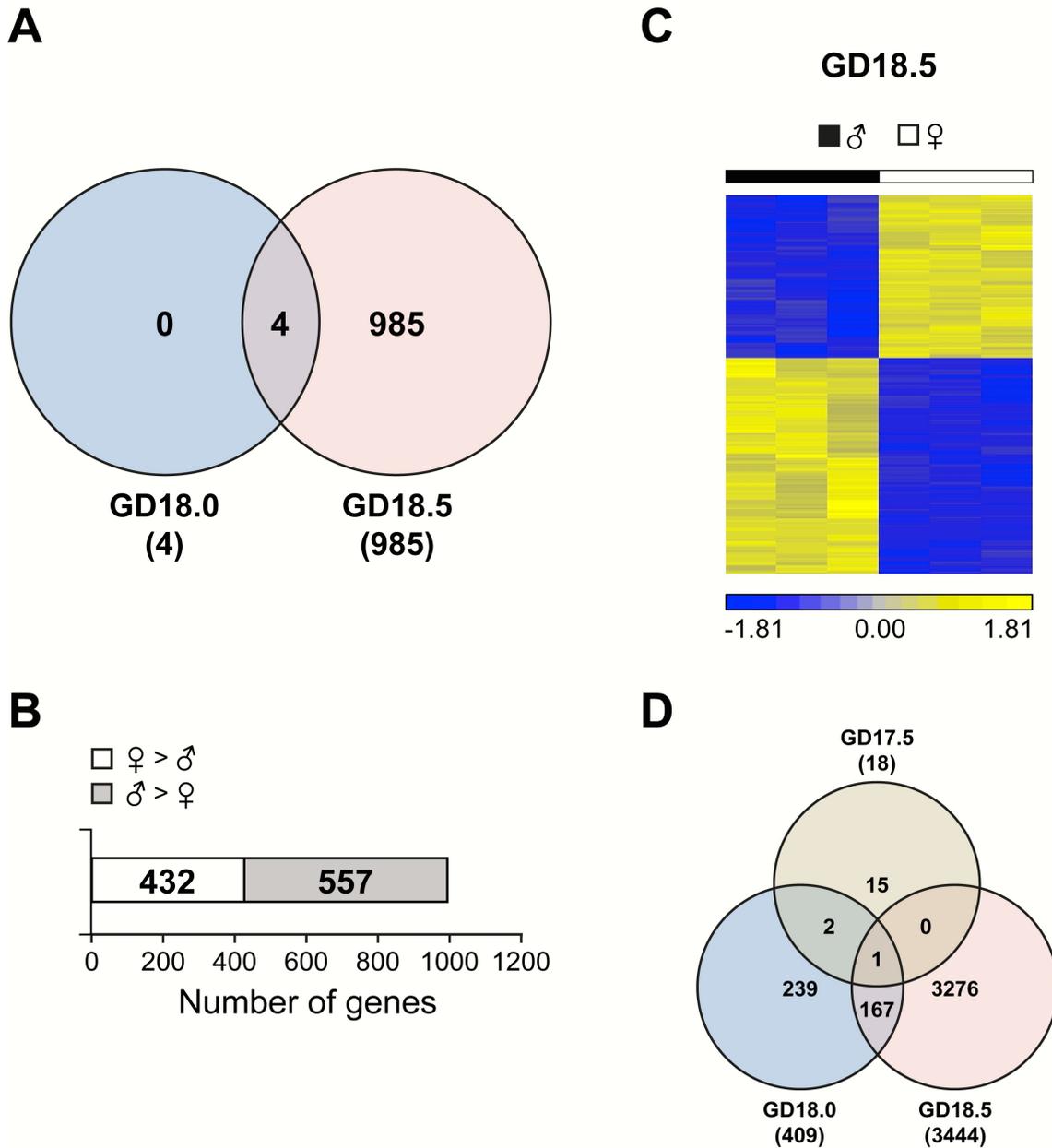


Figure 32 : Modulation de l'expression des gènes en fonction du sexe entre les temps de gestation 17.5, 18.0 et 18.5 dans des cultures primaires épithéliales du poumon fœtal. A) Le diagramme de Venn montre la distribution des gènes qui présentaient des différences dans leur niveau d'expression entre le mâle et la femelle durant les temps de gestation 18.0 et 18.5 ($FC \geq 1.2$, FDR avec p -value < 0.05). B) Nombre de gènes surexprimés chez le mâle en gris et chez la femelle en blanc en JG 18.5 ($FC \geq 1.2$, FDR avec p -value < 0.05). C) Aperçu graphique des niveaux d'expression relatifs des gènes sur l'ensemble des réplicas selon le sexe en JG 18.5 dans des cultures de cellules épithéliales de poumon. D) Le diagramme de Venn montre la distribution des gènes qui présentaient des différences dans leur niveau d'expression entre le mâle et la femelle selon une analyse sans le test FDR ($FC \geq 1.2$, p -value < 0.05). GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

III.3.3.1 Fonctions biologiques associées à la majorité des gènes modulés par le sexe dans les cellules épithéliales en culture

17% des gènes avec différences sexuelles au temps JG 18.5 appartenait à la catégorie « Prolifération et croissance cellulaire », 15% à la catégorie « Développement cellulaire » et 14% des gènes appartenait au groupe « Apoptose » (Figure 33). Avec 77 et 45 gènes modulés en fonction du sexe pour les catégories « Métabolisme des lipides » et « Communication cellulaire », respectivement, ces deux catégories ne représentaient qu'une faible proportion des gènes exprimés avec une différence sexuelle. La catégorie « Développement du poumon » établie par l'IPA ne comprenait que 40 gènes (2%) sur les 989 gènes modulés en fonction du sexe.

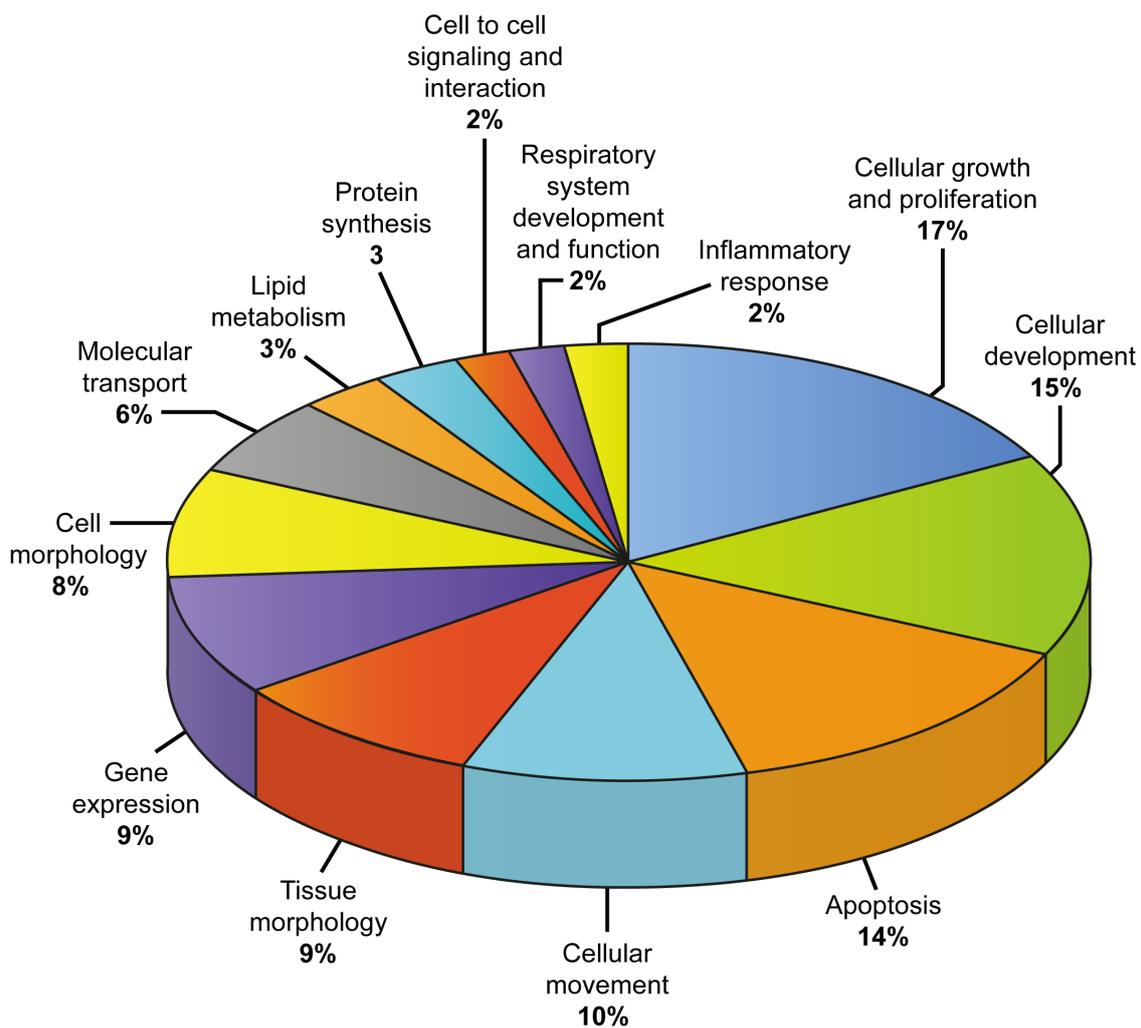


Figure 33 : Catégorisation des gènes modulés en fonction du sexe dans des cultures épithéliales issues de poumons murins selon le site GO. Proportion des gènes impliqués dans les fonctions biologiques présentant des différences d'expression entre les mâles et les femelles au jour de gestation 18.5 dans les cultures enrichies en cellules épithéliales ($FC \geq 1.2$, FDR avec p -value < 0.05).

III.3.3.2 Étude des gènes exprimés avec une différence sexuelle qui seraient potentiellement importants dans l'épithélium du poumon fœtal

Impliqués dans le processus de « Prolifération », certains gènes de la famille Fgf (*Fgf13*, *Fgf2* et *Fgfr1*), Bmp (*Bmp6* et *Bmp7*), Notch (*Notch1*, *Notch3* et *Notch4*) et les gènes *Pdgfc* et *Lif* sont exprimés avec une différence sexuelle au jour de gestation 18.5 (Figure 34). *Tbx4* et *Tbx5*, des facteurs de transcription activés en réponse à la voie de signalisation de FGF, présentaient aussi une expression modulée par le sexe. *Wnt5a* et *Igf3*, des gènes de la voie de signalisation respectivement de Wnt et d'Igf impliqués dans la « Communication cellulaire », montraient une expression supérieure chez le mâle versus la femelle à cette même période. *Wnt5a*, également retrouvé dans la catégorie « Développement du poumon », était associé à des gènes des voies de signalisation de TGF β /Smad tels que *Smad3*, *Tgf β 3* et *Tgf β i*, mais aussi à la voie de signalisation d'IGF avec le gène *Igf3*, tous ces gènes montrant une différence sexuelle en JG 18.5.

Une analyse détaillée a été réalisée sur le site Gene Ontology (Table 12) afin de fournir des informations sur l'implication des gènes modulés par le sexe dans les différents processus importants dans le cadre de nos études sur le développement et la maturation pulmonaire.

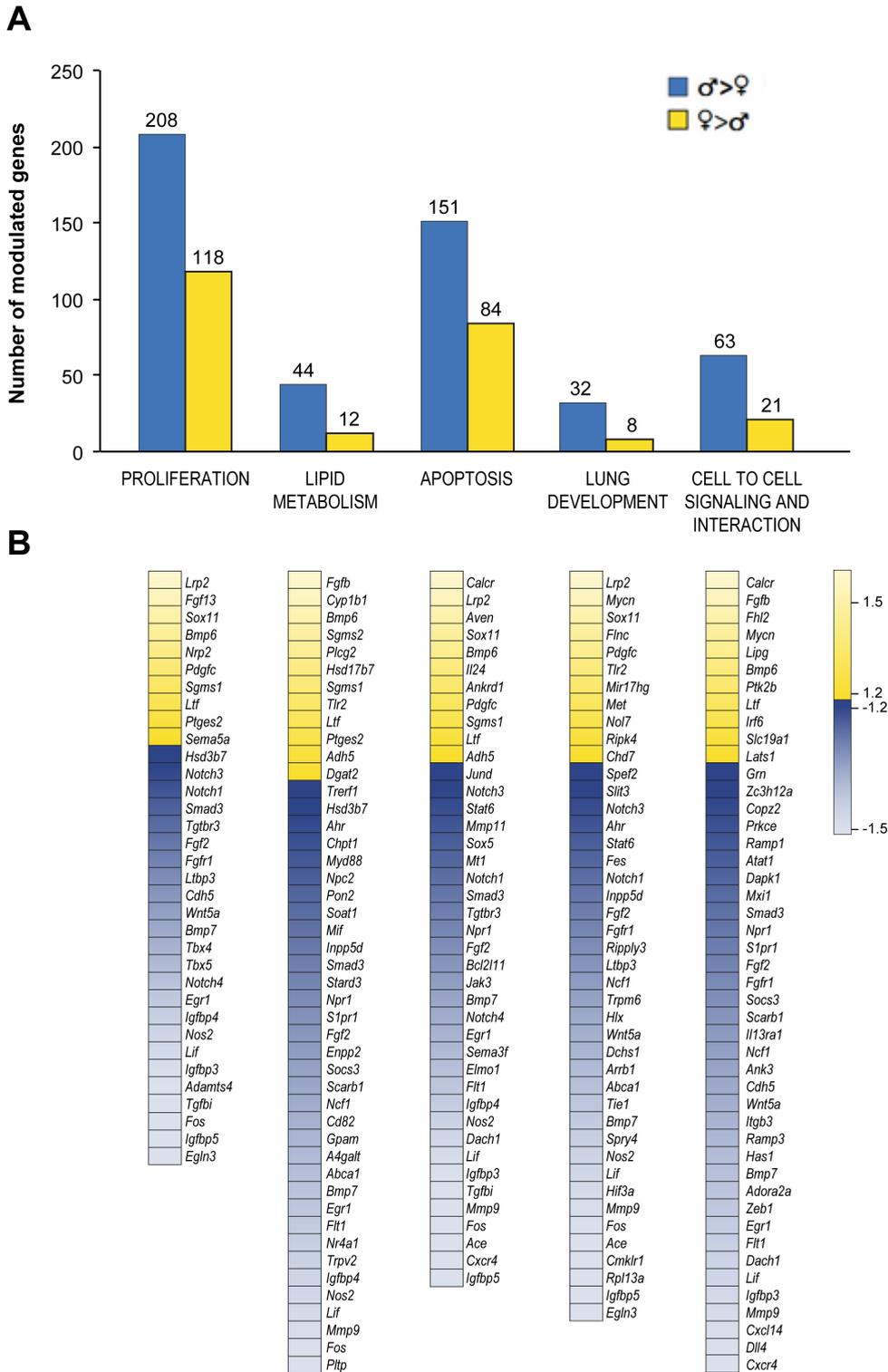


Figure 34 : Implication potentielle des gènes épithéliaux du poumon fœtal modulés en fonction du sexe dans une sélection de fonctions biologiques. A) Histogramme montrant, pour chaque fonction biologique sélectionnée, le nombre de gènes dont l'expression est augmentée (bleu) ou diminuée (jaune) chez le mâle comparativement à la femelle au jour de gestation 18.5. B) Gènes potentiels dans les différents sous-ensembles. Le gradient de couleur présenté dans les cadres représente le FC du gène dans l'analyse en fonction du sexe pour les études de biopuces. Plus la couleur du gradient est claire, plus le FC est grand. GD : jour de gestation de l'anglais gestation day.

Table 12 : Processus/fonctions biologiques dans lesquels les gènes épithéliaux pulmonaires modulés en fonction du sexe sont impliqués. L'analyse des gènes modulés en fonction du sexe a été réalisée sur le site web de Gene Ontology. Les sous-ensembles présentant un lien avec la maturation du poumon sont listés avec leurs gènes associés et leur numéro Gene Ontology (GO). Les gènes surlignés en bleu sont importants et seront détaillés dans la discussion du chapitre IV.

PROCESS	GENE SYMBOL	GO ID
EMBRYONIC ORGAN DEVELOPMENT	<i>Foxf1, Lif, Pdgfra, Tbx5, Tbx4, Hoxa5, Fixf1, Wnt5a, Tshz3, Hsd11b1, Fgfr1, Fgf2, Gli2, Nos3, Notch1, Igf1, Shh, Mgp, Rab3a, Aldh1a2, Stra6, Pdpn, Foxp2, Slc23a1, Ada, Wnt7b, Fbxw7, Mycn, Mir18, Mir20a, Mir19b-1</i>	30324
LUNG MORPHOGENESIS	<i>Rpl13a, Foxf1, Shh, Cfc1, Wnt7b, Nog, Sox11</i>	60425
EMBRYONIC MORPHOGENESIS		
<i>Lung alveolus development</i>	<i>Ace, Foxf1, Lif, Hoxa5, Meg3, Igf1, Stra6, Pdpn, Foxp2, Ada, Tns3, Man1a2</i>	48286
<i>Lung lobe morphogenesis</i>	<i>Foxf1, Lif, Igf1, Shh</i>	60463
<i>Respiratory tube development</i>	<i>Foxf1, Shh, Pcsk5</i>	30323
DEVELOPMENTAL GROWTH		
<i>Lung sacculle development</i>	<i>Ltbp3, Ptges3</i>	60430
VASCULATURE DEVELOPMENT		
<i>Lung vasculature development</i>	<i>Foxf1, Lif, Igf1, Stra6</i>	60426
<i>Respiratory system development</i>	<i>Spef2, Cfc1</i>	60541
MORPHOGENESIS OF BRANCHING EPITHELIUM		
<i>Epithelial tube branching involved in lung morphogenesis</i>	<i>Foxf1, Hoxa5, Shh, Lama1, Kras, Rdh10</i>	60441
EPITHELIAL CELL DIFFERENTIATION		
<i>Lung epithelial cell differentiation</i>	<i>Hoxa5, Igf1</i>	60487
REGULATION OF CELL PROLIFERATION		
<i>Regulation of epithelial cell proliferation involved in lung morphogenesis</i>	<i>Foxp2</i>	2000794
<i>Negative regulation of epithelial cell proliferation</i>	<i>Sfrp2, Mef2c, Tgfβ1, Wnt5a, Vash1, Snai2, Dab2, Pich1, Tgfβr3, Xdh, Vdr, Ptprm, Stat1, Apoh, Pex2, Cdk6, Wdr77, Strap, Aimp1, Mcc, Cdkn1b, Krt4</i>	50680
<i>Positive regulation of epithelial cell proliferation</i>	<i>Foxp2</i>	60501
CELL MIGRATION		
<i>Epithelial cell migration</i>	<i>Kit, Plxnd1, Nr4a1, Scarb1, Fgf2, Nos3, Loxl2, Plekhg5, Adam8, Cdh13, Cyp1b1, Slit2, Ptk2b, Amot, Cyp1b1, Fermt1</i>	10631

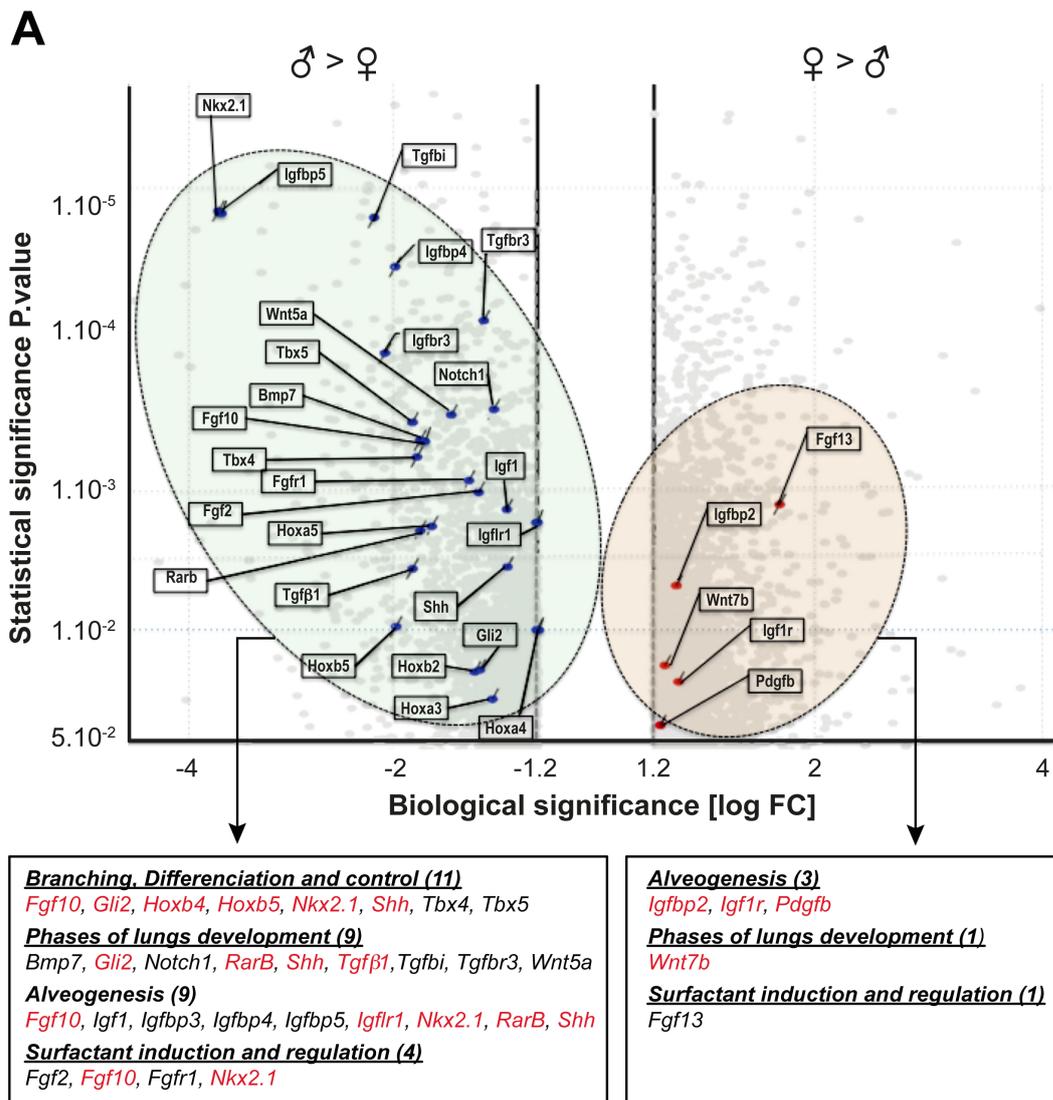
CELL DIFFERENTIATION		
<i>Positive regulation of epithelial cell differentiation</i>	<i>Adamts9, Tmem100, Bcl2, Vdr, Notch1, Prkch, Kitl, Foxa3, Trim16, Bmp6</i>	30858
MESENCHYME DEVELOPMENT		
<i>Lung associated mesenchyme development</i>	<i>Hoxa5, Fgfr1, Shh, Wnt7b</i>	60484
CELL PROLIFERATION		
<i>Mesenchymal cell proliferation involved in lung development</i>	<i>Shh</i>	60916
CELL COMMUNICATION		
<i>Cell-cell signaling</i>	<i>Alb, Dll4, Scn3b, Plat, Fos, Sipa1, Mmp9, Sstr2, Fgf14, Pdk2, Tbx5, Adora2a, Hoxa5, Hlpda, Ereg, Dap, Wnt5a, Nr4a2, Sv2c, Stxbp1, Cd34, Etv5, Fgfr1, Adora2b, Fgf2, Bcl2, Hgf, Stab1, Etv5, Foxl1, Vdr, Slc39a4, Cacna1g, Fzd2, Htr1d, Ache, Shh, Gjc1, Kiss1r, Rab3a, Hdac6, Plcb3, Slc2a1, Foxa3, Lynx1, Ccl5, Gjal, Grin2d, P2rx7, Dsg2, Usp14, Pdgfb, Tmod2, Als2, Wnt7b, Unc13c, Vdac3, Fbxo22, Dsp, Pafah1b1, Ntn4, Unc13c, Sirt1, Adrb2, Comt, Rrp8, Asns, Met, Aimp1, Ntsr2, Uchl1, Wnt7a, Itgb4, Unc13c, Gria3, Dsc2, Mybbp1a, Lgr4, Edn1, Myo5a</i>	7154
<i>Mesenchymal-epithelial cell signaling</i>	<i>Hoxa5, Wnt5a, Fgfr1, Hgf, Met</i>	60638
SYSTEM PROCESS		
<i>Respiratory system process</i>	<i>Hoxa5, Rab3an, Adh5, Adrb2, Ndn</i>	3016
<i>Respiratory gaseous exchange</i>	<i>Ednra, Dach1, Hoxa5, Chst11, Rab3a, Adh5, Man1a2, Adrb2, Ndn, Edn1</i>	7585
<i>Regulation of respiratory gaseous exchange</i>	<i>Nr4a2, Tshz3, Nlgn2, Atp1a2</i>	43576
STEROID BIOSYNTHETIC PROCESS		
<i>Lipid biosynthetic process</i>	<i>Scd1, Acer2, Taz, A4galt, Gpam, Scarb1, Hsd11b1, Acss1, Fgf2, Stard3, Mif, Acsl4, Pik3cg, Hsd17b11, Serine5, Nr1h3, Pla2g6, Slc27a1, Ch25h, Tecr, Chpt1, Ptges, Pgap2, Scd4, Mboat2, Pik3r1, Cacna1h, Fads3, Acsl1, Hsd3b7, Lpcat3, Aldh1a2, Tm7sf2, Dpm3, Lpin1, Acss2, Scd2, Scd3, Mboat7, Fads6, Pbx1, P2rx7, Dgat2, Pik3c2a, Hsd17b12, Pecr, Elovl4, Dhcr24, Lpcqt2, Pigw, Dctn6, Ptges3, Agpat5, Pex2, St8sia6, Pmvk, Samd8, Abhd5, Plscr1, Ppap2a, Crls1, Ptges2, Ptpmt1, Cers6, Cyp51, Pik3cb, Acsl3, Ajuba, Mecr, Rdh10, Sgms1, Hsd17b7, B3gnt5, Plcg2, Cwh43, Dhrs9, Sgms2, Pdss1, Prpf19, Cyp11a1, Edn1, Myo5a, Acot7</i>	8610
<i>Glucocorticoid biosynthetic process</i>	<i>Hsd11b1, Cacna1h</i>	6704
<i>Sphingolipid biosynthetic process</i>	<i>Acer2, A4galt, P2rx7, St8sia6, Samd8, Cers6, Sgms1, B3gnt5, Sgms2</i>	30148
STEROID HORMONE RECEPTOR BINDING		
<i>Androgen receptor binding</i>	<i>Wipi1, Prmt2</i>	50681
<i>Estrogen receptor binding</i>	<i>Arrb1, Wipi1, Pik3r1, Src, Prmt2</i>	30331
<i>Progesterone receptor binding</i>	<i>Prmt2</i>	33142

REGULATION OF STEROID HORMONE BIOSYNTHETIC PROCESS		
<i>Regulation of glucocorticoid biosynthetic process</i>	<i>Bmp5</i>	31946
<i>Regulation of glucocorticoid secretion</i>	<i>Ptpn11</i>	2000849
CELLULAR BIOSYNTHETIC PROCESS		
<i>Androgen biosynthetic process</i>	<i>Scarb1</i>	6702
SECRETION BY CELL		
<i>Androgen metabolic process</i>	<i>Scarb1, Hsd17b11, Shh, Tiparp, Dhrs9</i>	8209
LIPID BINDING		
<i>Sphingolipid binding</i>	<i>Slpr1, Lama1</i>	46625
<i>Sphingolipid catabolic process</i>	<i>Naga, Hexa, Smpdl3b</i>	30149
REGULATION OF RECEPTOR ACTIVITY		
<i>Regulation of androgen receptor activity</i>	<i>Heyl</i>	2000823
<i>Regulation of androgen receptor signaling pathway</i>	<i>Heyl, Dab2, Igf1, Hdac1, Sirt1, Prmt2</i>	60765
CELLULAR HOMEOSTASIS		
<i>Surfactant homeostasis</i>	<i>Pla2g4a</i>	43129
GROWTH FACTOR BINDING		
<i>Fibroblast growth factor binding</i>	<i>Fgfr1, Fgf2, Fgf14, Tgfb3, Hspa9, Smn1, Gpc1</i>	17134, 5104
SMAD BINDING		
	<i>Fos, Dab2, Tgfb3, Smad3, Prdm16, Zeb2, Parp1, Crebbp, Flna, Smurf1, Zfyve9, Ankrd1</i>	46332
<i>SMAD protein signal transduction</i>	<i>Fos, Afp, Bmp7, Bmp6</i>	60395
ELECTRON TRANSPORT CHAIN		
<i>Respiratory electron transport chain</i>	<i>Taz, Mybbp1a</i>	22904

III.3.3.3 Gènes impliqués dans le développement pulmonaire et la maturation et exprimés avec différences sexuelles

Par précaution, nous avons effectué l'analyse sans le test FDR pour faire l'étude des gènes avec un $FC \geq 1.2$ et une p-value < 0.05 . On peut émettre l'hypothèse que le test FDR considèrerait des résultats comme des faux positifs alors que certains gènes (p-value < 0.05) présentaient effectivement une différence sexuelle en qPCR. Par exemple, les gènes *Pdgfb* et *Tgf β 1* qui ne présentaient pas de différence sexuelle avec le test FDR dans l'analyse des biopuces ont été vérifiés en qPCR et ont démontré une différence sexuelle significative dans leurs expressions confirmant ainsi notre dernière hypothèse (Figure 23). L'image dite de «volcano plot» présentée ci-dessous en Figure 35 montre une sélection de gènes connus pour jouer un rôle dans le poumon fœtal et qui avaient une expression modulée en fonction du sexe dans notre étude des cellules épithéliales pulmonaires.

Le développement du poumon dépend d'une coordination précise de signaux tels que des facteurs de croissance comme les FGFs et *Bmp4*, des morphogènes tels que *Shh*, et l'acide rétinoïque, et les voies de signalisation NOTCH et TGF β . L'analyse sans le test FDR a révélé que les gènes *Fgf10*, *Shh*, *Rarb* et *Tgf β 1* appartenant aux voies de signalisation de NOTCH et TGF β présentaient des différences sexuelles au jour de gestation 18.5. Les gènes *Nkx2.1* et *Gli2*, connus dans le poumon fœtal pour leur rôle de régulateur de la transcription, montraient une surexpression chez le mâle tandis que les autres régulateurs comme *Gata6*, *Hnf-3* et *Hnf-4* n'avaient pas de différence sexuelle. D'autres gènes importants pour le développement et la maturation du poumon fœtal étaient surexprimés chez la femelle comme des gènes de la famille des Igf (*Igfbp2* et *Igf1r*), *Wnt7b* et *Pdgfb* impliqué dans l'alvéolisation en fin de gestation.



$P < 0.05$ without FDR test; $P < 0.05$ with FDR test

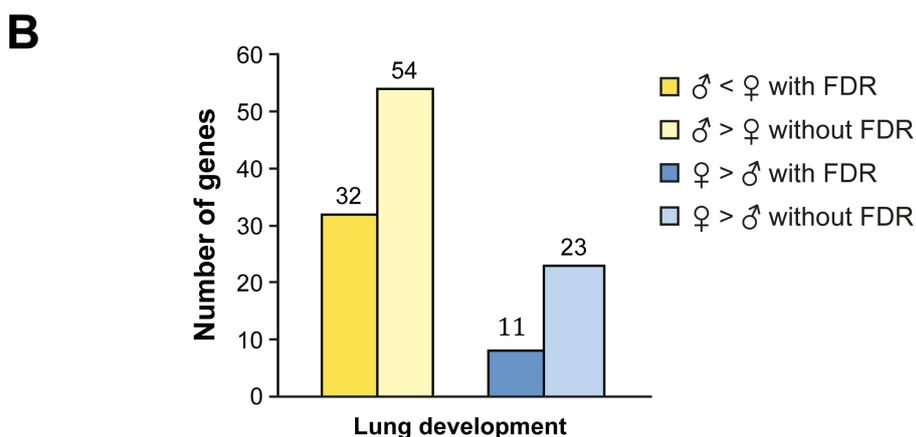


Figure 35 : Volcano plot représentant la distribution spatiale des gènes modulés par le sexe selon leurs p-values corrigées et leurs FC dans les cultures épithéliales du poumon en JG 18.5. A) Les processus biologiques associés aux gènes identifiés sont présentés sous le graphique. Les gènes en rouge dans l'encadré présentaient des différences sexuelles avec une p-value < 0.05 sans test FDR et les gènes en noir présentaient des différences sexuelles avec une p-value < 0.05 avec test FDR. B) Nombre de gènes épithéliaux présentant une différence sexuelle dans le sous-ensemble « Développement pulmonaire » dans l'analyse avec test FDR et sans test FDR.

CHAPITRE IV : Discussion

Les différences sexuelles dans les poumons complets de souris au jour de gestation 15.5, 16.5 et 17.5 ont été étudiées auparavant, dans une étude transcriptomique avec des périodes d'accouplement pendant la nuit [377]. Le protocole a montré que 83 gènes présentaient une différence sexuelle dans leur expression dans un ou plusieurs des temps étudiés. Une seconde étude menée au jour de gestation 17.0 et 18.0 a révélé que l'expression de 1844 gènes présentait une différence sexuelle au jour de gestation 17.0 contre 833 au jour 18.0 [380]. En parallèle, une étude utilisant le flutamide a mis en évidence les gènes qui étaient régulés par les androgènes dans la période de transition entre le stade canaliculaire et sacculaire. Parmi ces gènes, plusieurs montraient une différence sexuelle dans l'étude initiale [380]. Les différences dans le nombre de gènes, observées entre ces 2 études, de Simard *et al.* et Bresson *et al.* [377, 380], pourraient s'expliquer par la fenêtre de gestation qui a été réduite à 1h dans l'étude de Bresson *et al.* [380]. De plus, les accouplements sont effectués le matin afin de synchroniser nos temps de gestation avec les oestrus qui ont lieu théoriquement vers minuit. En prenant en considération la période de gestation chez la souris qui est de 19 jours, les différences sexuelles peuvent être transitoires et être perdues. Ainsi, la fenêtre d'accouplement pendant la nuit (16h) utilisée par Simard *et al.* [377] avait une plus grande incertitude (+ / - 8h) sur la période de gestation, comparativement à l'autre étude (+/- 30 min) empêchant ainsi la mise en évidence de gènes exprimés avec une différence sexuelle transitoire. Les jours de gestation sélectionnés pour le présent travail chevauchent la période de transition du stade canaliculaire au stade sacculaire où des changements importants dans la morphogenèse du poumon se produisent. Une attention particulière sur la précision des temps de gestation utilisés pour l'étude a été portée, avec des accouplements d'une période d'1h. Des études des communications cellulaires entre les fibroblastes et les cellules épithéliales ont démontré que la maturation des PTII était stimulée par les échanges entre ces deux types cellulaires [385-388]. Dans notre étude, nous avons procédé à une analyse transcriptomique sur des cultures cellulaires enrichies en cellules fibroblastiques et sur des cultures enrichies en cellules épithéliales issues de poumons fœtaux murins. L'étude cherchait à identifier les gènes qui présentent des différences dans leur expression entre les jours de gestation 17.5 et 18.5, puis d'identifier les différences sexuelles dans l'expression des gènes dans les cultures cellulaires pour le jour de gestation 18.5. Le délai dans la maturation du poumon des individus mâles observé à cette période se traduit par un pronostic moins favorable face à un syndrome de détresse respiratoire pour des naissances avant terme. Nos listes de

gènes sont identifiées avec une différence d'expression en fonction du temps et/ou une différence sexuelle au cours de la période de gestation de 24h qui chevauche la maturation des PTII chez la souris. Ces listes contiennent probablement des gènes clés impliqués dans cette maturation.

Dans la cadre de notre étude, il est important de considérer que le poumon total comprend plusieurs types cellulaires et que si un des types cellulaires présente une différence en fonction du temps ou du sexe, mais que la quantité de cellules est sous-représentée par rapport aux autres types cellulaires où la différence n'a pas été observée, la différence en fonction du temps ou du sexe observable en culture pourrait être perdue par l'analyse du poumon complet. De par la conception de notre étude et la difficulté dans la constitution d'un échantillonnage suffisant en cellules pour valider nos données de transcriptomique sur des cultures, seules les validations techniques du protocole de séparation des cellules par adhésion différentielle (qPCR vimentine et K18) ont pu être confirmées sur les ARN des fibroblastes et des cellules épithéliales utilisés pour les biopuces ADN. La validation qPCR sur un échantillonnage de poumons complets fut la meilleure alternative pour confirmer la reproductibilité des données de transcriptomique. Malgré ces limitations, nos travaux ont mis en évidence une corrélation des résultats de transcriptomique et des qPCR à la hauteur de 87.5% pour les analyses en fonction du temps (Table 7), et de 60% pour l'analyse selon le sexe fœtal (Table 8). Même si nos données indiquent que les différences observées en qPCR ont tendance à suivre nos résultats de transcriptomique, pour certains gènes importants comme *Tgfβ1*, ces différences ne sont pas toujours conservées et il peut exister une variabilité entre les portées. Suite à cette validation, nous avons procédé à une analyse détaillée de nos données de transcriptomique. Cette analyse vous est proposée ci-dessous.

Entre les jours de gestation 17.5 et 18.5, d'importants changements se produisent dans la morphogenèse pulmonaire, qui sont accompagnés par des variations de l'expression de plusieurs gènes. Ces changements dynamiques sont illustrés par nos données de transcriptomiques montrant une augmentation importante du nombre de gènes présentant une différence sexuelle ou temporelle dans leur expression dans la période de 24h étudiée, et pour chaque type cellulaire (Figure 24, 29 et 32 chapitre III).

Parmi ces gènes, plusieurs sont reconnus pour être impliqués dans différents processus biologiques ou fonctions moléculaires pertinentes au développement des poumons. Ainsi, une réflexion sur les différents acteurs pouvant influencer les processus de communication, de prolifération et de différenciation cellulaire sera portée à votre attention. Nous parlerons des voies de signalisation de TGF β , FGF, PDGF, IGF, Wnt, BMP, Notch et Shh dans cette première partie, puis nous traiterons de la synthèse des prostaglandines et finalement, le métabolisme des lipides sera abordé dans la dernière partie du texte.

La voie de signalisation du facteur de croissance transformant béta est impliquée dans de nombreux aspects du développement pulmonaire. Différentes études sur le poumon (dont des explants de poumons en culture et chez des souris transgéniques) ont démontré que la voie de signalisation TGF β agissait comme un régulateur négatif de la ramification des voies aériennes, de la différenciation et de la prolifération des cellules épithéliales [107, 171, 220, 389-391]. La liaison du ligand TGF β à un complexe d'hétérodimère, TGF β R1 et TGF β R2, entraîne la phosphorylation de TGF β R2 qui active TGF β R1 et démarre la signalisation de TGF β en phosphorylant un complexe SMAD intracellulaire formé par les R-Smad (Smad2 et Smad3) et Co-Smad (Smad4) [177, 392-394]. Dans notre étude, nous avons observé une modulation de l'expression de nombreux gènes qui appartiennent à cette voie (voir Figure 36). L'expression de *Tgfb1*, dont on a parlé précédemment pour la qPCR en tissu complet, est localisée dans le mésenchyme subépithélial [107, 220, 395]. Ce gène était plus exprimé chez le mâle en JG 18.5 dans les fibroblastes et dans les épithéliales, tandis que l'expression du gène *Tgfb2*, l'un des 3 récepteurs de TGF β , augmentait en fonction du temps entre les jours de gestation 17.5 et 18.5. Il a été démontré que l'activation de TGF β R2 était nécessaire à l'effet antiprolifératif de TGF β [396, 397]. TGF β R3, aussi connu sous le nom de bétaglycan, favorise la liaison entre le ligand et le récepteur de type II du TGF β chez les cellules épithéliales pulmonaires de souris. Son expression est essentielle à la signalisation optimale de TGF β [18]. Il a été démontré que l'effet antiprolifératif de TGF β était considérablement atténué quand l'expression du gène TGF β R3 était inhibée. Dans notre étude, le gène *Tgfb3* est plus exprimé chez les mâles, ce qui suggère une diminution de l'activité proliférative chez ces derniers. Bien que nos résultats montrent

une différence sexuelle dans l'expression du gène *Smad3* au jour de gestation 18.5 dans la population épithéliale, il a été auparavant démontré qu'une morphogenèse normale du poumon est observée chez des souris *Smad3*^{-/-}, suggérant ainsi que les effets de la voie de signalisation TGFβ étaient indépendants de l'activité de Smad3 [398]. De plus, *Zfyve9* encode une protéine d'ancrage SMAD, aussi connue sous le nom complexe *Alk5* (*Tgfβr1*)-*Smad*-*SARA*. L'expression de *Zfyve9* augmente dans le temps dans notre étude. L'augmentation en fonction du temps de l'expression du gène *Tgfβr2*, ainsi que l'augmentation d'expression de la protéine d'ancrage pour la signalisation via SMAD, suggèreraient une régulation négative de l'état prolifératif via la signalisation de TGFβ. Cette régulation se trouve augmentée pour les mâles au jour de gestation 18.5 en présence de *Tgfβr3*.

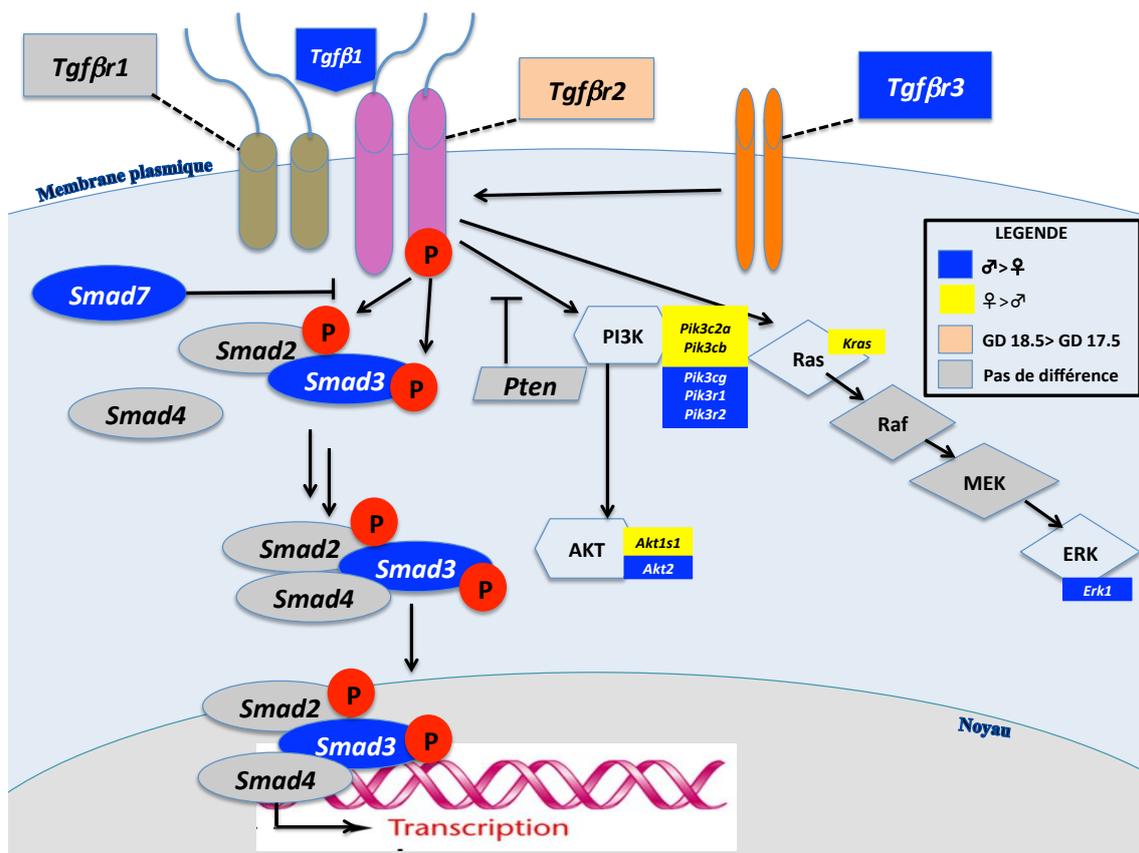


Figure 36 : Les voies de signalisation activées par TGFβ dans le poumon fœtal.

Bien que l'activité inhibitrice de TGF β soit en bonne partie dépendante de l'expression des gènes du complexe SMAD [397], la signalisation de TGF β via l'activité de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) joue également un rôle important dans la prolifération des cellules [163, 164]. Le gène PTEN joue le rôle de régulateur de l'activité PI3K et lorsqu'il est faiblement exprimé, l'activité PI3K/AKT va contribuer à la progression du cycle cellulaire et à la différenciation cellulaire. Une étude précédente du laboratoire sur poumon complet a montré que *Pten* présentait une différence sexuelle dans son expression en JG 17.0 et JG 18.0 [380] avec une expression supérieure chez le mâle en JG 17.0 et inversement en JG 18.0. Nous n'avons pas observé de différence en fonction du temps ou du sexe dans l'expression de *Pten* dans nos cultures. Toutefois, l'expression de ce gène diminuait entre JG 17.5 et JG 18.5 chez le mâle (données non présentées) en accord avec une précédente étude sur des lignées cellulaires transformées où une diminution de l'expression de *Pten* a été observée en corrélation avec l'augmentation de l'expression de *Tgfb* [399]. Comme il a été démontré précédemment, la diminution de l'expression de *Pten* est liée à une hypoplasie du poumon caractérisée par une plus faible différenciation des cellules épithéliales chez les souris présentant une mutation de *Pten* dans l'épithélium broncho-alvéolaire [400]. Utilisé en excès dans des études in vitro et in vivo, TGF β 1 a montré qu'il induisait un arrêt de la différenciation des cellules épithéliales du poumon et bloquait la synthèse des phospholipides et des protéines du surfactant A, B et C [309, 391, 401]. La synthèse des protéines du surfactant par les PTII, se trouve donc bloquée par la voie de signalisation TGF β [152, 402] qui, dans notre étude, présente une expression plus forte chez le mâle en JG 18.5. TGF β exerce donc une pression négative sur le processus de maturation pulmonaire chez le mâle pour le jour de gestation 18.5.

La protéine TSC-22, dont l'expression est induite par TGF β , est aussi impliquée dans la différenciation cellulaire des cellules érythroïdes [403, 404]. L'étude de Choi SJ *et al.* [404] a démontré que Tsc-22 interagit avec les SMAD, notamment Smad3, suggérant ainsi un rôle important des molécules qui interagissent avec les SMAD dans la régulation de la signalisation de TGF β . L'interaction de Tsc-22 et SMAD pourrait influencer la différenciation cellulaire dans de nombreux tissus [404]. En accord avec une étude précédente menée au laboratoire où *Tsc-22* était plus exprimée dans les poumons mâles en JG 17.0 [380], le gène *Tsc-22* a présenté la même différence sexuelle

en JG 18.5 dans nos cultures pulmonaires. Considérant que le gène *Tsc-22* améliore l'activité de TGF β et qu'il a été suggéré que le gène *Tsc-22* pouvait jouer un rôle dans la régulation de la sensibilité de différents tissus à la signalisation de TGF β [404], l'expression de *Tsc-22*, plus élevée chez le mâle à cette période, pourrait mettre en évidence une voie de signalisation ayant un effet négatif particulièrement chez le mâle dans les processus de développement et de maturation.

Le facteur d'inhibition leucémique (Lif), impliqué dans la voie PI3K/AKT et JAK/STAT3 [405-409], est exprimé durant le développement du poumon fœtal. L'ajout de doses croissantes de LIF dans des cultures d'explants de poumons fœtaux provoque une inhibition de la croissance pulmonaire, tandis que l'ajout d'anticorps neutralisant Lif stimule la ramification des voies aériennes du poumon [410]. L'étude démontre que *Lif* est exprimé dans l'épithélium pulmonaire chez le rat. Son récepteur, *Lifr*, est exprimé dans le mésenchyme, puis dans les cellules épithéliales à partir du stade pseudoglandulaire [410]. L'inhibition de la signalisation de Lif dans le poumon a un effet comparable à l'action provoquée par l'expression du gène FGF-10, un facteur de transcription important pour la croissance pulmonaire qui favorise la ramification des voies aériennes du poumon [411, 412]. *Lif* était exprimé dans nos cultures épithéliales avec une différence sexuelle en faveur des mâles, tandis que l'expression du récepteur *Lifr* dans les cultures fibroblastiques était plus forte chez le mâle au jour de gestation 18.5. La modulation de l'expression en fonction du sexe fœtal de *Lif* et *Lifr* suggère chez le mâle une pression de régulation qui influence l'équilibre vers une diminution de la croissance du poumon.

Comme pour TGF β , la voie de signalisation de FGF est essentielle à beaucoup de processus durant le développement embryonnaire [220, 221], notamment en régulant la prolifération et la différenciation cellulaire [220]. Il a aussi été démontré que les récepteurs de FGF (FGFR1-4) étaient impliqués dans les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium permettant de guider la croissance de l'épithélium et du mésenchyme [260, 413]. Les ligands membres de la famille de FGFs, généralement exprimés dans le mésenchyme [414], en particulier FGF10, sont de puissantes molécules de signalisation chimiotactique. L'inhibition de FGF10 a généré une agénésie du poumon témoignant du rôle important de ce gène dans la formation de l'organe

[233]. Dans nos cultures, *Fgf10* n'était modulé ni en fonction du temps, ni en fonction du sexe fœtal dans la fraction fibroblastique, mais son expression était plus élevée chez les mâles comparativement aux femelles en JG 17.0 dans le poumon complet [380]. Néanmoins, son niveau d'expression restait élevé chez les deux sexes indépendamment du temps, alors que le gène encodant le récepteur *Fgfr1*, exprimé par les cellules épithéliales [415], présentait une expression supérieure chez le mâle au jour de gestation 18.5. Ce résultat suggère que la croissance dépendante de FGF10 serait davantage stimulée dans le poumon mâle à cette période de gestation.

Les gènes de la famille du facteur de croissance dérivé des plaquettes encodent des glycoprotéines qui stimulent certaines voies métaboliques via une signalisation de type paracrine entre l'épithélium et le mésenchyme [301, 302, 416]. On distingue 4 isoformes du ligand PDGF (PGDFA, PDGFB, PDGFC et PDGFD) et 2 isotypes du récepteurs PDGFR qui présentent une activité tyrosine-kinase quand ils sont activés. Les 2 isotypes des récepteurs transmembranaires PDGF (PDGFRA et PDGFRB) sont exprimés dans les cellules du mésenchyme durant le développement embryonnaire. Les récepteurs sont activés par la liaison d'un homodimère ou hétérodimère de PDGFs (PGDFAA, PDGFBB, PDGFCC, PDGFDD et PDGFAB), exprimé dans l'épithélium [417]. La liaison récepteur-ligand engendre une autophosphorylation du domaine intracellulaire de PDGFR menant à l'activation de la voie de signalisation. PDGF est reconnu pour son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire [418]. Il a été démontré que l'inactivation de PDGFs, notamment chez les souris *Pdgfa*^{-/-}, entraînait la mort suite au développement d'un emphysème pulmonaire provoqué par un déficit dans le processus de formation des septa alvéolaires [301, 419]. PDGF joue donc un rôle important dans le processus d'alvéolisation [420]. Différentes études ont montré que PDGFC était impliqué dans la prolifération [421]. Midgley *et al.* [422] ont démontré que la transcription de *Pdgfc* était régulée par *Egr1* (early growth response 1) et *Fgf2* qui stimulent l'expression du gène *Pdgfc* via ERK dans des cultures primaires de cellules aortiques chez le rat. L'interaction entre les différentes voies de signalisation peut aussi être observée entre PDGF et TGFβ parce que ces deux ligands présentent des structures similaires [423] permettant la fixation de PDGFs aux récepteurs TGFβR1 et TGFβR2, ce qui actionnera la signalisation via la voie PI3K. Dans nos cultures épithéliales, les gènes *Egr1* et *Fgf2* étaient plus exprimés chez le mâle en JG 18.5 tandis

que *Pdgfc* était plus exprimé chez les femelles. Ceci est surprenant car la surexpression des gènes *Egr1* et *Fgf2* chez le mâle auraient dû permettre une augmentation d'expression de *Pdgfc*. D'autres facteurs semblent donc contribuer négativement à l'expression de *Pdgfc*. Ces deux gènes *Egr1* et *Fgf2* montrent une pression de régulation positive, mais il semble y avoir d'autre(s) facteur(s) qui exerce(nt) une pression négative. Ces facteurs de régulation peuvent être inconnus ou encore être connus mais agir via des mécanismes de communications croisés (« crosstalk ») entre les voies de signalisation. En JG 18.5, la régulation de la voie PDGF pourrait contribuer à la croissance du tissu selon une dynamique différente car influencée par le sexe. Cette hypothèse est plausible et pourrait réellement jouer un rôle important dans le développement et la maturation du poumon fœtal mais je n'ai pas toutes les données pour le montrer. Nos résultats ouvrent une porte dans une direction, suggérant une pression positive, mais aussi dans la direction opposée avec une pression négative.

De nombreux facteurs régulant la morphogenèse normale du poumon utilisent les voies de signalisation des cascades MAPK et PI3K/AKT [424]. Les IGFs sont reconnus pour être des facteurs qui affectent la prolifération et la différenciation des cellules dans les tissus selon un mécanisme autocrine ou paracrine [271]. Le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline appartient à la famille de l'insuline dont l'effet est médié par les voies de signalisation AKT et MAP kinase. IGF1 agit principalement via son récepteur tyrosine kinase IGF1R avec lequel il a une forte affinité [425]. Des études ont mis en évidence que les IGFs jouaient un rôle déterminant dans la croissance du poumon et l'organogenèse. En effet, chez l'humain, la mutation des gènes IGF1 et IGF1R est associée à un retard de croissance où l'on rapporte une hypoplasie du poumon [275]. Chez la souris mutante *Igf1^{-/-}*, on observe à la naissance une atélectasie du poumon menant le plus souvent à la mort [274, 276, 279, 280], tandis que toutes les souris *Igflr^{-/-}* meurent à la naissance, visiblement d'insuffisance respiratoire causée par un collapsus pulmonaire, que l'on peut associer à un SDR [274, 276, 426]. Enfin, l'étude d'explants de poumons de souris en culture a montré que l'ajout d'IGF1 augmentait le nombre de cellules épithéliales alvéolaires de type II [281]. Ainsi, les différentes études suggèrent que la voie de signalisation IGF joue un rôle dans le développement du poumon, notamment avec IGF1 qui est impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales [278, 282, 283]. La voie de signalisation IGF

peut aussi être régulée par les protéines liantes d'IGF (IGFBPs) exprimées localement durant le développement pulmonaire [272]. Les transcrits des gènes *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4* et *IGFBP5* ont été détectés dans le poumon en développement [425] selon une expression temporelle et spatiale déterminée [112, 427] pouvant suggérer un rôle distinct de ces protéines dans la régulation de l'action d'IGF durant le développement du poumon. Récemment, des études ont mis en évidence que IGFBP3 et IGFBP5 jouaient un rôle important durant le développement du poumon fœtal [428] de par leurs interactions avec la voie de signalisation des rétinoïdes [429]. Les rétinoïdes sont importants dans la différenciation de l'épithélium via l'acide rétinoïque (RA) et ses récepteurs, dont RAR [430]. Dans la littérature, on indiquait que *IGF1* était exprimé dans l'épithélium [431], tandis que son récepteur *IGF1R* était exprimé dans le mésenchyme [431] chez l'humain. *Igf1* était plus exprimé chez le mâle dans nos cultures épithéliales et son récepteur, *Igflr*, ne présentait pas de différence en fonction du temps ou du sexe en JG 18.5. *Igfbp3*, *Igfbp5* et *Rarb*, qui est l'un des récepteurs de RA, présentaient des niveaux d'expression supérieurs chez les mâles dans nos cultures de cellules épithéliales en JG 18.5. De plus, plusieurs gènes encodant des facteurs des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT étaient plus exprimés chez le mâle comparativement à la femelle à ce temps de gestation (voir Figure 37). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation d'IGF serait plus active chez le mâle en JG 18.5. Elle favoriserait la différenciation cellulaire des cellules épithéliales et, par conséquent, augmenterait la synthèse des éléments du surfactant à cette période de gestation.

Le gène *LEMD2* est aussi connu sous le nom *LEM2*. Son rôle en culture de myoblastes a été établi par le KO (knock-out) du gène, qui conduit à l'activation des voies MAP kinase et PI3K/AKT [432]. Notre étude a montré que l'expression du gène *Lemd2* augmentait chez la femelle en fonction du temps. Ceci suggère que *Lemd2* pourrait avoir un effet négatif en fonction du temps sur les voies de signalisation PI3K/AKT et MAP kinase impliquées avec de nombreux facteurs dans la régulation de la morphogenèse pulmonaire.

Le gène *FOG2* (*ZFPM2*) encode un facteur de transcription capable de moduler l'activité des protéines de la famille GATA via NR2F2, aussi connu sous le nom de COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II) [433-435].

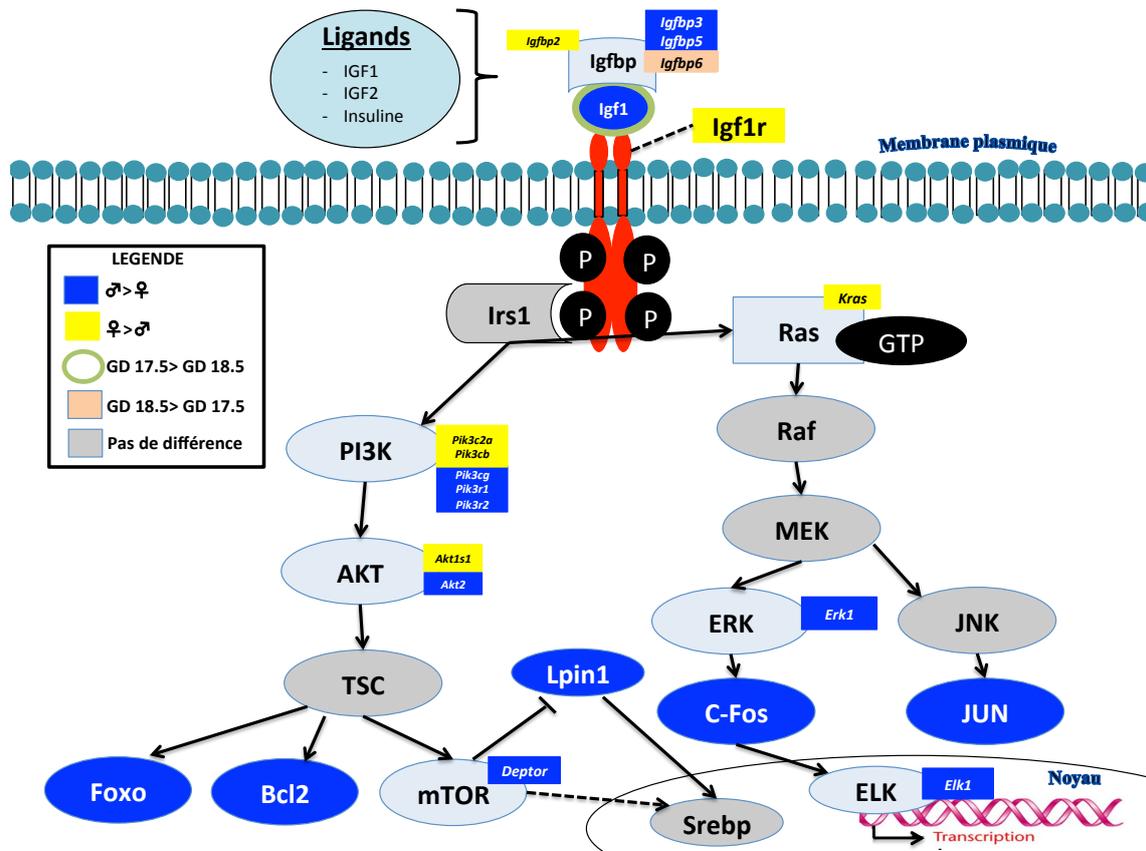


Figure 37 : Les voies de signalisation PI3K/AKT et MAP kinase activées par IGF/IGF1R dans le poumon fœtal.

Dans le poumon en développement, il a été démontré que COUP-TFII agissait comme un inhibiteur de la signalisation de RA dans le mésenchyme [436-438]. Le KO de *Fog2* chez la souris induit une hypoplasie du poumon entraînant un arrêt dans le développement de l'organe [439], ce qui confirme son rôle important dans le développement du poumon. Le gène *Fog2* est exprimé dans le mésenchyme [440] et son expression diminuait en fonction du temps dans nos cultures fibroblastiques. Le gène *Nr2f2* était plus exprimé chez le mâle en JG 17.0 dans l'étude de Bresson *et al.* [380] mais ne présentait aucune différence temporelle ou sexuelle dans notre étude. Nos résultats pourraient indiquer que la régulation *Nr2f2* a été perdue en culture de cellules, ce qui expliquerait que l'on ne voit pas de différence sexuelle en JG 17.5 dans nos cultures. Une autre possibilité est qu'il puisse y avoir une régulation rapide *in vivo* dans les 12h qui séparent les temps de gestation 17.0 à 17.5, résultant en la perte de la

différence sexuelle. Bresson *et al.* [380] ne voyait plus de différence sexuelle en JG 18.0 dans leur étude sur poumon complet, ce qui pourrait appuyer cette dernière hypothèse.

La famille Wnt est constituée de protéines de signalisation qui régulent des interactions entre les cellules dans de nombreux tissus embryonnaires. Wnt induit dans ses cellules cibles une des voies de signalisation intracellulaire suivantes: la voie β -caténine qui active les gènes cibles dans le noyau, la voie Jun N-terminal kinase (JNK) et la signalisation Wnt/ Ca^{2+} . La signalisation de Wnt joue un rôle important dans la différenciation cellulaire et la morphogénèse du poumon [218]. La voie β -caténine/TCF est la plus caractérisée de la signalisation Wnt [441]. Dans cette voie, le ligand Wnt sécrété se lie à ses récepteurs Frizzled membranaires qui, via différents facteurs, inhiberont la phosphorylation de la β -caténine. L'absence de phosphorylation de la β -caténine va permettre sa stabilisation, puis elle va être ainsi transportée vers le noyau pour être hétérodimérisée avec, notamment, les membres de la famille TCF et CREBBP pour activer les gènes cibles en aval. Wnt2 et Wnt7b sont les ligands de la voie de signalisation WNT- β -caténine qui sont exprimés durant le développement pulmonaire [214]. Une étude a démontré que *Wnt2* était régulé négativement dans les poumons des souris (*Fgf9*^{-/-}), ce qui suggère que la voie de signalisation Wnt pourrait être régulée par la signalisation de FGF [218]. La coordination des voies de signalisation de Wnt et FGF soutiendrait la croissance du mésenchyme et la morphogénèse de l'épithélium durant le stade pseudoglandulaire du développement du poumon [218]. L'inactivation de Wnt7b, exprimé dans l'épithélium du poumon, a pour conséquence une hypoplasie sévère du poumon accompagnée d'une diminution de la ramification des voies aériennes, de la prolifération cellulaire et de la différenciation des cellules épithéliales [214]. Notre présente étude montre que les gènes *Wnt2* (exprimé dans le mésenchyme [218]), *Wnt7b* et *Ctnna1*, qui encode la β -caténine dans l'épithélium alvéolaire [442], sont plus exprimés chez la femelle comparativement au mâle au jour de gestation 18.5. La β -caténine déphosphorylée va interagir avec d'autres facteurs de transcription, dont les TCFs, pour induire l'expression de gènes spécifiques. *Tcf4* et *Tcf7* ont montré une expression supérieure chez le mâle en JG 18.5 dans nos cultures, en accord avec l'étude de Bresson *et al.* [380] qui montrait que le gène *Tcf4* était plus exprimé chez le mâle dans le poumon complet en JG 17.0. Contrairement à l'étude de Bresson *et al.* [380] qui montrait que *Crebbp* était plus exprimé chez le mâle en JG 17.0, ce gène était plus

exprimé chez la femelle en JG 18.5 selon nos données. Ces résultats suggèrent que, chez la femelle, la différenciation de l'épithélium se poursuit notamment via la voie de signalisation Wnt- β -caténine et Crebbp. Les facteurs TCF pourraient exercer une pression positive sur la différenciation des cellules qui va être plus marquée chez le mâle car l'expression de ces facteurs dans nos cultures d'origine mâle est plus importante comparativement à nos cultures d'origine femelle. D'un autre côté, dans le modèle de culture épithéliale A549, un traitement avec IGF1 augmentait l'expression du gène *Wnt5a* [443] qui stimulait la libération de Ca^{2+} intracellulaire et activait la voie PKC [444]. Ainsi, l'étude de Ghosh *et al.* [443] suggérait que IGF1 favorisait la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires via l'activation d'une voie Wnt. Dans nos travaux, *Wnt5a*, exprimé par l'épithélium [215, 216], est plus exprimé chez les mâles dans les cultures épithéliales en JG 18.5. Ce résultat suggère que la différenciation de l'épithélium chez les mâles à cette période montrerait une tendance à être favorisée par l'expression des facteurs de la voie de signalisation de Wnt/ Ca^{2+} , mais on ne peut pas exclure le rôle de la voie Wnt- β -caténine dans ce processus. Nous ne possédons pas les données permettant d'appuyer qu'une des voies de signalisation dépendantes de Wnt aurait un impact plus positif ou négatif pour les mâles. Des études complémentaires devront être poursuivies pour y répondre.

Certains facteurs impliqués dans la morphogénèse du poumon sont également impliqués dans la différenciation cellulaire. Lorsque *SEMA3A*, un gène de l'épithélium [445, 446] responsable de signaux de guidage neuronal, est retiré par KO, il en résulte une mortalité périnatale importante. En effet, l'étude de souris *Sema3A*^{-/-} durant le développement embryonnaire tardif (JG 17.5) a montré des défauts de maturation et de différenciation dans l'épithélium distal du poumon, notamment avec un épaississement des parois et une réduction du nombre de saccules [445]. Les cellules de l'épithélium distal montraient une augmentation des quantités de glycogène intracellulaire. Des petits corps lamellaires avec une ultrastructure anormale étaient retrouvés dans les PTII et on observe dans l'épithélium distal une réduction de l'expression des marqueurs des PTI, suggérant une diminution de la différenciation de ce type cellulaire. Chez ces souris *Sema3A*^{-/-}, l'alvéolisation était aussi nettement diminuée. *Sema3A* aurait donc un rôle important dans la différenciation des cellules épithéliales pulmonaires et dans la septation [445-448]. *Sema3A* présente dans notre étude une expression qui augmente

entre les jours de gestation 17.5 et 18.5 dans les cellules épithéliales, ce qui suggère qu'indépendamment du sexe, en JG 18.5, les cellules épithéliales entrent en maturation via d'autres voies de signalisation dont FGF, IGF, Nkx2.1 et Notch. De plus, même si nous n'avons pas vu de différence sexuelle pour l'expression du gène *Sema3A* dans notre étude, une différence sexuelle pourrait exister dans une fenêtre qui n'est pas couverte par l'étude ou qui n'était pas détectable en prenant des points à 12h d'intervalle.

Constituant le plus grand groupe de cytokines appartenant à la famille de TGF β , les BMPs sont exprimés dans l'épithélium pulmonaire [449]. À l'origine, ces facteurs ont été identifiés comme des molécules responsables de la régulation de la croissance et différenciation des os et du cartilage. Toutefois, leurs rôles dans la différenciation cellulaire, l'apoptose et la croissance de nombreuses lignées cellulaires, notamment épithéliales et mésenchymateuses, ont depuis été démontrés [450]. Ainsi, le KO du gène *Bmp4* a montré une hypoplasie pulmonaire se traduisant par une différenciation anormale des cellules épithéliales [203]. La voie de signalisation de BMP agit via deux sous-types de récepteurs : BMPR1 (BMPR1A et BMPR1B) et BMPR2 qui initient la signalisation intracellulaire en réponse à des ligands spécifiques [451]. BMP6 et BMP7 interagissent avec le récepteur de type II et recrutent les récepteurs de type I, tandis que BMP2 et BMP4 se lient préférentiellement aux récepteurs de type I et recrute le récepteur de type II [452]. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de modulation en fonction du temps pour les gènes de la voie de signalisation BMP, mais nous avons trouvé que le gène *Bmp6* était fortement exprimé chez la femelle comparativement au mâle en JG 18.5, tandis que le gène *Bmp7* était plus fortement exprimé chez le mâle à la même période. L'expression de *Bmpr2* n'était pas modulée par le sexe ou le temps dans nos études en culture. Toutefois, ce gène a montré une expression supérieure chez le mâle comparativement à la femelle au jour de gestation 17.0 dans l'étude de Bresson *et al.* [380]. Ceci suggère que la différenciation des cellules épithéliales du poumon ne semble pas régulée de la même manière entre mâle et femelle et semble emprunter des voies différentes. L'étude du KO de *Bmpr-1A*, normalement exprimé par les cellules épithéliales [192], a montré des modifications dans la morphogenèse de la ramification des voies aériennes du poumon et dans la formation des voies respiratoires qui ont provoqué une détresse respiratoire néonatale [208, 209]. Le gène *Bmpr-1A* présente une

expression supérieure chez le mâle comparativement à la femelle en JG 18.5, ce qui suggère que dans le processus de croissance, la contribution de la voie de signalisation BMP est plus importante chez le mâle. En revanche, en JG 18.5, l'expression du gène *Noggin* (*Nog*), un inhibiteur de BMP, est plus forte chez la femelle comparativement au mâle. Ces régulations vont conjointement favoriser le même processus et pourraient donc être des exemples du déphasage d'une mécanique complexe. Le résultat global de ces régulations va orienter le devenir du poumon selon une synchronisation qui pourrait être dépendante du sexe fœtal.

Le gène NKX2.1 (facteur de transcription de la thyroïde 1, de l'anglais *thyroid transcription factor 1*), reconnu pour son rôle dans la morphogenèse du poumon dans les premiers stades de formation, est également capable avec BMP d'influencer la différenciation des cellules épithéliales du poumon en développement [449]. Une étude a démontré que le KO *Nkx2.1*^{-/-}, chez la souris, provoquait l'arrêt de la différenciation des PTI [453]. Nous rapportons dans notre étude que le gène *Nkx2.1*, exprimé dans les cellules épithéliales pulmonaires [454], présentait une expression supérieure chez le mâle en JG 18.5 comparativement à la femelle. Ceci suggère que les gènes *Nkx2.1* et BMPs exerceraient une pression positive dans le sens de la différenciation plus fortement chez le mâle.

Plusieurs membres de la famille Notch/Notch-ligand impliqués dans la spécification du devenir de la cellule et dans la différenciation cellulaire jouent un rôle dans le développement alvéolaire en coordonnant la différenciation des cellules épithéliales avec la formation des capillaires [455-459]. Notch appartient à la famille des récepteurs transmembranaires qui transmettent un signal paracrine contrôlant le processus de différenciation [457-459]. Plusieurs membres de la famille Notch sont exprimés dans le poumon, notamment les récepteurs *Notch1* et *Notch4* ainsi qu'un de leurs ligands chez la souris, *Dll1* et les facteurs de transcription Hey de la voie Notch [460-464]. L'étude de Takaaki *et al.* [456] a démontré que l'expression de *Notch1*, *Notch2*, *Notch3* et *Notch4* augmentait dans le poumon murin, en fonction de l'âge fœtal. Chacun des KO des gènes *Notch1*, *Notch2* et *Dll1* sont mortels dès le développement embryonnaire précoce chez la souris [465, 466]. Les souris *Notch3*^{-/-} et les souris *Notch4*^{-/-} étaient viables, mais les souris *Notch3*^{-/-} montraient un développement

alvéolaire incomplet avec des défauts de septation [455]. Dans notre étude des cultures, les gènes *Dll1*, *Noch1*, *Notch3* et *Notch4* étaient plus exprimés chez le mâle comparativement à la femelle au jour de gestation 18.5. *Aph1c*, le gène encodant la Y-sécrétase appartenant à la voie de signalisation de Notch, ainsi que les gènes des facteurs de transcription *Hey1* et *Hey2* présentaient aussi une expression avec une différence sexuelle en faveur des mâles au jour de gestation 18.5 dans nos cultures. Ceci suggère que la voie de signalisation Notch favoriserait davantage la différenciation des cellules épithéliales du poumon mâle à ce temps de gestation comparativement à la femelle.

L'organogenèse du poumon est le résultat d'interactions entre l'épithélium et le mésenchyme qui coordonnent les étapes cellulaires responsables de la formation de l'organe. Parmi les voies de signalisation impliquées dans ce processus, il y a Shh qui a un rôle important dans la morphogenèse du poumon des mammifères [240, 467]. Les récepteurs transmembranaires patched (PTCH) et smoothed (SMO) induisent l'activation des facteurs de transcription Gli, qui sont les effecteurs de la voie de signalisation Shh, contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire dans le mésenchyme [240]. Dans le poumon en développement, *Shh* est exprimé dans l'épithélium pulmonaire [261], tandis que, *Ptch1*, *Smo* et *Gli1-3* sont exprimés dans le mésenchyme [240, 468]. La voie de signalisation de Shh va réguler négativement la prolifération des cellules du mésenchyme et augmenter l'apoptose et l'expression de certains gènes fibroblastiques [239, 240]. L'inhibition de l'expression de *Shh* ou de ses gènes cibles, les gènes *Gli*, chez les souris mutantes conduit à une simplification alvéolaire qui, par conséquent, modifie la morphogenèse du poumon avec une diminution de formation du mésenchyme [239, 240, 256, 261, 331, 469]. Suite à ces études, il a été proposé que la voie de signalisation de Shh jouait un rôle dans les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium permettant la régulation de la morphogenèse du mésenchyme [260]. Le gène *Shh* présente une expression supérieure chez le mâle comparativement à la femelle dans les cultures épithéliales, mais aucun de ses récepteurs ou facteur de transcription en aval ne présente de différence sexuelle dans le mésenchyme. En revanche, le fait que l'expression de *Shh* soit plus élevée chez les mâles suggère qu'au jour de gestation 18.5, la signalisation Shh est plus élevée dans le poumon en développement des mâles comparativement aux femelles. Shh participe

donc à la communication entre l'épithélium et le mésenchyme. Cette interaction lui permettrait donc de réguler la croissance pulmonaire particulièrement chez le mâle au jour de gestation 18.5.

Les prostaglandines (PG) sont dérivées de l'acide arachidonique qui, lui, provient des phospholipides membranaires. L'étape initiale de la synthèse des prostaglandines fait intervenir les activités cyclooxygénase (COX) et peroxydase d'une prostaglandine synthase H [470]. Chez l'humain, il existe 2 gènes codant pour la prostaglandine synthase H (PGHS-1 et PGHS-2 encodant COX-1 et COX-2, respectivement) qui sont pratiquement identiques pour leurs activités cyclo-oxygénase et peroxydase, mais dont la régulation varie [471]. PGDH (hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)) est reconnue pour inactiver les prostaglandines [472]. Les prostaglandines sont connues pour influencer la prolifération et la différenciation cellulaire et joueraient un rôle important durant le développement du poumon fœtal [472]. Il a été démontré que la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des prostaglandines avait une grande importance dans la régulation des niveaux de prostaglandines dans le poumon fœtal en développement chez l'humain [472]. Il a été suggéré que l'expression du gène PGDH dans l'épithélium distal du poumon pouvait engendrer un arrêt de la différenciation de l'épithélium à la fin du stade canaliculaire chez l'humain [472]. Dans notre étude, le gène *Pghs1* (aussi connu sous le nom *Ptgs1*, qui encode *Cox-1*) avait une expression qui diminuait en fonction du temps tandis que les gènes *Pla2g4a* et *Ptgs2*, impliqué dans la libération des substrats utilisés par les COX [473-475], étaient plus exprimés chez les femelles. Ces résultats pourraient suggérer que la régulation de *Cox-1* engendre une baisse dans les niveaux de synthèse des prostaglandines dans le poumon à cette période de la gestation. La diminution de l'expression du gène encodant COX-1 pourrait engendrer une diminution de la quantité de substrat disponible pour les étapes subséquentes dans la synthèse de PGE2, PGD2 et PGF2. Des études ont démontré que les prostaglandines pouvaient réguler l'expression des apoprotéines du surfactant et la synthèse de phosphatidylcholine dans le poumon fœtal [473-475].

Les PTII différenciées sont à l'origine de la production du surfactant pulmonaire [134, 476, 477] qui est composé d'éléments lipidiques (90%) et protéiques (10%) [478]. Parmi les lipides du surfactant, on retrouve la phosphatidylcholine (PC) principalement sous la forme dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) [479] dont la quantité augmente durant la dernière phase de gestation en réponse à une forte activité de synthèse [480, 481]. Chez l'humain, la phosphatidylcholine peut être synthétisée selon deux voies différentes [482]. La première voie est appelée : « voie Kennedy ». Dans le cytoplasme, la choline phosphate peut être estérifiée par une cytidine triphosphate (CTP) ce qui produit des diacylglycérol (DAG). Les DAG sont estérifiés à nouveau et forme la phosphatidylcholine. Dans cette voie, la synthèse est catalysée par la phosphocholine cytidylyltransférase (une éthanolamine phosphotransférase) suivie par la cholinephosphotransférase (CHPT1) [483, 484]. La deuxième voie, appelée « cycle de Lands », élimine les acides gras de la phosphatidylcholine via une phospholipase A2 (PLA2). La réaction enzymatique donne une lysophosphatidylcholine (LPC) qui est acétylée par des lysophosphatidylcholines acyltransférases (LPCATs) [485]. Parmi les enzymes impliquées dans la synthèse de phosphatidylcholine, on retrouve la cholinephosphotransférase qui est une enzyme de la famille des transférases. Elle a pour substrat la CDP-choline et la 1,2- diacylglycérol et catalyse la formation de phosphatidylcholine et de cytidine monophosphate (CMP). Une étude a démontré que l'activité de la cholinephosphotransférase augmentait durant les derniers stades du développement du poumon fœtal murin et présentait une activité maximale au jour de gestation 17.0 [486]. La même étude avait aussi démontré que, suite à un pic, l'activité de la cholinephosphotransférase diminuait jusqu'à JG 19. Les résultats de biopuces suggèrent que le gène *Chpt1* serait plus exprimé chez le mâle dans les cultures de cellules épithéliales comparativement à la femelle et que son expression augmenterait entre JG 17.5 et 18.5. Par contre, nos résultats de QPCR indiquent que le gène *Chpt1* est plus exprimé chez la femelle en étudiant les poumons complets. En supposant qu'il n'y ait pas de biais expérimental et que les résultats soient tous fidèles à la réalité, il serait possible d'expliquer tous ces résultats. En effet, si le poumon mâle a moins de cellules PTII matures que les femelles mais que les cellules PTII mâles expriment davantage le gène *Chpt1* que les PTII femelles, le fait de concentrer les cellules PTII lors de l'enrichissement des cellules pour la mise en culture aurait pu inverser la différence sexuelle apparente dans l'expression du gène. Des études récentes ont identifié la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1 et 2 (LPCAT1 et LPCAT2) comme étant des

enzymes clés du cycle de Lands [482]. Plusieurs études ont démontré que LPCAT1 jouait un rôle important dans la production du surfactant [487-490]. Contrairement à *Chpt1* dans la voie Kennedy, le gène *Lpcat2* est plus exprimé chez la femelle en JG 18.5. Il serait tentant de suggérer un rôle pour LPCAT2 dans la synthèse du surfactant, toutefois son rôle n'a pas encore été démontré.

Le gène *SLC34A2* a été décrit dans le contrôle de la réabsorption du phosphate dans le rein [491]. Il a été démontré que ce gène était fortement exprimé dans les cellules épithéliales de type II dans lesquelles il jouait un rôle important dans le transport du phosphate associé à la synthèse des phospholipides du surfactant [492]. Le gène *Slc34a2* était plus exprimé chez le mâle en JG 18.5 dans notre étude. L'expression plus importante chez le mâle de ce gène pourrait suggérer une activité de synthèse lipidique plus importante pour ce sexe au jour de gestation 18.5 qui pourrait mener à une augmentation de synthèse du surfactant en accord avec la régulation de *Chpt1*.

Les protéines du surfactant jouent un rôle important dans la structure, la fonction et le métabolisme du surfactant. Les protéines SFTPA, SFTPB, SFTPC et SFTPD entrent dans la composition du surfactant pulmonaire. En accord avec l'étude de Bresson *et al.* [380], les gènes encodant ces protéines montraient, dans la présente étude, des niveaux d'expression qui augmentaient en fonction du temps, mais sans différence sexuelle dans nos cultures. Le gène *STK40*, encodant une serine/thréonine kinase, est nécessaire à la maturation de l'épithélium alvéolaire [493]. En effet, les souris *Stk40*^{-/-} ont montré un niveau d'expression des gènes *Sftpa*, *Sftpb* et *Sftpc* plus bas que *Stk40*^{+/+} au jour de gestation 18.5, tandis que l'expression de *Sftpd* était plus forte pour le mutant que chez la souris *Stk40*^{+/+}. La maturation des cellules épithéliales de type I et de type II se trouvait retardée chez les souris *Stk40*^{-/-}. Par la suite, il a été démontré que l'inhibition de *Stk40* engendrait une modulation négative de l'activité de la voie de signalisation ERK/MAPK dans les cellules épithéliales pulmonaires. Cette régulation négative de la voie de signalisation ERK/MAPK était responsable de la diminution de l'expression des gènes encodant les protéines du surfactant [424, 493]. Dans notre étude, l'expression du gène *Stk40* diminuait en fonction du temps, mais ne présentait pas de différence sexuelle dans nos cultures. De nombreux gènes dans la voie de signalisation ERK/MAPK présentaient une différence sexuelle dans notre étude (voir

Figure 25). Contrairement à l'étude sur les souris *Stk40*^{-/-}, une diminution de l'expression de *Stk40* dans le poumon fœtal n'engendre pas de diminution dans l'expression des protéines du surfactant dans nos cultures cellulaires. La diminution de *Stk40* doit survenir après la maturation des PTII, c'est pour cette raison qu'il n'y a pas d'effet sur l'expression des protéines du surfactant.

Finally, studies conducted on the gene *Tgfb1* have demonstrated that it could inhibit fetal lung maturation by inhibiting communication between fibroblasts and PTII. This breakdown of cellular communication will prevent the expression of *Sftpa* and *Sftpc* in the lung [152, 309, 402, 494, 495]. The study by Bresson *et al.* [380] showed a higher expression of *Tgfb1* in the female compared to the male at JG 17.0. In our study, *Tgfb1* expression was higher in the female compared to the male on the whole tissue at JG 18.5 by qPCR. However, our result in culture does not go in the same direction as the qPCR analyses. The result is therefore questionable, and further studies in cell culture will be necessary to establish its real expression.

CHAPITRE V : Conclusion et Perspectives

V.1 Rétrospective des principales conclusions en fonction de nos hypothèses initiales

Les deux objectifs principaux de cette thèse de doctorat étaient de comparer les transcriptomes pulmonaire des cellules fibroblastiques en fonction du temps de gestation et du sexe fœtal chez la souris d'une part et de comparer les transcriptomes murins des cellules épithéliales pulmonaires en fonction temps de gestation et du sexe d'autre part. Nos hypothèses présumaient de l'existence d'une différence d'expression génique selon le sexe fœtal et le temps de gestation (17.5, 18.0 et 18.5) dans une période où la structure du poumon se modifie afin d'assurer les futurs échanges gazeux tout en préparant en parallèle la montée de synthèse du surfactant. Les modifications clés qui vont survenir à cette période vont permettre au poumon de gagner en autonomie respiratoire. Nos hypothèses de recherche ont été confirmées par nos résultats de biopuces ADN dans une étude à deux volets. Pour la première fois, il a été démontré qu'il existait une modulation temporelle et sexuelle de l'expression de plusieurs gènes dans des cultures primaires de cellules fibroblastiques et épithéliales isolées de poumons fœtaux murins obtenus à différents temps de gestation (17.5, 18.0 et 18.5). Les modulations d'expression impliquaient des gènes associés au développement et à la maturation pulmonaire. Pour l'analyse bioinformatique, nous avons comparé nos données avec celles de Bresson *et al.* [380], qui travaillaient sur le poumon complet. Dans notre étude, le tissu fibroblastique présentait le plus grand nombre de gènes régulés en fonction du temps. Dans cette première partie de l'étude, nous avons souligné l'importance des gènes *Lemd2*, *Sema3A* et *Cox-1 (Pghs1)*, dont nous avons discuté dans la section précédente. L'intérêt pour le premier gène réside dans sa capacité à réguler négativement la voie de signalisation PI3K/MAP kinase à l'origine de la signalisation de plusieurs gènes reconnus pour leur rôle essentiel dans la maturation du poumon fœtal. Les deux gènes suivants, *Sema3A* et *Cox-1*, jouent des rôles importants dans la différenciation des cellules épithéliales amenant à la maturation du poumon.

Nous avons ensuite pris en considération le sexe fœtal dans l'analyse des profils d'expression des gènes dans des cultures de fibroblastes et de cellules épithéliales. Nous avons été très surpris de constater que peu de gènes présentaient une différence sexuelle dans les cultures de fibroblastes et les cultures épithéliales au jour de gestation 17.5. Toutefois cette tendance s'est inversée 24h plus tard avec quelques milliers de gènes

modulés en fonction du sexe dans les cultures de cellules épithéliales (sans test FDR) et quelques centaines de gènes dans les cultures fibroblastiques (sans test FDR), témoignant d'une évolution rapide du tissu à cette période. Plusieurs gènes potentiellement intéressants dans le contexte du développement et de la maturation pulmonaire ont été identifiés et associés à différents processus biologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, les interactions cellulaires, le métabolisme des lipides et l'apoptose. Les techniques moléculaires à haut débit, tels que les biopuces ADN, nous permettent d'avoir une vue d'ensemble de la modulation de l'expression génique dans différents contextes et permettent d'obtenir une source substantielle de gènes candidats. Nous avons une image de plus en plus détaillée des joueurs impliqués dans les différents processus réglementant le développement et la maturation du poumon fœtal. Il n'en demeure pas moins que malgré le grand nombre de gènes présentant des différences sexuelles, peu de candidats semblent spécifiques au poumon. Toutefois, certains gènes et plusieurs voies de signalisation semblent être modulés en fonction du sexe dans notre étude. Le gène *Lif* et son récepteur montrent une expression modulée par le sexe, suggérant une pression de régulation influençant l'équilibre vers une diminution de la croissance du poumon chez le mâle, en accord avec la théorie sur le délai observé pour ce sexe. De façon surprenante on a observé que TGFβs et ses voies de signalisation suggéraient une diminution de l'activité proliférative chez le mâle mais on a aussi observé que les gènes de la voie de signalisation de FGF montraient une pression positive vers une stimulation de la croissance chez le mâle. Cette dynamique aux effets contraires illustre la complexité des régulations auxquelles fait face le poumon fœtal. Cependant, quelques gènes comme les BMPs et leur antagoniste *Noggin* ont montré une variation d'expression pouvant suggérer le déphasage d'une mécanique complexe. Au jour de gestation 18.5, l'expression de *Bmp* et de *Nog* est modulée en fonction de sexe. L'expression de *Bmp6* est supérieure chez la femelle ce qui suggère une augmentation de la différenciation cellulaire pour ce sexe, mais *Nog* est aussi surexprimé chez la femelle, ce qui pourrait bloquer la signalisation BMP. En revanche chez le mâle, *Bmp7* est plus exprimé et pourrait augmenter la différenciation des cellules. Ceci suggère que la différenciation des cellules épithéliales du poumon ne semble pas régulée de la même manière entre mâle et femelle.

Au début du stade sacculaire, la maturation est importante afin que le poumon puisse gagner en autonomie, notamment avec la montée de la synthèse du surfactant.

Dans ce sens, la famille de gènes IGFs et leurs voies de signalisation montraient une expression supérieure chez le mâle comparativement à la femelle, ce qui favoriserait la différenciation des cellules épithéliales chez le mâle et, par conséquent, tendrait vers une synthèse du surfactant à cette période de gestation. Nos banques de données de gènes dont l'expression varie en fonction du temps et/ou du sexe dans les cultures primaires issues de poumons fœtaux constituent une source d'information importante pour les études futures. L'approfondissement de nos connaissances pourra compter sur les analyses réalisées sur nos banques de données qui ont permis de cibler des gènes et des voies de signalisation dont l'expression est modulée selon le sexe fœtal et/ou le temps de gestation. Ces gènes sont les plus pertinents à caractériser dans le cadre de futures études.

V.2 Perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse de doctorat sont précurseurs de nouveaux projets de recherche allant vers la caractérisation de plusieurs gènes candidats et vers une validation des effets physiologiques. Dans les lignes qui vont suivre, je propose de passer de la théorie à la pratique avec quelques approches méthodologiques et quelques pistes d'investigation qui me semblent pertinentes pour la suite de mes travaux.

Dans nos deux études, quelques gènes pertinents ont fait l'objet d'une réflexion que nous avons portée à votre attention au chapitre précédent. D'un point de vue technique, les protocoles de cultures cellulaires pourraient être améliorés en terme de spécificité et de pureté des enrichissements en utilisant une approche de cytométrie en flux. De plus, un protocole d'hybridation in-situ pourrait nous permettre de confirmer dans quel type cellulaire sont exprimés certains gènes pour lesquels aucune donnée n'est disponible dans la littérature. Bien que beaucoup de gènes présentaient des différences d'expression en fonction du temps ou du sexe fœtal dans notre approche de biopuces, l'impact physiologique de ces variations d'expression doit être validé. Méthodologiquement, l'utilisation de siRNA in vitro sur des cultures ou in vivo via une inhalation intranasale chez la souris sont des suites possibles permettant de diminuer l'expression d'un gène [496-498]. Bien que plus dispendieux, l'utilisation de différents modèles de souris KO pour un ou des gènes candidats modulables par un système Cre/lox est une autre alternative d'intervention et permettrait de contourner le problème de récurrence des facteurs de croissance. Toutefois, ces différents facteurs étant rarement unique au poumon, l'utilisation de cette technique expose au problème de redondance des systèmes dans différents organes. Une nouvelle technique pourrait aussi s'avérer être une bonne alternative à l'étude de perte de fonction via la dégradation d'une séquence du gène cible par une caspase 9 liée à un ARN guide selon une technique de génie génétique appelée CRISPR-Cas9 [499]. Cette technique pourra par la suite être répliquée dans un modèle animal comme la souris, voire chez l'humain, puisque récemment il a été démontré que cet outil fonctionnait chez la souris et chez les primates [500-502]. L'ensemble de ces systèmes qui abordent tous une approche de « perte de fonction » via l'abrogation de l'expression génique peut dans certains cas être remplacé par une étude en culture impliquant l'ajout de la protéine (si elle est sécrétée)

encodée par le gène candidat. S'ajoutant à ces aspects, il serait intéressant d'exploiter les bases de données générées par nos études afin d'identifier de nouveaux gènes candidats dont le rôle au sein du poumon fœtal demeure aujourd'hui encore méconnu.

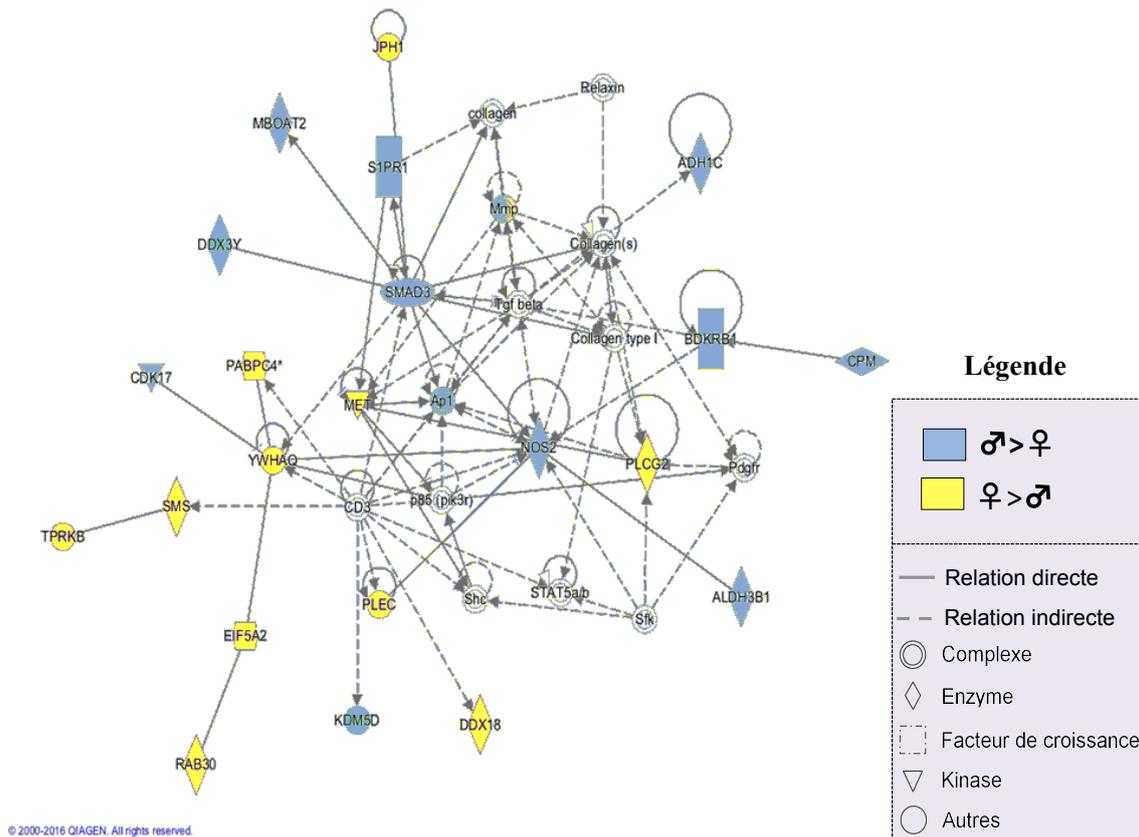


Figure 38 : Réseau interactif de gènes modulés selon le sexe fœtal dans le métabolisme des lipides. Réseau généré par l'IPA pour 22 gènes cibles modulés selon le sexe fœtal dans nos cultures épithéliales au jour de gestation 18.5 et que la littérature associe au métabolisme des lipides.

Dans nos études de transcriptomique, l'utilisation du programme Ingenuity Pathway Analysis a révélé plusieurs réseaux de régulation impliqués dans des processus auxquels participent des gènes identifiés ici comme étant modulés en fonction de temps ou du sexe. Prenons par exemple la Figure 38. L'ensemble de ces gènes épithéliaux sont des candidats potentiels pour leurs rôles dans le métabolisme des lipides. Nous connaissons le rôle de *Smad3* dans le poumon fœtal. Mais qu'en est-il des gènes qui sont en interaction directe ou indirecte avec lui ? Le gène *DDX3Y* encode une protéine capable de se lier à la protéine Smad3 [503]. Une étude récente a identifié *DDX3Y* comme un gène potentiellement marqueur de la maladie pulmonaire obstructive

chronique (MPOC) [504]. Toutefois, son rôle durant le développement fœtal n'a jamais été établi à ce jour. L'expression du gène *MBOAT2*, aussi connu sous le nom de *LPCAT4* (une famille de gènes dont nous avons parlé dans le chapitre IV), est diminuée chez les souris *Smad3*^{-/-} [505]. Quel est le rôle de *LPCAT4* dans le poumon en développement ? A ce jour, l'effet de *LPCAT4* reste à déterminer [490]. Finalement, il serait intéressant dans la mesure du possible de comparer notre banque de données de biopuces aux autres banques d'expression pulmonaire disponibles pour l'humain afin d'établir une correspondance.

Nos études ont permis d'orienter la recherche vers des gènes candidats et des processus fondamentaux pour lesquels des différences d'expression étaient identifiables tel que mentionné dans la conclusion. Afin d'approfondir nos études, nous pourrions commencer par l'étude des effets des siRNA dirigés contre l'ARNm *Sema3A* en cultures primaires de cellules épithéliales pulmonaires chez la souris. La modulation de *Sema3A* en fonction du temps lui prêterait un rôle de régulateur positif de la différenciation des cellules épithéliales. Puis dans un second temps, l'utilisation de siRNA permettant de bloquer le récepteur *Lifr* en cultures primaires de cellules fibroblastiques issues de poumons mâles permettrait d'approfondir le rôle de *Lif* et de sa signalisation dans la croissance du poumon fœtal chez la souris.

Au terme de ce travail, nos études ont pavé la voie au développement à long terme de cibles pharmacologiques qui aideront les deux sexes. Nous espérons que l'identification de ces joueurs clés et une meilleure compréhension des voies métaboliques plus spécifiquement impliquées dans le retard de maturation chez le mâle, permettront d'envisager un jour prochain une thérapie complémentaire adaptée selon le sexe de l'individu à naître.

La génomique au service d'une médecine personnalisée...

Bibliographie

1. Blencowe, H., et al., *National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications*. The Lancet, 2012. 379(9832): p. 2162-2172.
2. *Rapport sur la santé périnatale au Canada in Agence de la santé publique du Canada en ligne*. EDITION 2008.
3. OMS, *Aide-Mémoire N°363*. Novembre 2015.
4. Liu, L., et al., *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. The Lancet, 2012. 379(9832): p. 2151-2161.
5. Kelly, M.M., *The basics of prematurity*. J Pediatr Health Care, 2006. 20(4): p. 238-44.
6. Jon, E.T., M.D., M.P.H., Nehal A. Parikh, D.O., John Langer, M.S., Charles Green, Ph.D., and Rosemary D. Higgins, M.D., *Intensive Care for Extreme Prematurity — Moving Beyond Gestational Age*. N ENGL J MED, 2008. 358: p. 16.
7. *Textbook of Neonatal Resuscitation 6th edition*. 6th ed. 2011.
8. *The Nuffield Council on Bioethics T.Q.A. Journal*, Editor. 2006.
9. *Commission d'éthique de la Société Française de Néonatalogie* 2009.
10. Markel, T.A., et al., *Cytokines in necrotizing enterocolitis*. Shock, 2006. 25(4): p. 329-37.
11. Mukaida, N., *Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation*. International Journal Of Hematology, 2000. 72(4): p. 391-398.
12. Lin, P.W. and B.J. Stoll, *Necrotising enterocolitis*. The Lancet, 2006. 368(9543): p. 1271-1283.
13. Barbara, J.S., MD,^a Nellie I. Hansen, MPH,^b Edward F. Bell, MD,^c Seetha Shankaran, MD,^d Abbot R. Laptook, MD,^e Michele C. Walsh, MD, MS,^f Ellen C. Hale, RN, BS, CCRC,^a Nancy S. Newman, BA, RN,^f Kurt Schibler, MD,^g Waldemar A. Carlo, MD,^h Kathleen A. Kennedy, MD, MPH,ⁱ Brenda B. Poindexter, MD, MS,^j Neil N. Finer, MD,^k Richard A. Ehrenkranz, MD,^l Shahnaz Duara, MD,^m Pablo J. Sánchez, MD,ⁿ T. Michael O'Shea, MD, MPH,^o Ronald N. Goldberg, MD,^p Krisa P. Van Meurs, MD,^q Roger G. Faix, MD,^r Dale L. Phelps, MD,^s Ivan D. Frantz , III, MD,^t Kristi L. Watterberg, MD,^u Shampa Saha, PhD,^b Abhik Das, PhD,^v and Rosemary D. Higgins, MD, *Neonatal Outcomes of Extremely Preterm Infants From the NICHD Neonatal Research Network*. PEDIATRICS 2010. 126 (3).
14. Adams-Chapman, *Neurodevelopmental outcome of the late preterm infant*. Clinics In Perinatology, 2006. 33(4): p. 947-964.
15. Vassilyadi, M., et al., *Functional outcomes among premature infants with intraventricular hemorrhage*. Pediatr Neurosurg, 2009. 45(4): p. 247-55.
16. Finer, N.N., et al., *Summary proceedings from the apnea-of-prematurity group*. Pediatrics, 2006. 117(3 Pt 2): p. S47-51.
17. Copland, I.a.P., M, *Lung development and fetal lung growth*. PAEDIATRIC RESPIRATORY REVIEWS, 2004. 5(Suppl A): p. 259-264.
18. Zhao, J.T., J.Denise; Lee, Matt; Smith, Susan; Warburton, David, *Abrogation of betaglycan attenuates TGF-beta-mediated inhibition of embryonic murine*

- lung branching morphogenesis in culture*. . Mechanisms of Development, 1998. 75(1): p. 67-79.
19. James, A.L., MD*; Charles R. Bauer, MD; William Oh, MD; Sheldon B. Korones, MD ; Lu-Ann Papile, MD, Barbara J. Stoll, MD; Joel Verter, PhD; Marinella Tempresa, MS; and M.R.A.E. Linda L. Wright, MD; Avroy A. Fanaroff, MB, BCh ; Ann Stark, MD; Waldemar Carlo, MD; Jon E. Tyson, MD; Edward F. Donovan, MD; Seetha Shankaran, MD; and David K. Stevenson, MD, *Very Low Birth Weight Outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 Through December 1996*. PEDIATRICS, 2001. 107(1).
 20. Farrell, P., Avery ME., *Hyaline membrane disease*. Am Rev Respir Dis., 1975. 111(5):657-88.
 21. Hunter, L.A.M., D S.; Baptista, M A., *Comparison of lamellar body counts using light microscopy with standard coulter counter techniques to assess fetal lung maturity*. Gynecologic and Obstetric Investigation,, 2006. Vol. 61 (1): p. 29-33.
 22. Karcher, R., et al., *Gestational age-specific predicted risk of neonatal respiratory distress syndrome using lamellar body count and surfactant-to-albumin ratio in amniotic fluid*. Am J Obstet Gynecol, 2005. 193(5): p. 1680-4.
 23. Bahasadri, S.C., N, *Association between lamellar body count and respiratory distress in neonates*. Saudi medical journal, 2005. Vol. 26 (9): p. 1414.
 24. Liu, K.D., TC.; Mantsch, H H., *Prediction of RDS from amniotic fluid analysis- a comparison of the prognostic value of TLC and infra-red spectroscopy*. . Prenatal Diagnosis, 1998. Vol. 18 (12): p. 1267-1275
 25. Bazowska, G.J., A; Dudkiewicz, J, *Evaluation of amniotic fluid elastolytic activity: can it be a method of fetal lung maturity assessment? A comparison with Gluck's L/S test*. Acta geneticae medicae et gemellologiae, 1994. Vol. 43 (3-4): p. 185
 26. Gluck, L.E.K.M.H.L.S.M.V.K., *The biochemical development of surface activity in mammalian lung. I. The surface-active phospholipids; the separation and distribution of surface-active lecithin in the lung of the developing rabbit fetus*. Pediatric Research, 1967. Vol. 1 (4): p. 237.
 27. Gluck, L.M.S.M.V.K., *The Biochemical Development of Surface Activity in Mammalian Lung- II. The Biosynthesis of Phospholipids in the Lung of the Developing Rabbit Fetus and Newborn*. Pediatric Research, 1967. Vol. 1 (4)(247 (1967)): p. 247
 28. Shinitzky, M., Goldfisher A, Bruck A, Goldman B, Stern E, Barkai G, Mashiach S, Serr DM., *A new method for assessment of fetal lung maturity*. Br J Obstet Gynaecol. , 1976. 83(11): p. 838-844.
 29. Russell, J., *A calibrated fluorescence polarization assay for assessment of fetal lung maturity*. Clin Chem. , 1987. 33(7): p. 1177-1184.
 30. Herbert, W., Chapman JF, Schnoor MM., *Role of the TDx FLM assay in fetal lung maturity*. Am J Obstet Gynecol, 1993. 168(3 Pt 1): p. 808-12.
 31. Hagen, E.L., J C; Arias, F, *A comparison of the accuracy of the TDx-FLM assay, lecithin-sphingomyelin ratio, and phosphatidylglycerol in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome*. Obstetrics and gynecology, 1993. Vol. 82 (6): p. 1004

32. Haymond, S., et al., *A direct comparison between lamellar body counts and fluorescent polarization methods for predicting respiratory distress syndrome.* Am J Clin Pathol, 2006. 126(6): p. 894-9.
33. Liggins, G., *PREMATURE DELIVERY OF FOETAL LAMBS INFUSED WITH GLUCOCORTICOIDS.* Journal of Endocrinology, 1969. Vol. 45 (4): p. 515-523.
34. Liggins, G.C.H., R N, *A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants.* Pediatrics, 1972. Vol. 50 (4): p. 515
35. Saizou, C., et al., *Antenatal corticosteroids: benefits and risks.* Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction, 2005. 34(1): p. 111-117.
36. Roberts, D.D., S, *Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth.* The Cochrane database of systematic reviews,, 2006. No3(CD004454).
37. Sakonidou, S.D., J, *The management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants (European Consensus Guidelines—2013 update).* Archives of disease in childhood - Education & practice edition 2015. 100(5): p. 257-259.
38. Stutchfield, P., R. Whitaker, and I. Russell, *Antenatal betamethasone and incidence of neonatal respiratory distress after elective caesarean section: pragmatic randomised trial.* Bmj, 2005. 331(7518): p. 662.
39. Sweet, D.G.C., V; Greisen, G; Hallman, M; Ozek, E; Plavka, R; Saugstad, O D.; Simeoni, U; Speer, C P.; Vento, M; Halliday, H L., *European Consensus Guidelines on the Management of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants - 2013 Update.* Neonatology, 2013. 103 (4): p. 353-368.
40. Subtil, D.S., L; Dufour, P; Leclerc, G; Lesage-Claus, V; Codaccioni, X; Puech, F, *Twenty practical questions about prenatal corticosteroid therapy.* Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction, 1998. Vol. 27 (3): p. 298.
41. Brownfoot, F.G., DI; Bain, E; Middleton, P; Crowther, Ca, *Different corticosteroids and regimens for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth* COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS, 2013. N°8.
42. Adigun, A.A., et al., *Neonatal dexamethasone treatment leads to alterations in cell signaling cascades controlling hepatic and cardiac function in adulthood.* Neurotoxicol Teratol, 2010. 32(2): p. 193-9.
43. Jobe, A.H.I., M, *Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era.* . Annual review of physiology, 2000. Vol. 62: p. 825.
44. Wapner, R., *Antenatal corticosteroids: we continue to learn.* Am J Obstet Gynecol, 2004. 190(4): p. 875.
45. Mariotti, V., A.M. Marconi, and G. Pardi, *Undesired effects of steroids during pregnancy.* J Matern Fetal Neonatal Med, 2004. 16 Suppl 2: p. 5-7.
46. Eriksson, L., et al., *Short and long-term effects of antenatal corticosteroids assessed in a cohort of 7,827 children born preterm.* Acta Obstet Gynecol Scand, 2009. 88(8): p. 933-8.
47. Cavalieri, R.L. and W.R. Cohen, *Antenatal steroid therapy: have we undervalued the risks?* J Matern Fetal Neonatal Med, 2006. 19(5): p. 265-9.

48. French, N., et al., *Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1999. 180(1): p. 114-121.
49. Jobe, A.H., *Glucocorticoids, inflammation and the perinatal lung*. Semin Neonatol, 2001. 6(4): p. 331-42.
50. Goldsmith, J.P. and E.H. Karotkin, *Assisted Ventilation of the Neonate*. 2003: Saunders.
51. Cayabyab, R., Arora V, Wertheimer F, Durand M, Ramanathan R., *Graded oxygen saturation targets and retinopathy of prematurity in extremely preterm infants*. Pediatr Res., 2016. 10(1038/pr.2016.98).
52. Clyman, R., *Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants*. J Pediatr., 2004. 144(3): p. 408.
53. Askie, L., Henderson-Smart DJ, Irwig L, Simpson JM., *Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants*. N Engl J Med. , 2003. 349(10): p. 959-967.
54. Saugstad, O., *Oxygen for newborns: how much is too much?* J Perinatol., 2005. 25(Suppl.2): p. 45-49.
55. Thompson, A., Bhandari V., *Pulmonary Biomarkers of Bronchopulmonary Dysplasia*. Biomark Insights., 2008. 3: p. 361-373.
56. Cutz, E., Chiasson D., *Chronic lung disease after premature birth*. N Engl J Med., 2008. 358(7): p. 743-745.
57. Northway, W.J., Rosan RC, Porter DY., *Pulmonary Disease Following Respirator Therapy of Hyaline-Membrane Disease — Bronchopulmonary Dysplasia*. N Engl J Med. , 1967. 276(7): p. 357-368.
58. Schulzke, S., Pillow JJ., *The management of evolving bronchopulmonary dysplasia*. Paediatr Respir Rev, 2010. 11(3): p. 143-148.
59. Verma, R., Sridhar S, Spitzer AR., *Continuing care of NICU graduates*. Clin Pediatr (Phila), 2003. 42(4): p. 299-315.
60. Vrijlandt, E., Gerritsen J, Boezen HM, Duiverman EJ; Dutch POPS-19 Collaborative Study Group., *Gender differences in respiratory symptoms in 19-year-old adults born preterm*. Respir Res. , 2005. 6: p. 117.
61. Deakins, K., *Bronchopulmonary dysplasia*. Respir Care., 2009. 54(9): p. 1252-1262.
62. Shi, W., Bellusci S, Warburton D., *Lung development and adult lung diseases*. Chest, 2007. 132(2): p. 651-656.
63. Jensen, E., Schmidt B., *Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol., 2014. 100(3): p. 145-157.
64. Darlow, B., Graham PJ., *Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2002. 4: p. CD000501.
65. Van Marter, L., *Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia*. Curr Opin Pediatr, 2005. 17(2): p. 174-180.
66. Moya, F., *Synthetic surfactants: where are we? Evidence from randomized, controlled clinical trials*. J Perinatol, 2009. 29 Suppl 2: p. S23-8.
67. Almlen, A., et al., *Synthetic surfactant based on analogues of SP-B and SP-C is superior to single-peptide surfactants in ventilated premature rabbits*. Neonatology. 98(1): p. 91-9.
68. *Appareil Respiratoire*.

69. McMurtry, I., *Introduction: pre- and postnatal lung development, maturation, and plasticity*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2002. 282(3): p. 341-344.
70. Turksen, K., Troy TC., *Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6*. Development., 2002. 129(7): p. 1775-1984.
71. Burri, P.H.i.T.L.S.F.e.R.G.C., J. B. W., et al.). 1997: Raven Publishers, Philadelphia., 1013-1026.
72. Costa, R., Kalinichenko VV, Lim L., *Transcription factors in mouse lung development and function*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2001. 280 (5): p. 823-838.
73. Hislop, A., *Developmental biology of the pulmonary circulation*. Paediatr Respir Rev., 2005. 6(1): p. 35-43.
74. Kitaoka, H., Burri PH, Weibel ER., *Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips*. Anat Rec. , 1996. 244(2): p. 207-213.
75. Warburton, D., Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV., *The molecular basis of lung morphogenesis*. Mech Dev. , 2000. 92(1): p. 55-81.
76. Zoetis, T., Hurtt ME., *Species comparison of lung development*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol., 2003. 68(2): p. 121-124.
77. Seaborn, T., Simard M, Provost PR, Piedboeuf B, Tremblay Y., *Sex hormone metabolism in lung development and maturation*. Trends Endocrinol Metab., 2010. 21(12): p. 729-738.
78. Ten Have-Opbroek, A., *The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings*. Am J Anat. , 1981. 162(3): p. 201-219.
79. Warburton, D., El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, De Langhe S, Kemp PJ, Riccardi D, Torday J, Bellusci S, Shi W, Lubkin SR, Jesudason E., *Lung organogenesis*. Curr Top Dev Biol., 2010. 90: p. 73-158.
80. Bellusci, S., De Maximy A, Thiéry JP, *Contrôle moléculaire de la morphogénèse pulmonaire chez la souris*. Médecine/Sciences, 1999. 15: p. 815-822.
81. Crouch, E., Mecham RP, Davila RM, *Collagen and elastic fiber proteins in lung development*. 1 New York ed. 1997, In McDonald JA: Marcel Dekker.
82. Sannes, P., Wang J., *Basement membranes and pulmonary development*. Exp Lung Res., 1997. 23(2): p. 101-108.
83. Sugawara, T., Holt JA, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ, *Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(11): p. 4778-4782.
84. Delacourt, C., Jarreau PH, Bourbon J., *Normal and abnormal alveolar development*. Rev Mal Respir., 2003. 20(3 Pt 1): p. 373-383.
85. Cardoso, W., Stewart LG, Pinkerton KE, Ji C, Hook GE, Singh G, Katyal SL, Thurlbeck WM, Plopper CG., *Secretory product expression during Clara cell differentiation in the rabbit and rat*. Am J Physiol. , 1993. 264(6 Pt 1): p. 543-552.
86. Plopper, C., Alley JL, Serabjitsingh CJ, Philpot RM., *Cytodifferentiation of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell during rabbit lung maturation: an ultrastructural and morphometric study*. Am J Anat., 1983. 167(3): p. 329-357.

87. Rannels, S., Grove RN, Rannels DE., *Matrix-derived soluble components influence type II pneumocytes in primary culture.* Am J Physiol., 1989. 256(3 Pt 1): p. 621-629.
88. Cardoso, W., *Molecular regulation of lung development.* Annu Rev Physiol., 2001. 63: p. 471-494.
89. Hansen, S., Holm D, Moeller V, Vitved L, Bendixen C, Reid KB, Skjoedt K, Holmskov U., *CL-46, a novel collectin highly expressed in bovine thymus and liver.* J Immunol, 2002. 169(10): p. 5726-5734.
90. Burri, P., *Fetal and postnatal development of the lung.* Annu Rev Physiol., 1984. 46: p. 617-628.
91. Ware, L.B.M.D., and Matthay, MA. M.D., *The Acute Respiratory Distress Syndrome.* N Engl J Med 2000. 342: p. 1334-1349.
92. Prodhon, P., Kinane TB., *Developmental paradigms in terminal lung development.* Bioessays., 2002. 24(11): p. 1052-1059.
93. Chinoy, M., *Lung growth and development.* Front Biosci., 2003. 8: p. 392-415.
94. Adamson, I.Y.R.i.T.L.S.F.S.E.e.R.G. and J.B.W. Crystal, et al.). 1997, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia. 993-1001.
95. Brody, J., Kaplan NB., *Proliferation of alveolar interstitial cells during postnatal lung growth. Evidence for two distinct populations of pulmonary fibroblasts.* Am Rev Respir Dis., 1983. 127(6): p. 763-770.
96. Hashimoto, N., Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis.* J Clin Invest., 2004. 113(2): p. 243-252.
97. Pereira, R., O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ., *Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1998. 95(3): p. 1142-1147.
98. Phillips, R., Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis.* J Clin Invest., 2004. 114(3): p. 438-446.
99. Spees, J., Pociask DA, Sullivan DE, Whitney MJ, Lasky JA, Prockop DJ, Brody AR., *Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med. , 2007. 176(4): p. 385-394.
100. Awonusonu, F., Srinivasan S, Strange J, Al-Jumaily W, Bruce MC., *Developmental shift in the relative percentages of lung fibroblast subsets: role of apoptosis postseptation.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999. 277(4 Pt 1): p. 848-859.
101. Phipps, R., Penney DP, Keng P, Quill H, Paxhia A, Derdak S, Felch ME., *Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC.* Am J Respir Cell Mol Biol. , 1989. 1(1): p. 65-74.
102. Walker, G., Guerrero IA, Leinwand LA., *Myofibroblasts: molecular crossdressers.* Curr Top Dev Biol., 2001. 51: p. 91-107.
103. McGowan, S., Torday JS., *The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development.* Annu Rev Physiol., 1997. 59: p. 43-62.

104. Breen, E., Falco VM, Absher M, Cutroneo KR., *Subpopulations of rat lung fibroblasts with different amounts of type I and type III collagen mRNAs*. J Biol Chem., 1990. 265(11): p. 6286-6290.
105. Derdak, S., Penney DP, Keng P, Felch ME, Brown D, Phipps RP., *Differential collagen and fibronectin production by Thy 1+ and Thy 1- lung fibroblast subpopulations*. Am J Physiol., 1992. 263(2 Pt 1): p. 283-290.
106. Fabisiak, J., Absher M, Evans JN, Kelley J., *Spontaneous production of PDGF A-chain homodimer by rat lung fibroblasts in vitro*. Am J Physiol. , 1992. 263(2 Pt 1): p. 185-193.
107. Heine, U.M., Ef; Flanders, Kc; Roberts, AB; Sporn, MB, *Colocalization of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis*. . DEVELOPMENT, 1990. 109(1): p. 29-36.
108. Kelley, J., Fabisiak JP, Hawes K, Absher M., *Cytokine signaling in lung: transforming growth factor-beta secretion by lung fibroblasts*. Am J Physiol. , 1991. 260(2 Pt 1): p. 123-128.
109. Vivekananda, J., Lin A, Coalson JJ, King RJ., *Acute inflammatory injury in the lung precipitated by oxidant stress induces fibroblasts to synthesize and release transforming growth factor-alpha*. J Biol Chem, 1994. 269(40): p. 25057-25061.
110. Snead, M., Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don-Wheeler G, Bessem C, Bell GI, Rall LB, Slavkin HC., *Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development*. Dev Biol. , 1989. 134(2): p. 420-429.
111. Warburton, D., Seth R, Shum L, Horcher PG, Hall FL, Werb Z, Slavkin HC., *Epigenetic role of epidermal growth factor expression and signalling in embryonic mouse lung morphogenesis*. Dev Biol., 1992. 149(1): p. 123-133.
112. Moats-Staats, B., Price WA, Xu L, Jarvis HW, Stiles AD., *Regulation of the insulin-like growth factor system during normal rat lung development*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. 12(1): p. 56-64.
113. Wallen, L., Han VK., *Spatial and temporal distribution of insulinlike growth factors I and II during development of rat lung*. Am J Physiol., 1994. 267(5 Pt 1): p. 531-542.
114. Sonnenberg, E., Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C., *Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development*. J Cell Biol., 1993. 123(1): p. 223-235.
115. Reynolds, S., Malkinson AM., *Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium*. Int J Biochem Cell Biol., 2010. 42(1): p. 1-4.
116. Sirianni, F., Chu FS, Walker DC., *Human Alveolar Wall Fibroblasts Directly Link Epithelial Type 2 Cells to Capillary Endothelium*. Am J Respir Crit Care Med. , 2003. 168(12): p. 1532-1537.
117. Berthiaume, Y., Voisin G, Dagenais A., *The alveolar type I cells: the new knight of the alveolus?* J Physiol., 2006. 572(Pt 3): p. 609-610.
118. Schneeberger, E.E.i.T.L.S.F.S.E.e.R.G.C., J. B. W., et al.). 1997, Lippincott Raven, Philadelphia. 535-542.
119. Guidot, D., Folkesson HG, Jain L, Sznajder JI, Pittet JF, Matthay MA., *Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. , 2006. 291(3): p. 301-306.

120. Dobbs, L., Johnson MD, Vanderbilt J, Allen L, Gonzalez R., *The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms*. Cell Physiol Biochem., 2010. 25(1): p. 55-62.
121. Johnson, M., Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG., *Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002. 99(4): p. 1966-1971.
122. Yue, G., Russell WJ, Benos DJ, Jackson RM, Olman MA, Matalon S., *Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells on hyperoxic rats*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1995. 92(18): p. 8418-8422.
123. Farman, N., Talbot CR, Boucher R, Fay M, Canessa C, Rossier B, Bonvalet JP, *Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract*. Am J Physiol., 1997. 272(1 Pt 1): p. 131-141.
124. Talbot, C., Bosworth DG, Briley EL, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE, Barker PM., *Quantitation and localization of ENaC subunit expression in fetal, newborn, and adult mouse lung*. Am J Respir Cell Mol Biol., 1999. 20(3): p. 398-406.
125. Rooney, S., Young SL, Mendelson CR., *Molecular and cellular processing of lung surfactant*. FASEB J., 1994. 8(12): p. 957-967.
126. Strang, L., *Fetal lung liquid: secretion and reabsorption*. Physiol Rev., 1991. 71(4): p. 991-1016.
127. O'Brodovich, H., *Immature epithelial Na⁺ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome*. Proc Assoc Am Physicians., 1996. 108(5): p. 345-355.
128. Creuwels, L., van Golde LM, Haagsman HP., *The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects*. Lung., 1997. 175(1): p. 1-39.
129. Frerking, I., Günther A, Seeger W, Pison U., *Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options*. Intensive Care Med, 2001. 27(11): p. 1699-1717.
130. Dobbs, L., *Pulmonary surfactant*. Annu Rev Med. , 1989. 40: p. 431-446.
131. Daniels, C., Orgeig S., *Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing*. News Physiol Sci., 2003. 18: p. 151-157.
132. Johansson, J., Curstedt T, Robertson B., *The proteins of the surfactant system*. Eur Respir J., 1994. 7(2): p. 372-391.
133. Ikegami, M., Jobe AH., *Surfactant metabolism*. Semin Perinatol., 1993. 17(4): p. 233-240.
134. Goerke, J., *Lung surfactant*. Biochim Biophys Acta, 1974. 344(3-4): p. 241-261.
135. Veldhuizen, R., Possmayer F., *Phospholipid metabolism in lung surfactant*. Subcell Biochem., 2004. 37: p. 359-388.
136. Garbrecht, M., Klein JM, Schmidt TJ, Snyder JM., *Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system*. Biol Neonate., 2006. 89(2): p. 109-119.
137. Mallory, G.J., *Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life*. Paediatr Respir Rev., 2001. 2(2): p. 151-158.
138. Weaver, T., Conkright JJ., *Function of surfactant proteins B and C*. Annu Rev Physiol., 2001. 63: p. 555-578.

139. Orgeig, S., Hiemstra PS, Veldhuizen EJ, Casals C, Clark HW, Haczku A, Knudsen L, Possmayer F., *Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins*. Respir Physiol Neurobiol., 2010. 173 Suppl: p. 43-54.
140. Forbes, L., Haczku A., *SP-D and regulation of the pulmonary innate immune system in allergic airway changes*. Clin Exp Allergy., 2010. 40(4): p. 547-562.
141. Mason, R., *Biology of alveolar type II cells*. Respiriology., 2006. 11 Suppl: p. 12-15.
142. Jacobson, A., Sater AK., *Features of embryonic induction*. Development., 1988. 104(3): p. 341-359.
143. Melton, D., *Pattern formation during animal development*. Science., 1991. 252(5003): p. 234-241.
144. Minoo, P., King RJ, *Epithelial-mesenchymal interactions in lung development*. Annu Rev Physiol., 1994. 56: p. 13-45.
145. Rudnick, D., *Cellular Mechanics in Differentiation and Growth*, ed. P.L. Library. 1956: Princeton Legacy Library
146. Alescio, T., Cassini, A *Preliminary results on the induction exerted by mesenchyme on the epithelium in the organogenesis of the mouse lung*. Boll Soc Ital Biol Sper., 1962. 38: p. 1040-1043.
147. Alescio, T., Cassini, A *Induction in vitro of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium*. J Exp Zool., 1962. 150: p. 83-94.
148. Alescio, T., Cassini, A *Epithelio-mesenchymal interaction in the organogenesis of the embryonal lung of the mouse cultured in vitro*. Z Anat Entwicklungsgesch., 1962. 123: p. 369-396.
149. Demayo, F., Minoo P, Plopper CG, Schuger L, Shannon J, Torday JS., *Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2002. 283(3): p. 510-517.
150. White, A., Xu J, Yin Y, Smith C, Schmid G, Ornitz DM., *FGF9 and SHH signaling coordinate lung growth and development through regulation of distinct mesenchymal domains*. Development., 2006. 133(8): p. 1507-1517.
151. Smith, B., *Lung maturation in the fetal rat: acceleration by injection of fibroblast-pneumonocyte factor*. Science., 1979. 204(4397): p. 1094-1095.
152. Nielsen, H.C.K., C K.; Doyle, C A., *Development of fibroblast-type-II cell communications in fetal rabbit lung organ culture*. BBA - Molecular Cell Research, 1992. 1175(1): p. 95-99.
153. Dammann, C., Nielsen HC, Carraway KL 3rd., *Role of neuregulin-1 beta in the developing lung*. Am J Respir Crit Care Med., 2003. 167(12): p. 1711-1716.
154. Jaskoll, T., Don-Wheeler G, Johnson R, Slavkin HC., *Embryonic mouse lung morphogenesis and type II cytodifferentiation in serumless, chemically defined medium using prolonged in vitro cultures*. Cell Differ., 1988. 24(2): p. 105-117.
155. Warburton, D., Seth R, Shum L, Horcher PG, Hall FL, Werb Z, Slavkin HC., *Epigenetic role of epidermal growth factor expression and signalling in embryonic mouse lung morphogenesis*. Dev Biol., 1992. 149(1): p. 123-133.
156. Massagué, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem. 1998;67:753-91., 1998. 67: p. 753-791.
157. Shi, Y., Massagué J., *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell., 2003. 113(6): p. 685-700.

158. Grande, J., *Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair*. Proc Soc Exp Biol Med., 1997. 214(1): p. 27-40.
159. Guttentag, S., Robinson L, Zhang P, Brasch F, Bühling F, Beers M., *Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2003. 28(1): p. 69-79.
160. Heine, U., Munoz EF, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB., *Colocalization of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis*. Development., 1990. 109(1): p. 29-36.
161. Hill, C., *Signalling to the nucleus by members of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily*. Cell Signal., 1996. 8(8): p. 533-544.
162. Dijke, P., Hill CS., *New insights into TGF-beta-Smad signalling*. Trends Biochem Sci., 2004. 29(5): p. 265-273.
163. Andres-Pons, A., et al., *In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN*. Cancer Res, 2007. 67(20): p. 9731-9.
164. Stiles, B., et al., *PTENless means more*. Dev Biol, 2004. 273(2): p. 175-84.
165. Pardali, E., Goumans MJ, ten Dijke P., *Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease*. Trends Cell Biol., 2010. 20(9): p. 556-567.
166. McLennan, I., Poussart Y, Koishi K., *Development of skeletal muscles in transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) null-mutant mice*. Dev Dyn, 2000. 217(3): p. 250-256.
167. Bartram, U., Molin DG, Wisse LJ, Mohamad A, Sanford LP, Doetschman T, Speer CP, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC., *Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice*. Circulation., 2001. 103(22): p. 2745-2752.
168. Kaartinen, V., Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J., *Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction*. Nat Genet., 1995. 11(4): p. 415-421.
169. Shi, W., Heisterkamp N, Groffen J, Zhao J, Warburton D, Kaartinen V., *TGF-beta3-null mutation does not abrogate fetal lung maturation in vivo by glucocorticoids*. Am J Physiol., 1999. 277(6 Pt 1): p. 1205-1213.
170. Bragg, A., Moses HL, Serra R., *Signaling to the epithelium is not sufficient to mediate all of the effects of transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 4 on murine embryonic lung development*. Mech Dev., 2001. 190(1): p. 13-26.
171. Serra, R., Pelton RW, Moses HL, *TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures*. Development, 1994. 120(8): p. 2153-2161.
172. Zhao, J., Sime PJ, Bringas P Jr, Gauldie J, Warburton D., *Epithelium-specific adenoviral transfer of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor stimulates embryonic lung branching morphogenesis in culture and potentiates EGF and PDGF-AA*. Mech Dev., 1998. 72(1-2): p. 89-100.
173. Zhao, J., Bu D, Lee M, Slavkin HC, Hall FL, Warburton D., *Abrogation of transforming growth factor-beta type II receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture*. Dev Biol., 1996. 180(1): p. 242-257.

174. Komatsu, Y., Shibuya H, Takeda N, Ninomiya-Tsuji J, Yasui T, Miyado K, Sekimoto T, Ueno N, Matsumoto K, Yamada G., *Targeted disruption of the Tab1 gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis.* Mech Dev., 2002. 119(2): p. 239-249.
175. Chen, J., Lecuona E, Briva A, Welch LC, Sznajder JL., *Carbonic anhydrase II and alveolar fluid reabsorption during hypercapnia.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. 38(1): p. 32-37.
176. Li, D., Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP., *Defective angiogenesis in mice lacking endoglin.* Science. , 1999. 284(5419): p. 1531-1537.
177. Massagué, J.W., D., *Transcriptional control by the TGF-beta:Smad signaling system.* The EMBO Journal, 2000. 19(8): p. 1745-1754.
178. McAllister, K., Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al., *Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1.* Nat Genet., 1994. 8(4): p. 345-351.
179. McAllister, K., Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al., *Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1.* Nat Genet., 1994. 8(4): p. 345-351.
180. Sterner-Kock, A., Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H., *Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer.* Genes Dev., 2002. 16(17): p. 2264-2273.
181. Colarossi, C., Chen Y, Obata H, Jurukovski V, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB., *Lung alveolar septation defects in Ltbp-3-null mice.* Am J Pathol., 2005. 167(2): p. 419-428.
182. Chen, H., Sun J, Buckley S, Chen C, Warburton D, Wang XF, Shi W., *Abnormal mouse lung alveolarization caused by Smad3 deficiency is a developmental antecedent of centrilobular emphysema.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. , 2005. 288(4): p. 683-691.
183. Hemmati-Brivanlou, A., Thomsen GH., *Ventral mesodermal patterning in Xenopus embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4.* Dev Genet. , 1995. 17(1): p. 78-89.
184. Zou, H., Niswander L., *Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation.* Science., 1996. 272(5262): p. 738-741.
185. Stewart, A., Guan H, Yang K., *BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway.* J Cell Physiol., 2010. 223(3): p. 658-666.
186. Kobayashi, T., Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM., *BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2005. 102(50): p. 18023-18027.
187. Urist, M., *Bone: formation by autoinduction.* Science., 1965. 150(3698): p. 893-899.
188. Wozney, J., Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.* Science., 1988. 242(4885): p. 1528-1534.

189. Harrison, C., Al-Musawi SL, Walton KL., *Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- β superfamily ligands*. Growth Factors. , 2011. 29(5): p. 174-186.
190. Mueller, T., Nickel J., *Promiscuity and specificity in BMP receptor activation*. FEBS Lett. 586(14): p. 1846-1859.
191. Horbelt, D., Denkis A, Knaus P., *A portrait of transforming growth factor β superfamily signalling: background matters*. Int J Biochem Cell Biol. , 2012. 44(3): p. 469-474.
192. Wang, R.N., et al., *Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases*. Genes Dis, 2014. 1(1): p. 87-105.
193. Heldin, C., Moustakas A., *Role of Smads in TGF β signaling*. Cell Tissue Res. , 2012. 347(1): p. 21-36.
194. Corradini, E., Babitt JL, Lin HY., *The RGM/DRAGON family of BMP coreceptors*. Cytokine Growth Factor Rev., 2009. 20(5-6): p. 389-398.
195. Walsh, D., Godson C, Brazil DP, Martin F., *Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots*. Trends Cell Biol. , 2010. 20(5): p. 244-256.
196. Yao, D., Doré JJ Jr, Leof EB., *FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization*. J Biol Chem., 2000. 275(17): p. 13149-13154.
197. Toporsian, M., Jerkic M, Zhou YQ, Kabir MG, Yu LX, McIntyre BA, Davis A, Wang YJ, Stewart DJ, Belik J, Husain M, Henkelman M, Letarte M., *Spontaneous adult-onset pulmonary arterial hypertension attributable to increased endothelial oxidative stress in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(3): p. 509-517.
198. Derynck, R., Zhang YE., *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature., 2003. 425(6958): p. 577-584.
199. Yamaguchi, K., Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K., *Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGFbeta signal transduction*. Science., 1995. 270(5244): p. 2008-2011.
200. Zhang, Y., *Non-Smad pathways in TGF-beta signaling*. Cell Res., 2009. 19(1): p. 128-139.
201. Broege, A., Pham L, Jensen ED, Emery A, Huang TH, Stemig M, Beppu H, Petryk A, O'Connor M, Mansky K, Gopalakrishnan R., *Bone morphogenetic proteins signal via SMAD and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways at distinct times during osteoclastogenesis*. J Biol Chem, 2013. 288(52): p. 37230-37240.
202. Hogan, B., *Bone morphogenetic proteins in development*. Curr Opin Genet Dev. , 1996. 6(4): p. 432-438.
203. Bellusci, S., Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL., *Evidence from normal expression and targeted misexpression that Bone Morphogenetic Protein-4 (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis*. Development., 1996. 122(6): p. 1693-1702.
204. Bragg, A., Moses HL, Serra R., *Signaling to the epithelium is not sufficient to mediate all of the effects of transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 4 on murine embryonic lung development*. Mech Dev. , 2001. 109(1): p. 13-26.

205. Shi, W., Zhao J, Anderson KD, Warburton D., *Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 280(5): p. 1030-1039.
206. Weaver, M., Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL., *Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development*. *Development*, 1999. 126(18): p. 4005-4015.
207. Lu, M., Yang H, Zhang L, Shu W, Blair DG, Morrisey EE., *The bone morphogenic protein antagonist gremlin regulates proximal-distal patterning of the lung*. *Dev Dyn*, 2001. 222(4): p. 667-680.
208. Eblaghie, M.C., et al., *Evidence that autocrine signaling through Bmpr1a regulates the proliferation, survival and morphogenetic behavior of distal lung epithelial cells*. *Dev Biol*, 2006. 291(1): p. 67-82.
209. Sun, J., et al., *Prenatal lung epithelial cell-specific abrogation of Alk3-bone morphogenetic protein signaling causes neonatal respiratory distress by disrupting distal airway formation*. *Am J Pathol*, 2008. 172(3): p. 571-82.
210. Wodarz, A., Nusse R., *Mechanisms of Wnt signaling in development*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998. 14: p. 59-88.
211. Mucenski, M., Wert SE, Nation JM, Loudy DE, Huelsken J, Birchmeier W, Morrisey EE, Whitsett JA., *beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis*. *J Biol Chem*, 2003. 278(41): p. 40231-40238.
212. Leslie, K., Mitchell JJ, Woodcock-Mitchell JL, Low RB., *Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung*. *Differentiation*, 1990. 44(2): p. 143-149.
213. Leslie, K., Mitchell J, Low R., *Lung myofibroblasts*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1992. 22(2): p. 92-98.
214. Shu, W., Jiang YQ, Lu MM, Morrisey EE., *Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung*. *Development*, 2002. 129(20): p. 4831-4842.
215. Li, C., et al., *Wnt5a Participates in Distal Lung Morphogenesis*. *Developmental Biology*, 2002. 248(1): p. 68-81.
216. Li, C., et al., *Wnt5a regulates Shh and Fgf10 signaling during lung development*. *Dev Biol*, 2005. 287(1): p. 86-97.
217. De Langhe, S., Sala FG, Del Moral PM, Fairbanks TJ, Yamada KM, Warburton D, Burns RC, Bellusci S., *Dickkopf-1 (DKK1) reveals that fibronectin is a major target of Wnt signaling in branching morphogenesis of the mouse embryonic lung*. *Dev Biol*, 2005. 277(2): p. 316-331.
218. Yin, Y., et al., *An FGF-WNT gene regulatory network controls lung mesenchyme development*. *Dev Biol*, 2008. 319(2): p. 426-36.
219. Baron, R., Kneissel M., *WNT signaling in bone homeostasis and disease; from human mutations to treatments*. *Nat Med*, 2013. 19(2): p. 179-192.
220. Lebeche, D.M., S; Cardoso, Wellington V., *Fibroblast growth factor interactions in the developing lung*. *Mechanisms of Development*, 1999. 86(1): p. 125-136.
221. Weinstein, M., Monga SP, Liu Y, Brodie SG, Tang Y, Li C, Mishra L, Deng CX., *Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development*. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(15): p. 5122-5131.

222. Cardoso, W., Lü J., *Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies*. Development, 2006. 133(9): p. 1611-1624.
223. Horowitz, A., Simons M., *Branching morphogenesis*. Circ Res., 2008. 103(8): p. 784-795.
224. Thisse, B., Thisse C., *Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development*. Dev Biol., 2005. 287(2): p. 390-402.
225. Dailey, L., Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C., *Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling*. Cytokine Growth Factor Rev., 2005. 16(2): p. 233-247.
226. Thisse, B., Thisse C., *Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development*. Dev Biol., 2005. 287(2): p. 390-402.
227. Turner, N., Grose R, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nat Rev Cancer., 2010. 10(2): p. 116-129.
228. Warburton, D., Bellusci S, De Langhe S, Del Moral PM, Fleury V, Mailleux A, Tefft D, Unbekandt M, Wang K, Shi W., *Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis*. Pediatr Res., 2005. 57(5 Pt 2): p. 26-37.
229. Morrisey, E., Hogan BL., *Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development*. Dev Cell., 2010. 18(1): p. 8-23.
230. Bellusci, S., Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL., *Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung*. Development., 1997. 124(23): p. 4867-4878.
231. Park, W., Miranda B, Lebeche D, Hashimoto G, Cardoso WV., *FGF-10 is a chemotactic factor for distal epithelial buds during lung development*. Dev Biol., 1998. 201(2): p. 125-134.
232. Sekine, K., Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S., *Fgf10 is essential for limb and lung formation*. Nat Genet., 1999. 21(1): p. 138-141.
233. Panos, R., Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, Mason RJ., *Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor:scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium*. J Clin Invest., 1993. 92(2): p. 969-977.
234. Bellusci, S., Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL., *Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung*. Development, 1997. 124(23): p. 4867-4878.
235. Peters, K., Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, Williams L., *Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung*. EMBO J., 1994. 13(14): p. 3296-3301.
236. Hokuto, I., Perl AK, Whitsett JA, *Prenatal, but not postnatal, inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling causes emphysema*. J Biol Chem., 2003. 278(1): p. 415-421.
237. Hyatt, B., Shangguan X, Shannon JM., *BMP4 modulates fibroblast growth factor-mediated induction of proximal and distal lung differentiation in mouse embryonic tracheal epithelium in mesenchyme-free culture*. Dev Dyn., 2002. 225(2): p. 153-165.

238. Ramasamy, S., Mailleux AA, Gupte VV, Mata F, Sala FG, Veltmaat JM, Del Moral PM, De Langhe S, Parsa S, Kelly LK, Kelly R, Shia W, Keshet E, Minoo P, Warburton D, Bellusci S., *Fgf10 dosage is critical for the amplification of epithelial cell progenitors and for the formation of multiple mesenchymal lineages during lung development.* Dev Biol., 2007. 307(2): p. 237-247.
239. Litingtung, Y., Lei L, Westphal H, Chiang C., *Sonic hedgehog is essential for foregut development.* Nat Genet., 1998. 20(1): p. 58-61.
240. Pepicelli, C., Lewis PM, McMahon AP., *Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung.* Curr Biol, 1998. 8(19): p. 1083-1086.
241. Weaver, M., Dunn NR, Hogan BL., *Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis.* Development., 2000. 127(12): p. 2695-2704.
242. Cardoso, W., Itoh A, Nogawa H, Mason I, Brody JS., *FGF-1 and FGF-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium.* Dev Dyn, 1997. 208(3): p. 398-405.
243. Deterding, R., Jacoby CR, Shannon JM, *Acidic fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor stimulate fetal rat pulmonary epithelial growth.* Am J Physiol., 1996. 271(4 Pt 1): p. 495-505.
244. Guo, L., Degenstein L, Fuchs E., *Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing.* Genes Dev., 1996. 10(2): p. 165-175.
245. Colvin, J., White AC, Pratt SJ, Ornitz DM., *Lung hypoplasia and neonatal death in fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme.* Development., 2001. 128(11): p. 2295-2106.
246. Papadakis, K., Luks FI, De Paepe ME, Piasecki GJ, Wesselhoeft CW Jr., *Fetal lung growth after tracheal ligation is not solely a pressure phenomenon.* J Pediatr Surg., 1997. 32(2): p. 347-351.
247. Liu, Y., Hogan BL., *Differential gene expression in the distal tip endoderm of the embryonic mouse lung.* Gene Expr Patterns., 2002. 2(3-4): p. 229-233.
248. Liu, Y., Jiang H, Crawford HC, Hogan BL., *Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development.* Dev Biol., 2003. 261(1): p. 10-24.
249. Hashimoto, S., Nakano H, Singh G, Katyal S., *Expression of sprout and sprouty in developing rat lung.* Mech Dev. , 2002. 119(Suppl): p. 303-309.
250. Mailleux, A., Tefft D, Ndiaye D, Itoh N, Thiery JP, Warburton D, Bellusci S., *Evidence that SPROUTY2 functions as an inhibitor of mouse embryonic lung growth and morphogenesis.* Mech Dev, 2001. 102(1-2): p. 81-94.
251. Tefft, J., Lee M, Smith S, Leinwand M, Zhao J, Bringas P Jr, Crowe DL, Warburton D., *Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of Drosophila sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis.* Curr Biol., 1999. 25(9): p. 219-222.
252. Goodrich, L., Milenković L, Higgins KM, Scott MP., *Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants.* Science., 1997. 277(5329): p. 1109-1113.
253. Ingham, P., *Transducing Hedgehog: the story so far.* EMBO J., 1998. 17(13): p. 3505-3511.
254. Van Tuyl, M., Post M., *From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development.* Respir Res., 2000. 1(1): p. 30-35.

255. Urase, K., Mukasa T, Igarashi H, Ishii Y, Yasugi S, Momoi MY, Momoi T., *Spatial expression of Sonic hedgehog in the lung epithelium during branching morphogenesis*. Biochem Biophys Res Commun., 1996. 225(1): p. 161-166.
256. Grindley, J., Bellusci S, Perkins D, Hogan BL., *Evidence for the Involvement of the Gli Gene Family in Embryonic Mouse Lung Development*. Dev Biol., 1997. 188(2): p. 337-348.
257. Ingham, P., Fietz MJ., *Quantitative effects of hedgehog and decapentaplegic activity on the patterning of the Drosophila wing*. Curr Biol., 1995. 5(4): p. 432-440.
258. Marigo, V., Tabin CJ., *Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): p. 9346-9351.
259. Bellusci, S., Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL., *Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis*. Development. , 1997. 124(1): p. 53-63.
260. Moura, R.S., et al., *Expression analysis of Shh signaling members in early stages of chick lung development*. Histochem Cell Biol, 2016.
261. Bellusci, S., Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL., *Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis*. Development., 1997. 124(1): p. 53-63.
262. Litington, Y., Chiang C., *Control of Shh activity and signaling in the neural tube*. Dev Dyn., 2000. 219(2): p. 143-154.
263. Chuang, P., McMahon AP., *Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein*. Nature., 1999. 397(6720): p. 617-621.
264. Goodrich, L., Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP., *Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog*. Genes Dev., 1996. 10(3): p. 301-312.
265. Liu JP, B.J., Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A., *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)*. Cell., 1993. 75(1): p. 59-72.
266. Pichel, J., Fernández-Moreno C, Vicario-Abejón C, Testillano PS, Patterson PH, de Pablo F., *Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF-1*. Mech Dev. , 2003. 120(3): p. 349-361.
267. Moreno-Barriuso, N., López-Malpartida AV, de Pablo F, Pichel JG., *Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos*. Dev Dyn., 2006. 235(8): p. 2040-2050.
268. Silva, D., Venihaki M, Guo WH, Lopez MF., *Igf2 deficiency results in delayed lung development at the end of gestation*. Endocrinology., 2006. 147(12): p. 5584-5591.
269. Nagata, K., Masumoto K, Uesugi T, Yamamoto S, Yoshizaki K, Fukumoto S, Nonaka K, Taguchi T., *Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice*. Pediatr Surg Int. , 2007. 23(10): p. 953-959.
270. Ahamed, K., Epaud R, Holzenberger M, Bonora M, Flejou JF, Puard J, Clement A, Henrion-Caude A., *Deficiency in type 1 insulin-like growth factor receptor*

- in mice protects against oxygen-induced lung injury.* Respir Res., 2005. 8: p. 6-31.
271. Han, R.N.N.P., Martin; Tanswell, A Keith; Lye, Stephen J, *Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development.* American journal of respiratory cell and molecular biology, 2003. 28(2): p. 159-169.
 272. Price, W.A., *Pdgf-Bb Regulates Igf-Mediated Igfbp-4 Proteolysis in Fetal Lung Fibroblasts.* Experimental Lung Research, 2009. 27(8): p. 655-674.
 273. Gallagher, E., LeRoith D., *The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer.* Trends Endocrinol Metab, 2010. 21(10): p. 610-618.
 274. Liu, J.-P.B., J; Perkins, A S.; Robertson, E J.; Efstratiadis, A, *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r).* Cell, 1993. 75(1): p. 59-72.
 275. Roback, E.W.B., Amin J.; Dev, V. G.; Mbikay, Majambu; Chrétien, Michel; Butler, Merlin G, *An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1----qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene.* American Journal of Medical Genetics, 1991. 38(1): p. 74-79.
 276. Baker, J.L., J-P; Robertson, E J.; Efstratiadis, A, *Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth.* Cell, 1993. 75(1): p. 73-82.
 277. Epaud, R., Aubey F, Xu J, Chaker Z, Clemessy M, Dautin A, Ahamed K, Bonora M, Hoyeau N, Fléjou JF, Mailleux A, Clement A, Henrion-Caude A, Holzenberger M., *Knockout of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Impairs Distal Lung Morphogenesis.* PLoS One. , 2012. 7(11): p. 48071.
 278. Moreno-Barriuso, N., et al., *Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos.* Dev Dyn, 2006. 235(8): p. 2040-50.
 279. Powell-Braxton, L.H., P; Giltinan, D; Pitts-Meek, S; Stewart, T, *Inactivation of the IGF-I gene in mice results in perinatal lethality.* Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. 692(300-301): p. 300.
 280. Powell-Braxton, L., Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA., *IGF-I is required for normal embryonic growth in mice.* Genes Dev, 1993. 7(12B): p. 2609-2617.
 281. Nagata, K.M., K; Uesugi, T; Yamamoto, S; Yoshizaki, K; Fukumoto, S; Nonaka, K; Taguchi, T, *Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice.* Pediatric Surgery International, 2007. 23(10): p. 953-959.
 282. Maitre, B.C., A; Williams, MC; Brody, Js, *Expression of insulin-like growth factor receptors 1 and 2 in the developing lung and their relation to epithelial cell differentiation.* AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 1995. 13(3): p. 262-270.
 283. Narasaraju, T.A.C., H; Weng, T; Bhaskaran, M; Jin, N; Chen, J; Chen, Z; Chinoy, M R.; Liu, L, *Expression profile of IGF system during lung injury and recovery in rats exposed to hyperoxia: a possible role of IGF-1 in alveolar epithelial cell proliferation and differentiation.* Journal of Cellular Biochemistry, 2006. 97(5): p. 984-998.
 284. Dawson, J., Berger MB, Lin CC, Schlessinger J, Lemmon MA, Ferguson KM., *Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-*

- induced conformational changes in the dimer interface.* Mol Cell Biol., 2005. 25(17): p. 7734-7742.
285. Carpenter, G., Cohen S., *Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts.* J Cell Physiol., 1976. 88(2): p. 227-237.
 286. Wu, J., Adamson ED., *Inhibition of differentiation in P19 embryonal carcinoma cells by the expression of vectors encoding truncated or antisense EGF receptor.* Dev Biol., 1993. 159(1): p. 208-222.
 287. Wiley, L., Adamson ED, Tsark EC., *Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development.* Bioessays., 1995. 17(10): p. 839-846.
 288. Schuger, L., Johnson GR, Gilbride K, Plowman GD, Mandel R., *Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation.* Development., 1996. 122(6): p. 1759-1767.
 289. Seth, R., Shum L, Wu F, Wuenschell C, Hall FL, Slavkin HC, Warburton D., *Role of epidermal growth factor expression in early mouse embryo lung branching morphogenesis in culture: Antisense oligodeoxynucleotide inhibitory strategy.* Dev Biol., 1993. 158(2): p. 555-559.
 290. Sen, N., Cake MH., *Enhancement of disaturated phosphatidylcholine synthesis by epidermal growth factor in cultured fetal lung cells involves a fibroblast-epithelial cell interaction.* Am J Respir Cell Mol Biol., 1991. 5(4): p. 337-343.
 291. Nielsen, H., Martin A, Volpe MV, Hatzis D, Vosatka RJ., *Growth factor control of growth and epithelial differentiation in embryonic lungs.* Biochem Mol Med., 1997. 60(1): p. 38-48.
 292. Nielsen, H., *Epidermal growth factor influences the developmental clock regulating maturation of the fetal lung fibroblast.* Biochim Biophys Acta. , 1989. 1012(2): p. 201-206.
 293. Gross, I., Dynia DW, Rooney SA, Smart DA, Warshaw JB, Sissom JF, Hoath SB., *Influence of epidermal growth factor on fetal rat lung development in vitro.* Pediatr Res., 1986. 20(5): p. 473-477.
 294. Rosenblum, D., Volpe MV, Dammann CE, Lo YS, Thompson JF, Nielsen HC., *Expression and activity of epidermal growth factor receptor in late fetal rat lung is cell- and sex-specific.* Exp Cell Res., 1998. 239(1): p. 69-81.
 295. <http://www.pancreapedia.org>, *EGFR and other TyrK mediated growth factors Receptors*, E.a.o.T.m.g.f. Receptors, Editor. 2013.
 296. Kheradmand, F., Rishi K, Werb Z., *Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2.* J Cell Sci., 2002. 115(Pt 4): p. 839-848.
 297. Sanchez-Esteban, J., Wang Y, Gruppuso PA, Rubin LP., *Mechanical stretch induces fetal type II cell differentiation via an epidermal growth factor receptor-extracellular-regulated protein kinase signaling pathway.* Am J Respir Cell Mol Biol., 2004. 30(1): p. 76-83.
 298. Cao, Y., Cao R, Hedlund EM., *R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways.* J Mol Med (Berl), 2008. 86(7): p. 785-789.
 299. Shibuya, M., Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M., *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family.* Oncogene., 1990. 5(4): p. 519-524.

300. Terman, B., Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P., *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. Biochem Biophys Res Commun., 1992. 187(3): p. 1579-1586.
301. Boström, H., Willetts K, Pekny M, Levéen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellström M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C., *PDGF-A Signaling Is a Critical Event in Lung Alveolar Myofibroblast Development and Alveogenesis*. Cell., 1996. 85(6): p. 863-873.
302. Lindahl, P; Karlsson, L; Hellström, M; Gebre-Medhin, S; Willetts, K; Heath, J K; Betsholtz, C, *Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development*. . Development (Cambridge, England), 1997. 124(20): p. 3943.
303. Pauling, M., Vu TH., *Mechanisms and regulation of lung vascular development*. Curr Top Dev Biol., 2004. 64: p. 73-99.
304. Warburton, D., Bellusci S, Del Moral PM, Kaartinen V, Lee M, Tefft D, Shi W., *Growth factor signaling in lung morphogenetic centers: automaticity, stereotypy and symmetry*. Respir Res., 2003. 4(5).
305. Kasahara, Y., Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF., *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. J Clin Invest., 2000. 106(11): p. 1311-1319.
306. Oguchi, H., Kimura S., *Multiple transcripts encoded by the thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP)/thyroid-specific transcription factor-1 (TTF-1) gene: evidence of autoregulation*. Endocrinology. , 1998. 139(4): p. 1999-2006.
307. Kluth, D., Tenbrinck R, von Ekesparre M, Kangah R, Reich P, Brandsma A, Tibboel D, Lambrecht W., *The natural history of congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia in the embryo*. J Pediatr Surg., 1993. 28(3): p. 456-462.
308. Guilbert, T., Gebb SA, Shannon JM., *Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. , 2000. 279(6): p. 1159-1171.
309. Whitsett, J., Weaver TE, Lieberman MA, Clark JC, Daugherty C., *Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on synthesis of Mr = 35,000 surfactant-associated protein in fetal lung*. . J Biol Chem, 1987. 262(16): p. 7908-7913.
310. Kimura, S., Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ., *Thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary*. Genes Dev., 1996. 10(1): p. 60-69.
311. Ikeda, K., Shaw-White JR, Wert SE, Whitsett JA., *Hepatocyte nuclear factor 3 activates transcription of thyroid transcription factor 1 in respiratory epithelial cells*. Mol Cell Biol., 1996. 16(7): p. 3626-3636.
312. Shaw-White, J., Bruno MD, Whitsett JA., *GATA-6 activates transcription of thyroid transcription factor-1*. J Biol Chem., 1999. 274(5): p. 2658-2664.
313. Di Meglio, T., Kratochwil CF, Vilain N, Loche A, Vitobello A, Yonehara K, Hrycaj SM, Roska B, Peters AH, Eichmann A, Wellik D, Ducret S, Rijli FM.,

- Ezh2* orchestrates topographic migration and connectivity of mouse precerebellar neurons. *Science.*, 2013. 339(6116): p. 204-207.
314. Manley, N., Capecchi MR., *Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands.* *Dev Biol.*, 1998. 195(1): p. 1-15.
 315. Rousso, D., Gaber ZB, Wellik D, Morrisey EE, Novitch BG., *Coordinated actions of the forkhead protein Foxp1 and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons.* *Neuron.*, 2008. 59(2): p. 226-240.
 316. Wellik, D., Hawkes PJ, Capecchi MR., *Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction.* *Genes Dev.* , 2002. 16(11): p. 1423-1432.
 317. Xu, B., Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, Takeuchi JK, Jeannotte L, Gaber ZB, Novitch BG, Wellik DM., *Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb.* *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2013. 110(48): p. 19438-19443.
 318. Yallowitz, A., Hrycaj SM, Short KM, Smyth IM, Wellik DM., *Hox10 genes function in kidney development in the differentiation and integration of the cortical stroma.* *PLoS One.*, 2011. 6(8): p. 23410.
 319. Mallo, M., Wellik DM, Deschamps J., *Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan.* *Dev Biol.*, 2010. 344(1): p. 7-15.
 320. Boucherat, O., Montaron S, Bérubé-Simard FA, Aubin J, Philippidou P, Wellik DM, Dasen JS, Jeannotte L., *Partial functional redundancy between Hoxa5 and Hoxb5 paralog genes during lung morphogenesis.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2013. 304(12): p. 817-830.
 321. Aubin, J., Lemieux M, Tremblay M, Bérard J, Jeannotte L., *Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects.* *Dev Biol.*, 1997. 192(2): p. 432-445.
 322. Gudas, L., *Retinoids and vertebrate development.* *J Biol Chem.*, 1994. 269(22): p. 15399-15402.
 323. Liu, B., Harvey CS, McGowan SE., *Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures.* *Am J Physiol.*, 1993. 265(5 Pt 1): p. 430-437.
 324. Hind, M., Corcoran J, Maden M., *Temporal/spatial expression of retinoid binding proteins and RAR isoforms in the postnatal lung.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2002. 282(3): p. 468-476.
 325. Ong, D., Chytil F., *Changes in levels of cellular retinol- and retinoic-acid-binding proteins of liver and lung during perinatal development of rat.* *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1976. 73(11): p. 3976-3978.
 326. Massaro, D., Massaro GD., *Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2002. 282(3): p. 345-358.
 327. Massaro, G., Massaro D., *Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats.* *Am J Physiol.*, 1996. 270(2 Pt 1): p. 305-310.
 328. McGowan, S., Jackson SK, Jenkins-Moore M, Dai HH, Chambon P, Snyder JM., *Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers.* *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2000. 23(2): p. 162-167.
 329. Massaro, G., Massaro D, Chan WY, Clerch LB, Ghyselinck N, Chambon P, Chandraratna RA., *Retinoic acid receptor-beta: an endogenous inhibitor of*

- the perinatal formation of pulmonary alveoli*. *Physiol Genomics*, 2000. 4(1): p. 51-57.
330. Chailley-Heu, B., Chelly N, Lelièvre-Pégorier M, Barlier-Mur AM, Merlet-Bénichou C, Bourbon JR., *Mild vitamin A deficiency delays fetal lung maturation in the rat*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 21(1): p. 89-96.
 331. Motoyama, J., Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC., *Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus*. *Nat Genet.*, 1998. 20(1): p. 54-57.
 332. Qian, X., Costa RH., *Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting*. *Nucleic Acids Res.*, 1995. 23(7): p. 1184-1191.
 333. Bingle, C., Hackett BP, Moxley M, Longmore W, Gitlin JD., *Role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha and hepatocyte nuclear factor-3 beta in Clara cell secretory protein gene expression in the bronchiolar epithelium*. *Biochem J.*, 1995. 308(Pt 1): p. 197-202.
 334. Bohinski, R., Di Lauro R, Whitsett JA, *The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis*. *Mol Cell Biol.*, 1994. 14(9): p. 5671-5681.
 335. He, Y., Crouch EC, Rust K, Spaite E, Brody SL., *Proximal promoter of the surfactant protein D gene: regulatory roles of AP-1, forkhead box, and GT box binding proteins*. *J Biol Chem.* , 2000. 275(40): p. 31051-31060.
 336. Kalinichenko, V., Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC, Costa RH., *Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box f1 transcription factor*. *Dev Biol.*, 2001. 235(2): p. 489-506.
 337. Hackett, B., Brody SL, Liang M, Zeitz ID, Bruns LA, Gitlin JD., *Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995. 92(10): p. 4249-4253.
 338. Lee, R., Feinbaum RL, Ambros V., *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell.*, 1993. 75(5): p. 843-854.
 339. Dong, H., Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X., *MicroRNA: function, detection, and bioanalysis*. *Chem Rev*, 2013. 113(8): p. 6207-6233.
 340. He, L., Hannon GJ., *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet.*, 2004. 5(7): p. 522-531.
 341. Brown, D., Rahman M, Nana-Sinkam SP., *MicroRNAs in respiratory disease. A clinician's overview*. *Ann Am Thorac Soc.*, 2014. 8(11): p. 1277-1285.
 342. Johar, D., Siragam V, Mahood TH, Keijzer R., *New insights into lung development and diseases: the role of microRNAs*. *Biochem Cell Biol.*, 2015. 93(2): p. 139-148.
 343. Lü, J., Qian J, Chen F, Tang X, Li C, Cardoso WV., *Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2005. 334(2): p. 319-323.
 344. Lu, Y., Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL., *Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and*

- inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells.* Dev Biol., 2007. 310(2): p. 442-453.
345. Ventura, A., Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T., *Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters.* Cell., 2008. 132(5): p. 875-886.
 346. Bouhaddioui, W., Provost PR, Tremblay Y., *Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung.* Biol Sex Differ., 2016. 7(20).
 347. Lwebuga-Mukasa, J., *Matrix-driven pneumocyte differentiation.* Am Rev Respir Dis, 1991. 144(2): p. 452-457.
 348. Hilfer, S., *Morphogenesis of the lung: control of embryonic and fetal branching.* Annu Rev Physiol. , 1996. 58: p. 93-113.
 349. Lin, Y., Zhang S, Rehn M, Itäranta P, Tuukkanen J, Heljäsvaara R, Peltoketo H, Pihlajaniemi T, Vainio S., *Induced repatterning of type XVIII collagen expression in ureter bud from kidney to lung type: association with sonic hedgehog and ectopic surfactant protein C.* Development., 2001. 128(9): p. 1573-1585.
 350. Lin, H., Kaplow J, Jaye M, Hayman MJ., *Ligand-binding specificity of human fibroblast growth factor receptor-3 IIIc.* FEBS Lett., 1997. 411(2-3): p. 389-392.
 351. Ornitz, D., *FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development.* Bioessays., 2000. 22(2): p. 108-112.
 352. Sakai, T., Larsen M, Yamada KM., *Fibronectin requirement in branching morphogenesis.* Nature., 2003. 6942(423): p. 876-881.
 353. Gill, S., Pape MC, Khokha R, Watson AJ, Leco KJ., *A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis.* Dev Biol., 2003. 261(2): p. 313-323.
 354. Pollak, A., Birnbacher R., *Preterm male infants need more initial respiratory support than female infants.* Acta Paediatr. , 2004. 93(4): p. 447-448.
 355. Shanklin, D., *The sex of premature infants with hyaline membrane disease.* South Med J., 1963. 56: p. 1018-1022.
 356. Hack, M., Klein NK, Taylor HG., *Long-term developmental outcomes of low birth weight infants.* Future Child., 1995. 5(1): p. 176-196.
 357. Roberge, S., Lacasse Y, Tapp S, Tremblay Y, Kari A, Liu J, Fekih M, Qublan HS, Amorim MM, Bujold E., *Role of fetal sex in the outcome of antenatal glucocorticoid treatment to prevent respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis.* J Obstet Gynaecol Can., 2011. 33(3): p. 216-226.
 358. *Effect of antenatal dexamethasone administration on the prevention of respiratory distress syndrome.* Am J Obstet Gynecol., 1981. 141(3): p. 276-287.
 359. Torday, J., Nielsen HC, Fencl Mde M, Avery ME., *Sex differences in fetal lung maturation.* Am Rev Respir Dis., 1981. 123(2): p. 205-208.
 360. Nielsen, H., Zinman HM, Torday JS., *Dihydrotestosterone inhibits fetal rabbit pulmonary surfactant production.* J Clin Invest., 1982. 69(3): p. 611-616.
 361. Torday, J., *Androgens delay human fetal lung maturation in vitro.* Endocrinology., 1990. 126(6): p. 3240-3244.
 362. Rodriguez, A., Viscardi RM, Torday JS., *Fetal androgen exposure inhibits fetal rat lung fibroblast lipid uptake and release.* Exp Lung Res., 2001. 27(1): p. 13-24.

363. Nielsen, H., *Androgen Receptors Influence the Production of Pulmonary Surfactant in the Testicular Feminization Mouse Fetus*. J. Clin. Invest., 1985. 76: p. 177-181.
364. Levesque, B., Vosatka RJ, Nielsen HC., *Dihydrotestosterone stimulates branching morphogenesis, cell proliferation, and programmed cell death in mouse embryonic lung explants*. Pediatr Res., 2000. 47(4 Pt 1): p. 481-491.
365. Floros, J., Phelps DS, Taeusch HW., *Biosynthesis and in vitro translation of the major surfactant-associated protein from human lung*. J Biol Chem., 1985. 260(1): p. 495-500.
366. Klein, J., Nielsen HC., *Androgen regulation of epidermal growth factor receptor binding activity during fetal rabbit lung development*. J Clin Invest., 1993. 91(2): p. 425-431.
367. Nielsen, H., *Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development*. Proc Soc Exp Biol Med., 1992. 199(4): p. 446-452.
368. Mariani, T., Reed JJ, Shapiro SD., *Expression profiling of the developing mouse lung: insights into the establishment of the extracellular matrix*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2002. 26(5): p. 541-548.
369. Bonner, A., Lemon WJ, You M., *Gene expression signatures identify novel regulatory pathways during murine lung development: implications for lung tumorigenesis*. J Med Genet., 2003. 40(6): p. 408-417.
370. Kho, A., Bhattacharya S, Mecham BH, Hong J, Kohane IS, Mariani TJ., *Expression profiles of the mouse lung identify a molecular signature of time-to-birth*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2009. 40(1): p. 47-57.
371. Kho, A., Bhattacharya S, Tantisira KG, Carey VJ, Gaedigk R, Leeder JS, Kohane IS, Weiss ST, Mariani TJ., *Transcriptomic analysis of human lung development*. Am J Respir Crit Care Med., 2010. 181(1): p. 54-63.
372. Wade, K., Guttentag SH, Gonzales LW, Maschhoff KL, Gonzales J, Kolla V, Singhal S, Ballard PL., *Gene induction during differentiation of human pulmonary type II cells in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol. , 2006. 34(6): p. 727-737.
373. Kobayashi, S., Isotani A, Mise N, Yamamoto M, Fujihara Y, Kaseda K, Nakanishi T, Ikawa M, Hamada H, Abe K, Okabe M., *Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, Rhox5/Pem, at preimplantation stages*. Curr Biol., 2006. 16(2): p. 166-172.
374. Dewing, P., Shi T, Horvath S, Vilain E., *Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation*. Brain Res Mol Brain Res., 2003. 118(1-2): p. 82-90.
375. Nef, S., Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL, Vassalli JD., *Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development*. Dev Biol., 2005. 287(2): p. 361-377.
376. Yang, X., Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ., *Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice*. Genome Res, 2006. 16(8): p. 995-1004.
377. Simard, M., P.R. Provost, and Y. Tremblay, *Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumonocytes in fetal mouse lungs*. Reprod Biol Endocrinol, 2006. 4: p. 25.

378. Tondreau, M., Boucher E, Simard M, Tremblay Y, Bilodeau JF., *Sex-specific perinatal expression of glutathione peroxidases during mouse lung development*. Mol Cell Endocrinol., 2012. 355(1): p. 87-95.
379. Perni, S., Vardhana S, Kalish R, Chasen S, Witkin SS., *Clara cell protein 16 concentration in mid-trimester amniotic fluid: association with fetal gender, fetal G>A +38 CC16 gene polymorphism and pregnancy outcome*. J Reprod Immunol., 2005. 68(1-2): p. 85-90.
380. Bresson, E., Tommy Seaborn, Mélissa Côté, Geneviève Cormier, Pierre R Provost, Bruno Piedboeuf, and Y. Tremblay, *Gene expression profile of androgen modulated*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2010. 8(2).
381. Joss-Moore, L., Albertine KH, Lane RH., *Epigenetics and the developmental origins of lung disease*. Mol Genet Metab., 2011. 104(1-2): p. 61-66.
382. Sayed, D., Abdellatif M, *MicroRNAs in development and disease*. Physiol Rev., 2011. 91(3): p. 827-887.
383. Mujahid, S., Logvinenko T, Volpe MV, Nielsen HC., *miRNA regulated pathways in late stage murine lung development*. BMC Dev Biol, 2013. 13(13): p. 13.
384. Gortner, L., Shen J, Tutdibi E., *Sexual dimorphism of neonatal lung development*. Klin Padiatr. , 2013. 225(2): p. 64-69.
385. Ballard, P., *Hormonal regulation of pulmonary surfactant*. . ENDOCRINE REVIEWS, 1989. 10(2): p. 165-181.
386. Torday, S., John; Sanchez-Esteban, P., Juan; Rubin, P., L., *Paracrine mediators of mechanotransduction in lung development*. The American Journal of the Medical Sciences, 1998. 316(3): p. 205-208.
387. Floros, J.P., M; Kay, R M; Smith, B T, *Molecular basis for a pulmonary mesenchymal-epithelial interaction*. Progress in clinical and biological research, 1986. 217B: p. 333-337.
388. Post, M.F., J ; Smith BT, *Inhibition of lung maturation by monoclonal antibodies against fibroblast-pneumocyte factor*. Nature, 1984. 308(5956): p. 284-286.
389. Pelton, R.W.D., M E; Moses, H L; Hogan, B L, *In situ hybridization analysis of TGF:J3 RNA expression during mouse development- comparative studies with TGFbeta 1 and beta 2*. Development (Cambridge, England), 1990. 110(2): p. 609.
390. Pelton, R.J., MD; Perkett, Ea; Gold, LI; Moses, HL, *Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 mRNA and protein in the murine lung*. AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 1991. 5(6): p. 522-530.
391. Zhou, L., Dey CR, Wert SE, Whitsett JA., *Arrested Lung Morphogenesis in Transgenic Mice Bearing an SP-C-TGF-b1 Chimeric Gene*. . Developmental Biology, 1996. 175(2): p. 227-238.
392. Itoh, S., Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P., *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins*. . Eur J Biochem., 2000. 267(24): p. 6954-6967.
393. Attisano, L., Lee-Hoeflich ST., *The Smads*. Genome Biol., 2001. 2(8).
394. Attisano, L.S., C; Izzi, L; Labbé, E, *The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGF β and activin signalling*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001. 180(1): p. 3-11.

395. Bartram, U., Speer CP., *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease*. CHEST, 2004. 125(2): p. 754-765.
396. Zhao, Y., Young SL., J Biol Chem, 1996. 271(5): p. 2369-2372.
397. Xing, Y., et al., *Mechanisms of TGFbeta inhibition of LUNG endodermal morphogenesis: the role of TbetaRII, Smads, Nkx2.1 and Pten*. Dev Biol, 2008. 320(2): p. 340-50.
398. Datto, M., Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF., *Targeted Disruption of Smad3 Reveals an Essential Role in Transforming Growth Factor β -Mediated Signal Transduction*. . Mol Cell Biol, 1999. 19(4): p. 2495-2504.
399. Chow, J.Y., et al., *RAS/ERK modulates TGFbeta-regulated PTEN expression in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Carcinogenesis, 2007. 28(11): p. 2321-7.
400. Yanagi, S., et al., *Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice*. J Clin Invest, 2007. 117(10): p. 2929-40.
401. Beers, M., Solarin KO, Guttentag SH, Rosenbloom J, Kormilli A, Gonzales LW, Ballard PL., *TGF- β 1 inhibits surfactant component expression and epithelial cell maturation in cultured human fetal lung*. Am J Physiol., 1998. 275(5 Pt 1): p. 950-960.
402. Torday, J., Kourembanas S., *Fetal rat lung fibroblasts produce a TGF β homolog that blocks alveolar type II cell maturation*. Developmental Biology, 1990. 139(1): p. 35-41.
403. Shibamura, M., Kuroki T, Nose K., *Isolation of a Gene Encoding a Putative Leucine Zipper Structure That Is Induced by Transforming Growth Factor β 1 and Other Growth Factors*. J Biol Chem. , 1992. 267(15): p. 10219-10224.
404. Choi, S., Moon JH, Ahn YW, Ahn JH, Kim DU, Han TH., *Tsc-22 enhances TGF-beta signaling by associating with Smad4 and induces erythroid cell differentiation*. Mol Cell Biochem. , 2005. 271(1-2): p. 23-28.
405. Carbia-Nagashima, A. and E. Arzt, *Intracellular proteins and mechanisms involved in the control of gp130/JAK/STAT cytokine signaling*. IUBMB Life, 2004. 56(2): p. 83-8.
406. Heinrich, P., Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J. , 2003. 374(Pt 1): p. 1-20.
407. Auernhammer, C., Bousquet C, Chesnokova V, Melmed S., *SOCS Proteins-Modulators of Neuroimmunoendocrine Functions. Impact on Corticotroph LIF Signaling*. Ann N Y Acad Sci., 2000. 917(658-664): p. 658.
408. Metcalf, D., *The Unsolved Enigmas of Leukemia Inhibitory Factor*. Stem Cells, 2003. 21(1): p. 5-14.
409. Kritikou, E.A., *A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland*. Development, 2003. 130(15): p. 3459-3468.
410. Nogueira-Silva, C., et al., *Leukemia inhibitory factor in rat fetal lung development: expression and functional studies*. PLoS One, 2012. 7(1): p. e30517.

411. Bellusci, S., Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL., *Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung* . Development., 1997. 124(23): p. 4867-4878.
412. Acosta, J., Thébaud B, Castillo C, Mailleux A, Tefft D, Wuenschell C, Anderson KD, Bourbon J, Thiery JP, Bellusci S, Warburton D., *Novel mechanisms in murine nitrofen-induced pulmonary hypoplasia- FGF-10 rescue in culture*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. , 2001. 281(1): p. 250-257.
413. Moura, R.S., et al., *FGF signaling pathway in the developing chick lung: expression and inhibition studies*. PLoS One, 2011. 6(3): p. e17660.
414. Gonzalez, A., Hill DJ, Logan A, Maher PA, Baird A., *Distribution of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor-1 messenger RNA expression and protein presence in the mid-trimester human fetus*. Pediatr Res., 1996. 39(3): p. 375-385.
415. Han, R., Liu J, Tanswell AK, Post M., *Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Receptor- Immunolocalization Studies in Developing Rat Fetal Lung*. Pediatr Res., 1992. 31(5): p. 435-440.
416. Orr-Urtreger, A., Lonai P., *Platelet-derived growth factor-A and its receptor are expressed in separate, but adjacent cell layers of the mouse embryo*. Development., 1992. 115(4): p. 1045-1058.
417. Heldin, C., et al., *Platelet-derived growth factor: Isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes*. Kidney International, 1992. 41(3): p. 571-574.
418. Noskovicova, N., et al., *Platelet-derived growth factor signaling in the lung. From lung development and disease to clinical studies*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. 52(3): p. 263-84.
419. Lindahl, P., Karlsson L, Hellström M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, Betsholtz C., *Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development*. Development., 1997. 124(20): p. 3943-3953.
420. Betsholtz, C., Karlsson L, Lindahl P., *Developmental roles of platelet-derived growth factors*. Bioessays., 2001. 23(6): p. 494-507.
421. Grazul-Bilska, A.J., Ml; Bilski, Jj; Redmer, Da; Reynolds, Lp; Abdullah, A; Abdullah, Km, *Wound healing: The role of growth factors*. DRUGS OF TODAY, 2003. 39(10): p. 787-800.
422. Midgley, V.C. and L.M. Khachigian, *Fibroblast growth factor-2 induction of platelet-derived growth factor-C chain transcription in vascular smooth muscle cells is ERK-dependent but not JNK-dependent and mediated by Egr-1*. J Biol Chem, 2004. 279(39): p. 40289-95.
423. Murray-Rust, J., McDonald NQ, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA., *Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors*. Structure. , 1993. 1(2): p. 153-159.
424. Kling, D., Lorenzo HK, Trbovich AM, Kinane TB, Donahoe PK, Schnitzer JJ., *MEK-1:2 inhibition reduces branching morphogenesis and causes mesenchymal cell apoptosis in fetal rat lungs*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2002. 282(3): p. 370-378.
425. Jones, J.C., Dr, *Insulin-like growth factors and their binding proteins- biological actions*. ENDOCRINE REVIEWS, 1995. 16(1): p. 3-34.

426. Epaud, R., et al., *Knockout of insulin-like growth factor-1 receptor impairs distal lung morphogenesis*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e48071.
427. Retsch-Bogart, G.Z.M.-S., B M; Howard, K; D'Ercole, A J; Stiles, A D, *Cellular localization of messenger RNAs for insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and binding proteins during fetal rat lung development*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1996. 14(1): p. 61-69.
428. Liu, B., Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P., *Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis*. J Biol Chem, 2000. 275(43): p. 33607-33613.
429. Ruttenstock, E.D., T; Dingemann, J; Puri, P, *Downregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 and 5 in nitrofen-induced pulmonary hypoplasia*. Pediatric Surgery International, 2010. 26(1): p. 59-63.
430. Malpel, S., Mendelsohn C, Cardoso WV., *Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis*. Development, 2000. 127(14): p. 3057-3067.
431. Chetty, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD*. Pediatr Pulmonol, 2004. 37(2): p. 128-36.
432. Tapia, O., et al., *Nuclear envelope protein Lem2 is required for mouse development and regulates MAP and AKT kinases*. PLoS One, 2015. 10(3): p. e0116196.
433. Cantor, A.B. and S.H. Orkin, *Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins*. Semin Cell Dev Biol, 2005. 16(1): p. 117-28.
434. Huggins, G.S., et al., *Friend of GATA 2 physically interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-TF2 (COUP-TF2) and COUP-TF3 and represses COUP-TF2-dependent activation of the atrial natriuretic factor promoter*. J Biol Chem, 2001. 276(30): p. 28029-36.
435. You, L.R., et al., *Mouse lacking COUP-TFII as an animal model of Bochdalek-type congenital diaphragmatic hernia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(45): p. 16351-6.
436. Tran, P., Zhang XK, Salbert G, Hermann T, Lehmann JM, Pfahl M., *COUP Orphan Receptors Are Negative Regulators of Retinoic Acid Response Pathways*. Mol Cell Biol., 1992. 12(10): p. 4666-4676.
437. Clabby, M., Robison TA, Quigley HF, Wilson DB, Kelly DP., *Retinoid X receptor alpha represses GATA-4-mediated transcription via a retinoid-dependent interaction with the cardiac-enriched repressor FOG-2*. J Biol Chem, 2003. 278(8): p. 5760-5767.
438. Arceci, R., King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB., *Mouse GATA-4- a Retinoic Acid-Inducible GATA-Binding Transcription Factor Expressed in Endodermally Derived Tissues and Heart*. Mol Cell Biol. , 1993. 13(4): p. 2235-2246.
439. Ackerman, K.G., et al., *Fog2 is required for normal diaphragm and lung development in mice and humans*. PLoS Genet, 2005. 1(1): p. 58-65.
440. Arceci, R., King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB., *Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart*. Mol Cell Biol, 1993. 13(4): p. 2235-2246.

441. Huelsken, J., Birchmeier W., *New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(5): p. 547-553.
442. Tebar, M., Destrée O, de Vree WJ, Ten Have-Opbroek AA., *Expression of Tcf:Lef and sFrp and localization of b-catenin in the developing mouse lung*. *Mech Dev*, 2001. 109(2): p. 437-440.
443. Ghosh, M.C., et al., *Insulin-like growth factor-I stimulates differentiation of ATII cells to ATI-like cells through activation of Wnt5a*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. 305(3): p. L222-8.
444. Miller, J., Hocking AM, Brown JD, Moon RT., *Mechanism and function of signal transduction by the Wnt:b-catenin and Wnt:Ca2+ pathways*. *Oncogene*, 1999. 18(55): p. 7860-7872.
445. Becker, P.M., et al., *Semaphorin 3A contributes to distal pulmonary epithelial cell differentiation and lung morphogenesis*. *PLoS One*, 2011. 6(11): p. e27449.
446. Ito, T., Kagoshima M, Sasaki Y, Li C, Udaka N, Kitsukawa T, Fujisawa H, Taniguchi M, Yagi T, Kitamura H, Goshima Y., *Repulsive axon guidance molecule *Sema3A* inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung*. *Mech Dev*, 2000. 97(1-2): p. 35-45.
447. Tufro, A., et al., *Semaphorin3a inhibits ureteric bud branching morphogenesis*. *Mech Dev*, 2008. 125(5-6): p. 558-68.
448. Kagoshima, M., Ito T., *Diverse gene expression and function of semaphorins in developing lung: positive and negative regulatory roles of semaphorins in lung branching morphogenesis*. *Genes Cells*, 2001. 6(6): p. 559-571.
449. Margana, R., Boggaram V., *Functional analysis of surfactant protein B (SP-B) promoter. Sp1, Sp3, TTF-1, and HNF-3alpha transcription factors are necessary for lung cell-specific activation of SP-B gene transcription*. *J Biol Chem*, 1997. 272(5): p. 3083-3090.
450. Miyazono, K., Maeda S, Imamura T., *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. 16(3): p. 251-263.
451. Rosenzweig, B., Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K., *Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(17): p. 7632-7636.
452. de Caestecker, M., *The transforming growth factor-beta superfamily of receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(1): p. 1-11.
453. Yuan, B., Li C, Kimura S, Engelhardt RT, Smith BR, Minoo P., *Inhibition of Distal Lung Morphogenesis in *Nkx2.1(2/2)* Embryos*. *Dev Dyn*, 2000. 217(2): p. 180-190.
454. Minoo, P., *Transcriptional regulation of lung development- emergence of specificity*. *Respir Res.*, 2000. 1(2): p. 109-115.
455. Xu, K.N., E; Cohen, B L; Wang, W; Canty, A J; Danska, J S; Coultas, L; Rossant, J; Wu, M Y J; Piscione, T D; Nagy, A; Gossler, A; Hicks, GG; Hui, Chi-C; Henkelman, R M; Yu, L X; Sled, JG; Gridley, T; Egan, S E, *Lunatic Fringe-mediated Notch signaling is required for lung alveogenesis*. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 2010. 298(1): p. 45-46.
456. Ito, T., Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudo T, Guillemot F, Kageyama R, Kitamura H., *Basic helix-loop-helix transcription factors*

- regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium.* Development, 2000. 127(18): p. 3913-3921.
457. Kimble, J., Simpson P., *The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation.* Annu Rev Cell Dev Biol., 1997. 13: p. 333-361.
458. Greenwald, I., *LIN-12:Notch signaling- lessons from worms and flies.* Genes Dev, 1998. 12(12): p. 1751-1762.
459. Weinmaster, G., *Notch signaling: direct or what?* Curr Opin Genet Dev, 1998. 8(4): p. 436-442.
460. Weinmaster, G., Roberts VJ, Lemke G., *A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development.* Development., 1991. 113(1): p. 199-205.
461. Weinmaster, G., Roberts VJ, Lemke G., *Notch2- a second mammalian Notch gene.* Development, 1992. 116(4): p. 931-941.
462. Uyttendaele, H., Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J., *Notch4:int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene.* Development, 1996. 122(7): p. 2251-2259.
463. Bettenhausen, B., Hrabě de Angelis M, Simon D, Guénet JL, Gossler A., *Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta.* Development., 1995. 121(8): p. 2407-2418.
464. Luo, B., Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J., *Isolation and Functional Analysis of a cDNA for Human Jagged2, a Gene Encoding a Ligand for the Notch1 Receptor.* Mol Cell Biol, 1997. 17(10): p. 6057-6067.
465. Xu, K., Moghal N, Egan SE., *Notch signaling in lung development and disease.* Adv Exp Med Biol, 2012. 727: p. 89-98.
466. Taichman, D.B., et al., *Notch1 and Jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature.* Dev Dyn, 2002. 225(2): p. 166-75.
467. Herriges, M. and E.E. Morrisey, *Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ.* Development, 2014. 141(3): p. 502-13.
468. Zhang, M., Wang H, Teng H, Shi J, Zhang Y., *Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung.* Histochem Cell Biol., 2010. 134(4): p. 327-335.
469. Miller, L.A., et al., *Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung.* Dev Dyn, 2004. 231(1): p. 57-71.
470. Granström, E., Kumlin M., *Assay of thromboxane production in biological systems: reliability of TXB2 versus 11-dehydro-TXB2 as targets for measurement.* Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res., 1987. 17B: p. 587-594.
471. Smith, W., DeWitt DL, Garavito RM., *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.* Annu Rev Biochem., 2000. 69: p. 145-182.
472. Conner, C.E., R.W. Kelly, and R. Hume, *Regulation of prostaglandin availability in human fetal lung by differential localisation of prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin dehydrogenase.* Histochem Cell Biol, 2001. 116(4): p. 313-9.
473. Acarregui, M., Snyder JM, Mitchell MD, Mendelson CR., *Prostaglandins Regulate Surfactant Protein A (SP-A) Gene Expression in Human Fetal Lung in Vitro.* Endocrinology, 1990. 127(3): p. 1105-1113.

474. Ballard, P., Gonzales LW, Williams MC, Roberts JM, Jacobs MM., *Differentiation of type II cells during explant culture of human fetal lung is accelerated by endogenous prostanoids and adenosine 3',5'-monophosphate*. *Endocrinology*, 1991. 128(6): p. 2916-2924.
475. Tithof, P.K.R., Mary P; Guan, Wei; Elgayyar, Mona; Godkin, James D, *Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells*. *reproductive Biology and Endocrinology* 2007. 5(16): p. 16.
476. Batenburg, J., Longmore WJ, Klazinga W, van Golde LM., *Lysolecithin acyltransferase and lysolecithin: lysolecithin acyltransferase in adult rat lung alveolar type II epithelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1979. 573(1): p. 136-144.
477. Van Golde, L., *Metabolism of phospholipids in the lung*. *Am Rev Respir Dis*, 1976. 114(5): p. 977-1000.
478. Rooney, S., *The surfactant system and lung phospholipid biochemistry*. *Am Rev Respir Dis*, 1985. 131(3): p. 439-460.
479. King, R., Clements JA., *Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1972. 223(3): p. 715-726.
480. Brumley, G., Chernick V, Hodson WA, Normand C, Fenner A, Avery ME., *Correlations of Mechanical Stability, Morphology, Pulmonary Surfactant, and Phospholipid Content in the Developing Lamb Lung*. *J Clin Invest*, 1967. 46(5): p. 863-873.
481. Farrell, P., Zachman RD., *Induction of choline phosphotransferase and lecithin synthesis in the fetal lung by corticosteroids*. *Science*, 1973. 179(4070): p. 297-298.
482. Moessinger, C., Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C., *Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine*. *J Biol Chem*, 2011. 286(24): p. 21330-21339.
483. Kennedy, E., Weiss SB., *The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides*. *J Biol Chem*, 1956. 222(1): p. 193-214.
484. Henneberry, A., McMaster CR., *Cloning and expression of a human choline:ethanolaminephosphotransferase- synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine*. *Biochem J*, 1999. 339(Pt 2): p. 291-298.
485. Lands, W., *Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis*. *J Biol Chem*, 1958. 231(2): p. 883-888.
486. Oldenburg, V., van Golde LM., *Activity of cholinephosphotransferase, lysolecithin: lysolecithin acyltransferase and lysolecithin acyltransferase in the developing mouse lung*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. 441(3): p. 433-442.
487. Nakanishi, H., et al., *Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production*. *J Biol Chem*, 2006. 281(29): p. 20140-7.
488. Chen, X., et al., *Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(31): p. 11724-9.

489. Harayama, T., et al., *Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor*. J Biol Chem, 2008. 283(17): p. 11097-106.
490. Bridges, J.P., et al., *LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice*. J Clin Invest, 2010. 120(5): p. 1736-48.
491. Ikegami, M., A. Falcone, and J.A. Whitsett, *STAT-3 regulates surfactant phospholipid homeostasis in normal lung and during endotoxin-mediated lung injury*. J Appl Physiol (1985), 2008. 104(6): p. 1753-60.
492. Hashimoto, M., Wang DY, Kamo T, Zhu Y, Tsujiuchi T, Konishi Y, Tanaka M, Sugimura H., *Isolation and Localization of Type IIb Na:Pi Cotransporter in the Developing Rat Lung*. Am J Pathol., 2000. 157(1): p. 21-27.
493. Yu, H., et al., *Deletion of STK40 protein in mice causes respiratory failure and death at birth*. J Biol Chem, 2013. 288(8): p. 5342-52.
494. Whitsett, J., Budden A, Hull WM, Clark JC, O'Reilly MA., *Transforming growth factor-beta inhibits surfactant protein A expression in vitro*. Biochim Biophys Acta., 1992. 1123(3): p. 257-262.
495. Dammann, C., Ramadurai SM, McCants DD, Pham LD, Nielsen HC., *Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development*. Endocrinology, 2000. 141(8): p. 2923-2929.
496. Howard, K., Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F, Kjems J., *RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system*. Mol Ther. , 2006. 14(4): p. 476-484.
497. Massaro, D., Massaro GD, Clerch LB., *Noninvasive delivery of small inhibitory RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2004. 287(5): p. 1066-1070.
498. Yueksektag, G., Drechsel M, Rössner M, Schmidt C, Kormann M, Illenyi MC, Rudolph C, Rosenecker J., *Repeated siRNA application is a precondition for successful mRNA gammaENaC knockdown in the murine airways*. Eur J Pharm Biopharm., 2010. 75(3): p. 305-310.
499. Jinek, M., Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science., 2012. 337(6096): p. 816-821.
500. Mashiko, D., Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M., *Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes*. Dev Growth Differ., 2014. 56(1): p. 122-129.
501. Niu, Y.S., B; Cui, Y; Chen, Y; Wang, J; Wang, L; Kang, Y; Zhao, X; Si, W; Li, W; Xiang, Andy p; Zhou, J; Guo, X; Bi, Y; Si, C; Hu, B; Dong, G; Wang, H; Zhou, Z; Li, T; Tan, T; Pu, X; Wang, F; Ji, S; Zhou, Q; Huang, X; Ji, W; Sha, J, *Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos*. Cell, 2014. 156(4): p. 836-843.
502. Yen, S., Zhang M, Deng JM, Usman SJ, Smith CN, Parker-Thornburg J, Swinton PG, Martin JF, Behringer RR., *Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes*. Dev Biol. , 2014. 393(1): p. 3-9.

503. Brown, K., Ham AJ, Clark CN, Meller N, Law BK, Chytil A, Cheng N, Pietenpol JA, Moses HL., *Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF-beta1*. J Cell Biochem, 2008. 105(2): p. 596-611.
504. Yuan, Y., Shi YH, Gu WC., *Analysis of protein-protein interaction network in chronic obstructive pulmonary disease*. Genet Mol Res., 2014. 13(4): p. 8862-8869.
505. Matsubara, T., Tanaka N, Sato M, Kang DW, Krausz KW, Flanders KC, Ikeda K, Luecke H, Wakefield LM, Gonzalez FJ., *TGF- β -SMAD3 signaling mediates hepatic bile acid and phospholipid metabolism following lithocholic acid-induced liver injury*. J Lipid Res., 2012. 53(12): p. 2698-2707.