

MARC SIMARD

**DIFFÉRENCES SEXUELLES, ANDROGÈNES ET
GLUCOCORTICOÏDES DANS LE POU MON FŒTAL DURANT
UNE PÉRIODE GESTATIONNELLE TARDIVE QUI CHEVAUCHE
LA MONTÉE DE LA PRODUCTION DU SURFACTANT
PULMONAIRE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

Résumé

Le syndrome de détresse respiratoire (SDR) est plus fréquent chez les nouveau-nés de sexe masculin que féminin, alors que les androgènes et les glucocorticoïdes sont reconnus pour ralentir et accélérer, respectivement, la maturation pulmonaire. Premièrement, nous avons étudié les différences sexuelles dans le transcriptome pulmonaire fœtal chez la souris par une approche de micropuces d'ADN durant une fenêtre de gestation qui précède et inclut la montée de production du surfactant, qui est asynchrone entre femelles et mâles en défaveur de ces derniers. Quatre-vingt-huit transcrits présentant une différence sexuelle dans leur niveau d'expression aux jours gestationnels (JG) 15.5, 16.5 ou 17.5 ont été identifiés. Ils sont impliqués notamment dans la régulation et le métabolisme hormonal, l'apoptose, la régulation transcriptionnelle et le métabolisme des lipides et sont des candidats pour un rôle dans la maturation pulmonaire et la physiopathologie du SDR. Deuxièmement, l'expression des 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (17 β HSD) de types 2 et 5, qui sont respectivement impliquées dans l'inactivation et la synthèse des androgènes, et du récepteur des androgènes (AR) a été caractérisée dans des poumons fœtaux humains. Des relations entre les niveaux d'expression et l'âge gestationnel ont été observées. La 17 β HSD2 et le AR ont été co-localisés notamment dans l'épithélium, alors que la 17 β HSD5 a été localisée dans certaines cellules épithéliales. Le niveau protéique de AR a montré d'importantes différences interindividuelles. Ces résultats supportent l'existence d'un métabolisme local des androgènes et une régulation fine de l'occupation de AR dans les poumons fœtaux mâles et femelles durant la période où une naissance prématurée présente de hauts risques. Troisièmement, l'expression de gènes associés à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) a été quantifiée et localisée dans des poumons fœtaux murins aux JG 15.5, 16.5 et 17.5. La capacité de la corticolibérine (CRH) et de la corticotropine à stimuler l'expression d'enzymes de synthèse de glucocorticoïdes par le poumon fœtal a aussi été abordée, ainsi que la production de glucocorticoïdes. Différents profils d'expression ont été déterminés, l'incubation d'explants pulmonaires fœtaux en présence de CRH augmenta l'expression de la 21-hydroxylase, alors qu'une production de désoxycorticostérone a été détectée. Les modulations temporelles et spatiales observées suggèrent des rôles dans le développement pulmonaire pour des gènes associés à l'axe HPA.

Abstract

Respiratory distress syndrome (RDS) is more frequent in male neonates than female neonates. Androgens and glucocorticoids are known to delay and accelerate, respectively, the fetal lung maturation. Firstly, we studied the sex differences in the mouse fetal lung transcriptome during a gestational period that overlaps the surge of surfactant synthesis, which occurs earlier in females than in males. Using DNA microarrays, 88 transcripts showing a sex difference in expression at gestational days (GD) 15.5, 16.5, or 17.5 were identified. Those genes were associated to several functional categories, including hormone metabolism and regulation, apoptosis, transcriptional regulation, and lipid metabolism, and are candidates for roles in lung maturation and in the physiopathology of RDS. Secondly, the expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β HSD) type 2 and 5, which are respectively involved in androgen inactivation and synthesis, and of the androgen receptor (AR), was characterized in human fetal lungs. Statistically significant relationships between expression levels and gestational age were observed. In particular, 17 β HSD2 and AR were co-localized in epithelial cells, while 17 β HSD5 was localized in a subset of epithelial cells mostly in conducting zones. AR protein levels showed an important interindividual variability. The obtained results support the presence of a local androgen metabolism and a fine-tuning of AR occupancy in human male and female fetal lungs during a gestational period associated with high-risk premature birth. Thirdly, the expression of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis-related genes was quantified and localized in murine fetal lungs at GD 15.5, 16.5, and 17.5. Also, the capability of corticotropin-releasing hormone (CRH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) to stimulate the pulmonary expression of enzymes involved in the “adrenal” pathway of glucocorticoid synthesis was addressed, as well as the glucocorticoid production. Several distinct gene expression profiles were established, the incubation of fetal lung explants with CRH led to increased levels of 21-hydroxylase gene expression, whereas deoxycorticosterone accumulation was detected. The observed temporal and spatial modulations suggest roles for HPA axis-related genes in the developing lung.

Avant-Propos

Mon parcours de doctorant m'a évidemment amené à côtoyer plusieurs personnes que je souhaite remercier tout particulièrement.

J'adresse d'emblée un grand merci au Dr Yves Tremblay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à le remercier spécialement pour son travail acharné, sa patience, son enthousiasme et son ouverture d'esprit, ainsi que pour la confiance qu'il m'a portée. Je souhaite aussi remercier le Dr Pierre Provost, qui fut mon co-directeur de recherche, pour son implication, sa rigueur scientifique et son souci du détail.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe YT avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, soit Dre Renée Drolet, Julie Plante, Mélissa Côté, Dr Tommy Seaborn, Eric Boucher, Julie-Alexandra Moulin, Geneviève Cormier, Marie-Christine Gérard-Hudon, Audrey Devillers, Stéphanie Roberge, Dr Peimin Rong, Dre Eva Bresson et Dr Denis Nadeau. Je tiens à adresser une mention spéciale à ma chère amie Julie Plante, qui fut une formidable collègue, pour sa curiosité, sa pensée positive et son courage. Ce fut un honneur de travailler, d'échanger et d'évoluer avec ces gens, tant du point de vue scientifique que personnel. L'atmosphère amicale qui régnait (généralement) au laboratoire rendait assurément nos (souvent) longues heures d'expérimentation et de rédaction plus agréables.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'unité de recherche en ontogénie et reproduction, ainsi que les membres du centre de recherche en biologie de la reproduction (CRBR).

D'un côté plus personnel, je tiens à remercier...

...mes parents, Raymond Simard et Jocelyne Arcand, qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes études et qui m'ont inconditionnellement supporté dans mes projets.

...mes proches ami(e)s, avec qui les rencontres et discussions sont très précieuses.

...finalement, ma compagne Marie-Christine Roy, pour une panoplie de raisons que je résumerai en : Merci d'être là.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
CHAPITRE I.....	1
Introduction générale.....	1
1.1. La prématurité.....	2
1.1.1. État de maturation de différents organes lors d'une naissance prématurée.....	3
1.2. Le syndrome de détresse respiratoire.....	6
1.2.1. Les marqueurs cliniques de maturation pulmonaire.....	7
1.2.2. Approches thérapeutiques.....	8
1.3. Développement pulmonaire.....	9
1.3.1. Stades du développement pulmonaire.....	9
1.3.2. Facteurs régulant le développement pulmonaire.....	13
1.3.3. Le surfactant pulmonaire.....	17
1.4. Stéroïdogénèse.....	19
1.4.1. Voies métaboliques générales.....	19
1.4.2. La famille des 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases.....	22
1.4.2.1. Les différentes enzymes : types 1 à 14.....	22
1.4.2.2. La 17 β HSD2.....	28
1.4.2.3. La 17 β HSD5.....	32
1.5. Les récepteurs nucléaires.....	35
1.5.1. Les récepteurs nucléaires - général.....	35
1.5.1.1. Les différents domaines des récepteurs nucléaires.....	36
1.5.1.2. Les différentes isoformes d'ARNm des récepteurs stéroïdiens.....	37
1.5.1.3. Les corégulateurs des récepteurs nucléaires.....	38
1.5.2. Le récepteur des androgènes (AR).....	39
1.5.2.1. Aspects généraux.....	39
1.5.2.2. Corégulateurs de l'activation de la transcription par AR.....	41
1.5.2.3. Actions non-classiques des androgènes et de AR.....	44
1.5.2.4. Pathologies associées à AR.....	45
1.5.2.5. Modèles AR-KO.....	45
1.6. Différences sexuelles et androgènes dans le développement pulmonaire.....	46
1.6.1. Effets des androgènes sur la maturation pulmonaire.....	46
1.6.2. Hormones sexuelles en circulation fœtale.....	48
1.6.3. Enzymes stéroïdogéniques exprimées par le poumon fœtal.....	49
1.7. Les glucocorticoïdes dans le développement pulmonaire.....	54
1.7.1. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien – général.....	54
1.7.2. Le récepteur des glucocorticoïdes et son activité transcriptionnelle.....	55
1.7.3. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien au cours de la période fœtale.....	57

1.7.4. Effets des glucocorticoïdes sur le développement pulmonaire fœtal	58
1.7.5. Métabolisme pulmonaire des glucocorticoïdes par les 11 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2	63
1.7.6. Production et régulation extra-surrénalienne de glucocorticoïdes	65
1.8. Expression génique globale du poumon fœtal	66
1.9. Projet d'étude – présentation générale	68
1.9.1. Hypothèses	68
1.9.2. Objectifs	69

CHAPITRE II

Différences sexuelles au niveau du transcriptome pulmonaire fœtal chez la souris pendant une période gestationnelle chevauchant la maturation des cellules épithéliales de type II ..	71
2.1. Avant-propos	72
2.2. Résumé en français de l'étude	72
2.3. Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumocytes in fetal mouse lungs	74
2.4. Abstract	75
2.5. Background	76
2.6. Methods	77
2.6.1. Animals	77
2.6.2. RNA extraction	77
2.6.3. Preparation of probes	78
2.6.4. Microarray hybridization, scanning, and analysis	79
2.7. Results	80
2.7.1. Validation of data	80
2.7.2. Several genes of interest exhibiting no sex difference in expression	81
2.7.3. Genes with sexually dimorphic expression	81
2.8. Discussion	81
2.9. Conclusions	86
2.10. Competing interests	86
2.11. Authors' contributions	86
2.12. Acknowledgements	86
2.13. Figure Legends	88
2.14. Figures	89
2.15. Tables	92

CHAPITRE III

Les 17 β -hydroxystéroïdes de type 2 et de type 5 ainsi que le récepteur des androgènes dans le poumon fœtal humain	97
3.1. Avant-propos	98
3.2. Résumé en français de l'étude	99
3.3. Type 2 and 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and androgen receptor in human fetal lungs	100
3.4. Abstract	101
3.5. Introduction	102
3.6. Methods	103

3.6.1. Human Tissues.....	103
3.6.2. Quantitative real-time PCR and housekeeping gene stability evaluation.....	104
3.6.3. Protein extraction and Western blot analysis.....	105
3.6.4. Immunohistochemistry	106
3.6.5. RNA probe synthesis and in situ hybridization	107
3.6.6. Statistical analyses	108
3.7. Results.....	108
3.7.1. Evaluation of housekeeping gene stability in human fetal lung samples and normalization of QPCR data.....	108
3.7.2. Relative 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA levels in human fetal lungs at mid-late pregnancy and in adult lungs	109
3.7.3. Western blot analysis of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR proteins in human fetal lungs at mid-pregnancy.....	110
3.7.4. Localization of 17 β HSD2 mRNA and protein, and 17 β HSD5 and AR proteins in human fetal lungs at mid-pregnancy.....	110
3.8. Discussion.....	112
3.9. Acknowledgements.....	115
3.10. Figure legends.....	117
3.11. Figures	119
3.12. Tables.....	123

CHAPITRE IV	126
Expression de gènes associés à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien dans le poumon foetal murin tard en gestation	126
4.1. Avant-propos	127
4.2. Résumé en français de l'étude	127
4.3. Expression of genes related to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in murine fetal lungs in late gestation	129
4.4. Abstract.....	130
4.5. Background.....	131
4.6. Methods	133
4.6.1. Animals, housing, and fetal tissue preparation	133
4.6.2. RNA probes	133
4.6.3. In situ hybridization and immunohistochemistry	134
4.6.4. Quantitative real-time PCR and normalization with multiple housekeeping genes	134
4.6.5. Preparation of fibroblast- and epithelial cell-enriched cultures from fetal mouse lungs.....	135
4.6.6. Incubation of lung explants with CRH or ACTH	135
4.6.7. Steroidogenic activity measures	136
4.6.8. Statistical analysis.....	136
4.7. Results.....	137
4.7.1. Expression levels of HPA axis-related genes in male and female fetal mouse lungs	137
4.7.2. Expression sites of HPA axis-related genes in male and female fetal mouse lungs	138

4.7.3. Expression levels of HPA axis-related genes in primary cell cultures derived from fetal mouse lungs	139
4.7.4. Expression of Cyp21a1 and Cyp11b1 in fetal mouse lungs and fetal lung primary cell cultures	139
4.7.5. Incubation of fetal mouse lung explants in the presence of CRH or ACTH, and determination of glucocorticoid formation	140
4.8. Discussion	141
4.9. Conclusions	146
4.10. Competing interests	146
4.11. Authors' contributions	146
4.12. Acknowledgements	146
4.13. Figure legends	147
4.14. Figures	150
4.15. Tables	155
CHAPITRE V	157
Discussion	157
5.1. Discussion complémentaire au chapitre II	158
5.2. Discussion complémentaire au chapitre III	163
5.3. Discussion complémentaire au chapitre IV	169
CHAPITRE VI	173
Conclusion	173
6.1. Rétrospective des principaux résultats en fonction des hypothèses et objectifs du projet	174
6.2. Perspectives	176
CHAPITRE VII	180
7.1. Bibliographie	181
7.2. Annexe 1	206

Liste des tableaux

Tableau 1: Taux de survie des enfants selon l'âge gestationnel à la naissance.....	2
Tableau 2: Overview of the microarray data characteristics	92
Tableau 3: Differentially expressed genes in the lung according to sex at GDs 15.5, 16.5 and 17.5.....	93
Tableau 4: Several genes involved in lung development and expressed with no sex difference	96
Tableau 5: Analyzed genes, quantitative real-time PCR conditions, and housekeeping gene rankings according to their expression stability in human fetal lung samples	123
Tableau 6: Statistically significant correlations between mRNA expression level and gestational age, and between mRNA expression levels, for 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR in human fetal lung samples (n = 40; 24 males, 16 females).....	124
Tableau 7: Summary of localization results for 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR in human fetal lung samples	125
Tableau 8: Oligonucleotides and experimental parameters for QPCR, and oligonucleotides for in situ hybridization probe synthesis, for experiments in mouse fetal lungs	155
Tableau 9: Mean crossing point (cp) values of the amplified genes in mouse fetal lungs .	156

Liste des figures

Figure 1: Histologie du poumon de souris du stade pseudoglandulaire au stade alvéolaire	10
Figure 2: Aperçu général des voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes.....	20
Figure 3: Structures générales des androgènes et estrogènes et réactions des 17 β HSDs.....	24
Figure 4: Stades de développement pulmonaire chez l'humain (a) et la souris (b) en relation avec les niveaux de testostérone et d'estradiol en circulation fœtale et dans le poumon fœtal	49
Figure 5: Relative levels of SP-C gene expression on GDs 15.5, 16.5 and 17.5.....	88
Figure 6: Hierarchical clustering and expression profile of differentially expressed genes.	88
Figure 7: Hypothesis concerning the expression profile of some differentially expressed genes	88
Figure 8: 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA levels in human fetal and adult lungs....	117
Figure 9: Immunoblots of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and androgen receptor in human fetal lungs.....	117
Figure 10: Localization of 17 β HSD2 mRNA in human fetal lungs by in situ hybridization	117
Figure 11: Localization of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR proteins in human fetal lungs by immunohistochemistry.....	118
Figure 12: Relative mRNA expression levels of HPA axis-related genes in mouse fetal lungs.....	147
Figure 13: Distribution of <i>Crhr1</i> mRNA, <i>Pomc</i> mRNA, and immunoreactive (i) ACTH protein in mouse fetal lungs.....	147
Figure 14: Distribution of <i>Crh</i> , <i>Crhbp</i> , <i>Crhr2b</i> , <i>Mc2r</i> , and <i>Nr3c1</i> mRNAs in mouse fetal lungs.....	148
Figure 15: Relative mRNA expression levels of HPA axis-related genes in differential cell cultures derived from fetal mouse lungs.....	148
Figure 16: Effects of exogenous CRH or ACTH on expression levels of <i>Pomc</i> , <i>Star</i> , <i>Hsd3b1</i> , and <i>Cyp21a1</i> in mouse fetal lung explants.....	148

Liste des abréviations

- 3 α HSD** : 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase
3 β HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
11 β HSD : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
17 β HSD : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
 α -SMA : α -actine du muscle lisse (*α -smooth muscle actin*)
ACTH : Adrénocorticotropine ou adrénocorticolibérine (*Adrenocorticotropic hormone*)
ADN: Acide désoxyribonucléique
AR: Récepteur des androgènes (*Androgen receptor*)
ARNm: Acide ribonucléique messenger
AKR : Aldo-céto réductase (*Aldo-keto reductase*)
CCSP : Protéine des cellules sécrétoires de Clara (*Clara cell secretory protein*)
CRH : Corticolibérine (*corticotropin-releasing hormone*)
CRHBP : Protéine liante de CRH (*CRH-binding protein*)
CRH-R : Récepteur de CRH
Cyp11b1 : P450c11b1, 11 β -hydroxylase
DHEA : Déhydroépiandrostérone
DHT : Dihydrotestostérone
DPPC : Dipalmitoylphosphatidilcholine
E₂ : Estradiol
EGF : Facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor*)
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes (*Fibroblast growth factor*)
FPF : *Fibroblast-pneumocyte factor*
GR : Récepteur des glucocorticoïdes (*Glucocorticoid receptor*)
GRE : Élément de réponse aux glucocorticoïdes (*Glucocorticoid Responsive Element*)
HPA : Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (*Hypothalamic-pituitary-adrenal axis*)
IGF-1 : Facteur de croissance apparenté à l'insuline 1 (*Insulin-like growth factor 1*)
JG : Jour gestationnel
Kb : Kilobase
L : Lécithine
MC2R : Récepteur de l'ACTH (*Melanocortin type 2 receptor*)
MIA1: *Melanoma inhibitory activity ou cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein*
MMP : Métalloprotéase de la matrice extracellulaire (*matrix metalloprotease*)
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NRG-1 β : Neuréguline-1 β
P450c17 : 17 α -hydroxylase
P450c21 : 21-hydroxylase

P450scc : Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (*P450 cholesterol side chain cleavage*)

Pb : Paire de bases

PCR : *Polymerase chain reaction*

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)

PGE₂ : Prostaglandine E₂

POMC : Proopiomélanocortine (*Proopiomelanocortin*)

PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

PT : Pneumocyte

S : Sphingomyéline

SDR : Syndrome de détresse respiratoire

Shh : Sonic hedgehog

SP : Protéine du surfactant (*surfactant protein*)

StAR : *Steroidogenic acute regulatory protein*

T : Testostérone

TGF : Facteur de croissance transformant (*Transforming growth factor*)

Tie2 : Récepteur aux angiopoïétines (*tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*)

TIMP : Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéase (*Tissue inhibitor of matrix metalloprotease*)

VEGF : Facteur de croissance vasculaire endothéliale (*vascular endothelial growth factor*)

VEGFR : Récepteur du facteur de croissance vasculaire endothéliale (*vascular endothelial growth factor receptor*)

CHAPITRE I

Introduction générale

1.1. La prématurité

Une naissance survenant avant la 37^e semaine de grossesse est considérée prématurée [1]. On classe les enfants nés prématurément en trois grandes catégories : les prématurés nés avant 37 semaines de grossesse, les grands prématurés nés avant la 32^e semaine de grossesse et finalement, les très grands prématurés nés avant la 28^e semaine de grossesse. Au Québec, on estime qu'environ 8% des naissances vivantes sont survenues prématurément en 2004 : 7% entre la 32^e et la 36^e semaine de grossesse et 1,2% avant 32 semaines [2]. Le taux de survie des enfants en fonction de l'âge gestationnel à la naissance est présenté au tableau 1. Bien que la mortalité et la morbidité associées à la prématurité soient en baisse [3], le taux de naissances prématurées est à la hausse au Canada et dans la plupart des pays industrialisés. En effet, au Canada entre 1981 et 1994 le pourcentage d'enfants prématurés est passé de 6,3% à 6,8% de toutes les naissances [4], alors qu'il est passé de 7% en 1995 à 8,2% en 2004 [2], ce qui correspond à environ 30% d'augmentation en 25 ans. Cette augmentation du taux de naissances prématurés semble toutefois ralentir et se stabiliser, du moins aux États-Unis, depuis quelques années [5, 6]. Plusieurs facteurs augmentent le risque de donner naissance prématurément. Citons par exemple des complications maternelles et fœtales, un historique d'accouchement prématuré, la fécondation *in vitro*, une grossesse multiple, le sexe fœtal, un faible statut économique et l'utilisation de drogues [2]. Par ailleurs, la présence d'infection utérine et/ou d'inflammation est fréquente lors d'une naissance prématurée.

Tableau 1: Taux de survie des enfants selon l'âge gestationnel à la naissance

Âge gestationnel (semaines)	Estimation de la survie (%)
36+	≥99
32-35	98
28-31	90-95
27	87
26	80
25	54-76
24	26-52
23	11-30

Adapté de [7]

Une vision très intéressante sur le contexte de la prématurité est présentée par AH Jobe [8, 9] dans deux récents articles où il est discuté d'un concept stipulant que les enfants prématurés ne sont pas « normaux » s'ils se sont développés dans un contexte anormal, ce dernier ayant mené à une réponse biologique adaptative face à une naissance précoce à venir. En d'autres termes, qu'un enfant de 24 semaines « normal » n'est pas au même stade de maturation globale qu'un enfant né prématurément à 24 semaines, de par les différences au niveau du contexte gestationnel. Il est conclu que la survie « miracle » des très grands prématurés est reliée de manière plus importante à l'enfant lui-même, plutôt qu'aux avancées de la médecine sans lesquelles toutefois leur survie serait impossible.

1.1.1. État de maturation de différents organes lors d'une naissance prématurée

Une naissance prématurée entraîne diverses conséquences sur la physiologie du nouveau-né. La plus grande complication reliée à une naissance prématurée est sans aucun doute l'immatunité d'organes tels que la peau, les yeux, le cœur, le système digestif, le cerveau et notamment, le poumon. L'étude des situations physiopathologiques reliées à l'immatunité de ces systèmes concourt à l'élaboration de critères pour l'évaluation globale de l'état de l'enfant. Les principaux effets de la prématurité sur ces organes, avec une emphase sur le poumon, sont résumés ci-dessous.

L'immatunité de la peau est une cause potentielle de mortalité chez les enfants prématurés. En effet, la fonction de barrière protectrice de la peau n'est pas mature avant la 34^e semaine de grossesse, ce qui rend les enfants nés prématurément plus sujets aux infections, à la déshydratation, à un déséquilibre en électrolytes et à une faible thermorégulation. Minimalement trois composantes sont nécessaires à la maturation de la barrière épidermique : la formation de l'enveloppe cornée, l'extrusion de lipides ainsi que la mise en place des jonctions communicantes intercellulaires. Par ailleurs, un retard dans la formation et la maturation de la barrière cutanée a été observé chez le mâle comparativement à la femelle. Il a été suggéré que cette différence sexuelle soit sous l'influence des androgènes [10], ce qui est intéressant dans notre contexte.

La rétinopathie de la prématurité est une maladie proliférative de la vascularisation de la rétine chez les enfants prématurés. Elle est une cause majeure de non voyance chez les nouveau-nés et se caractérise par une prolifération anormale des tissus fibro-vasculaires de la rétine. Des concentrations anormales en oxygène en sont une cause importante. En effet, les niveaux d'oxygène varient constamment et ce sont probablement les variations d'hyperoxie à hypoxie qui causent la rétinopathie. Différents mécanismes reliés à l'angiogenèse sont étudiés dans ce contexte. Par exemple, les niveaux plasmatiques de facteurs de croissance vasculaire endothéliale et de leurs récepteurs (VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 et Tie2) ont été quantifiés chez les enfants prématurés en relation avec cette maladie proliférative et les résultats obtenus suggèrent que l'angiogenèse pathogénique de la rétine dans la rétinopathie de la prématurité est principalement menée par une synthèse locale de VEGF-A [11].

Au niveau cardiovasculaire, la persistance du canal artériel est la pathologie la plus fréquente chez les enfants prématurés. Cette anomalie est caractérisée par l'absence d'oblitération du canal artériel qui, au cours de la vie fœtale, permet la communication entre l'aorte et l'artère pulmonaire entraînant un shunt artério-veineux qui permet à 90% du sang circulant dans le ventricule droit de dévier la haute résistance du lit vasculaire pulmonaire. L'incidence de cette anomalie est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel, affectant plus de 60% des enfants nés avant la 28^e semaine de grossesse [12]. Chez l'enfant né à terme, la fermeture du canal commence quelques heures après la naissance et met environ 72 heures à se compléter. Elle se fait cependant plus lentement chez les prématurés. Il est reconnu que les prostaglandines, dont PGE₂, jouent un rôle essentiel dans le maintien de ce canal durant la vie fœtale [12]. Des inhibiteurs de cyclo-oxygénases sont d'ailleurs utilisés pour traiter cette pathologie [13]. De plus, l'augmentation de la tension en oxygène et la diminution de la sensibilité du canal artériel à PGE₂ facilitent sa fermeture.

Lors d'une naissance prématurée, l'enfant peut aussi souffrir d'insuffisance rénale. En effet, le débit sanguin rénal ainsi que la capacité de filtration des glomérules sont alors très faibles, la réabsorption de sodium est basse et on observe une incapacité à concentrer

l'urine [14]. Ces aspects deviennent très importants lors, par exemple, du dosage de médicaments à être administrés aux enfants prématurés.

L'entérocologie nécrosante est caractérisée par des lésions nécrosantes entraînant une perte de muqueuse qui sont susceptibles d'évoluer vers une perforation intestinale [15]. Environ 5% des enfants nés avant la 36^e semaine de grossesse en sont affectés, dont 50% risquent d'en mourir. Alors qu'à maturité le tractus gastro-intestinal joue un rôle de défense contre les invasions bactériennes, lors d'une naissance prématurée plusieurs fonctions épithéliales sont incomplètes ou absentes. De plus, le pH de l'acide gastrique initialement très élevé diminue selon le degré de maturation, alors que le mouvement péristaltique de l'intestin débute approximativement à la 34^e semaine de la grossesse. Un déficit du mucus produit par les cellules épithéliales favorise le développement d'une entérocologie nécrosante. L'immaturation de l'épithélium intestinal influence la fonction de jonctions communicantes ainsi que la sécrétion de certaines cytokines. Par exemple, une augmentation de la perméabilité épithéliale est provoquée par l'absence d'interaction entre les protéines occludines et claudines, alors que l'interleukine 8, plus fortement sécrétée par les cellules épithéliales immatures que matures, favorise la cascade inflammatoire d'une infection de type entérocologie nécrosante.

En clinique, le devenir neurologique de l'enfant est d'importance majeure. Les enfants prématurés sont fréquemment atteints d'une hémorragie intraventriculaire pouvant mener à l'hydrocéphalie [16]. Cette dernière consiste en une accumulation de liquide céphalorachidien dans les cavités des ventricules cérébraux ou entre les méninges. Le risque d'hydrocéphalie est relié à l'importance de l'hémorragie et la cause initiale semble être liée au blocage des canaux de réabsorption par un caillot sanguin. Une hydrocéphalie permanente peut résulter de la migration et de la déposition de fibroblastes et de collagène dans ces canaux. L'ischémie cérébrale et la leucomalacie périventriculaire sont aussi des complications cérébrales importantes pouvant survenir lors d'une naissance prématurée. De plus, une immaturité du système de contrôle respiratoire est fréquemment observé dans les cas de grande prématurité, rendant nécessaire le support respiratoire jusqu'à ce que ce mécanisme réflexe devienne fonctionnel [17].

Un des plus grands changements auquel le fœtus sera confronté à la naissance est le passage d'un environnement aqueux à un environnement gazeux, transition qui nécessite d'importantes adaptations morphologiques et fonctionnelles au niveau du poumon. En fin de grossesse, les mécanismes de maturation pulmonaire préparent le fœtus aux échanges gazeux. Les changements qui s'effectueront concernent principalement la conversion transitoire de l'épithélium de sécrétion en un épithélium d'absorption, la production du surfactant pulmonaire, l'amincissement des septa alvéolaires et du mésenchyme inter alvéolaire, la différenciation des pneumocytes de type I et II et la vascularisation du lit pulmonaire en réponse à l'alvéolisation. Parmi les affections respiratoires potentielles du nouveau-né prématuré, on note principalement le syndrome de détresse respiratoire, la détresse respiratoire transitoire (défaut dans la réabsorption des fluides pulmonaires), la dysplasie bronchopulmonaire, le syndrome d'aspiration du méconium et l'infection pulmonaire d'origine materno-foetale.

1.2. Le syndrome de détresse respiratoire

L'une des complications les plus courantes associée à la prématurité est le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né (SDR) ou maladie des membranes hyalines. Cette pathologie compte pour 75% des cas de mort précoce et des maladies pulmonaires chroniques chez les enfants nés prématurément [18]. L'immaturation pulmonaire est caractérisée par une déficience dans la synthèse et la production du surfactant, ce qui contribue à la détresse respiratoire du nouveau-né. En effet, le déficit en surfactant peut entraîner une atelectasie pulmonaire et par conséquent une réduction de la capacité pulmonaire. Les enfants les plus susceptibles de souffrir de déficience pulmonaire naissent entre la 24^e et la 28^e semaine de grossesse et ont un poids extrêmement faible à la naissance (≤ 1000 g) [19]. 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, de la plus légère à la plus sévère, 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 [20]. Plusieurs facteurs de risque sont associés au SDR. Mentionnons la prématurité, le diabète maternel, le sexe masculin, l'ethnicité blanche versus noire,

l'asphyxie périnatale ainsi que les grossesses multiples [3, 21-23]. Aussi, des facteurs génétiques jouent un rôle dans la détermination de la susceptibilité au SDR [24]. Par exemple, des différences raciales dans la susceptibilité au SDR sont associées à la distribution allélique des gènes des protéines du surfactant (SP) A et B [25, 26]. Une analyse des allèles de SP-A dans une population homozygote a démontré que le génotype SP-A ($6A^2/6A^2$) augmente la susceptibilité au SDR, tandis que le génotype SP-A ($6A^3/6A^3$) la réduit. Cependant, seuls les enfants nés avant la 32^e semaine de la grossesse sont affectés par cette variation allélique. De plus, la délétion du gène de SP-B mène à un patron de synthèse protéique alvéolaire létal [27].

1.2.1. Les marqueurs cliniques de maturation pulmonaire

Certains tests permettent d'évaluer l'état de maturation pulmonaire, afin de déterminer le niveau de préparation de l'enfant à la vie *ex utero*. Des facteurs produits et sécrétés par le poumon dans le liquide intra pulmonaire se retrouvent dans le liquide amniotique. En effet, il est possible de faire un décompte des corps lamellaires, qui sont sécrétés par les pneumocytes de type II, dans un échantillon de liquide amniotique pour estimer le niveau de maturation pulmonaire [28-30]. La lécithine (L) et la sphingomyéline (S) sont des phospholipides du surfactant qui se retrouvent dans le liquide amniotique dont les quantités relatives sont reliées au stade de maturation du poumon. La mesure du rapport L/S dans le liquide amniotique est un test de référence pour évaluer la maturation pulmonaire fœtale. Alors que L augmente avec la maturation tandis que S demeure stable, un rapport $L/S > 2$ indique qu'un SDR est peu probable chez le nouveau-né [31-33]. L'évaluation du rapport L/S peut se faire par chromatographie sur couche mince ou par spectroscopie infrarouge [34]. Une méthode alternative à la mesure du rapport L/S est l'utilisation d'un essai basé sur la dépolarisation par fluorescence. Ce test, qui utilise le rapport entre le surfactant et l'albumine, est toutefois sensible à la présence de matières retrouvées naturellement dans le liquide amniotique [28, 35-37]. Mentionnons finalement le phosphatidylglycérol qui peut être utile comme marqueur de maturation puisqu'il apparaît normalement dans le liquide amniotique vers la 35^e semaine de grossesse et que son niveau augmente vers les semaines 37 à 40 [38].

1.2.2. Approches thérapeutiques

Quelques thérapies améliorent significativement le pronostic respiratoire chez les nouveau-nés prématurés: la corticothérapie anténatale, l'administration de surfactant et la ventilation assistée sont les plus courantes.

La corticothérapie anténatale, dont l'efficacité a été démontrée dès les années 1970 [39], est utilisée chez les mères présentant des risques d'accouchement prématuré. Les glucocorticoïdes synthétiques qui sont utilisés en clinique sont dérivés de la structure moléculaire du cortisol et ont, comparativement aux glucocorticoïdes naturels, une durée d'action plus longue, une affinité supérieure pour le récepteur, une activité anti-inflammatoire plus importante et des propriétés minéralocorticoïdes réduites ou nulles. La bêtaméthasone et la dexaméthasone sont les glucocorticoïdes synthétiques les plus couramment utilisés en corticothérapie anténatale. La bêtaméthasone est priorisée, car les risques de leucomalacie périventriculaire sont moins élevés [40]. Bien que l'efficacité des traitements anténataux aux glucocorticoïdes soit reconnue, l'utilisation de doses multiples est encore controversée [40] et le meilleur moment d'administration l'est également [41]. Notons par ailleurs que certains enfants ne répondent pas à la thérapie anténatale [42]. De plus, ces traitements peuvent induire des changements au niveau de la morphologie pulmonaire (nombre réduit d'alvéoles, alvéoles plus grandes), pouvant résulter en maladies pulmonaires subséquentes.

Les enfants prématurés souffrent d'un déficit en surfactant endogène qui est traité par l'administration de surfactant exogène, un traitement couramment prodigué. L'administration de surfactant permet de réduire la pression nécessaire à l'ouverture des voies respiratoires, d'augmenter le volume pulmonaire, de prévenir le collapsus pulmonaire [43], en plus de stimuler la production endogène de surfactant. Des surfactants d'origines naturelle et synthétique sont utilisés. Ceux d'origine naturelle sont des dérivés bovins ou porcins qui contiennent les protéines hydrophobes du surfactant et les lipides qui engendrent la distribution du film superficiel dans les alvéoles [44]. Les surfactants synthétiques sont principalement composés de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et ne contiennent aucun autre phospholipide ou apoprotéine. Bien que les deux types de

surfactant soient efficaces dans la prévention et le traitement du SDR, il semble que les surfactants naturels, comparativement aux synthétiques, aient une action plus rapide, qu'ils diminuent le risque de pneumothorax et de mortalité [45] et qu'ils réduisent la durée de la ventilation assistée [40]. Malgré leur efficacité, les surfactants naturels peuvent mener à une réaction immunologique due à la présence de protéines étrangères. Le moment de l'administration est aussi un facteur-clé. En effet, un traitement précoce réduirait l'incidence de pneumothorax, de maladies pulmonaires chroniques et d'emphysème comparativement à un traitement plus tardif. La thérapie par surfactant a un effet bénéfique plus important si appliquée dès l'établissement du SDR [46].

L'utilisation de support respiratoire par ventilation mécanique est répandue dans le traitement de l'insuffisance respiratoire chez l'enfant prématuré. Cette pratique peut toutefois engendrer une inflammation chronique pouvant provoquer des changements physiologiques et morphologiques néfastes à la santé pulmonaire ultérieure de l'enfant. En effet, une concentration trop élevée en oxygène lors de la ventilation est associée à la rétinopathie de la prématurité et à une incidence accrue de dysplasie bronchopulmonaire [47, 48]. Des traitements émergents tels l'administration de substances antioxydantes comme la vitamine A [49] et l'enzyme superoxide dismutase [50] ont pour but de minimiser le stress oxydatif que subissent les prématurés. Une autre alternative potentielle serait de réduire l'inflammation pulmonaire en inhibant la métalloprotéase de la matrice extracellulaire 9 (MMP9), dont les niveaux sont élevés dans les cas de dysplasie bronchopulmonaire reliée à la ventilation [51].

1.3. Développement pulmonaire

1.3.1. Stades du développement pulmonaire

Chez l'humain, l'organogenèse pulmonaire débute environ 4 semaines après la conception et se poursuit jusqu'à l'âge de deux ans. Ce long processus développemental a été subdivisé en cinq stades histologiques principaux : embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire/microvasculaire. La figure 1 présente des coupes histologiques du poumon murin en fonction des différents stades, ainsi que les correspondances d'âges

gestationnels entre la souris et l'humain. Fait à noter, les périodes d'âges associées aux différentes étapes du développement pulmonaire sont sujettes à de légères variations selon les auteurs [18, 52-55]. De plus, précisons qu'il existe un certain chevauchement temporel entre les stades.

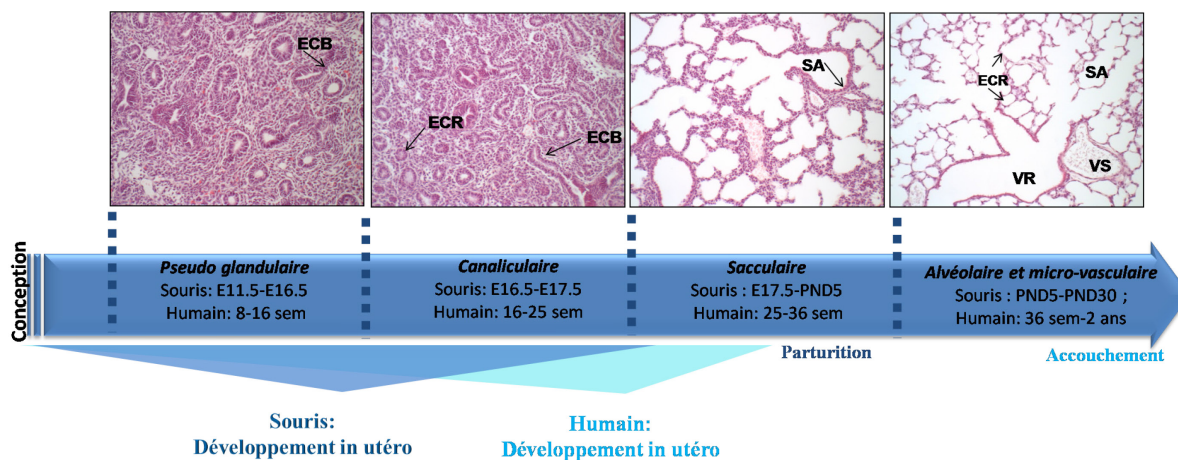


Figure 1: Histologie du poumon de souris du stade pseudoglandulaire au stade alvéolaire

ECB : épithélium des conduits bronchiques, ECR : épithélium des conduits respiratoires, SA : sac alvéolaire, VR : voie respiratoire, VS : vaisseau sanguin. Figure réalisée par Eric Boucher et adaptée par Julie Plante.

Le stade embryonnaire

La formation du sillon laryngotrachéal amorce le développement du poumon environ 28 jours après la conception. L'ébauche pulmonaire apparaît suite à la formation d'un bourgeon à la partie distale du sillon laryngotrachéal vers le 30^e jour post-conception. Il y a ensuite formation, à partir de ce bourgeon, de deux bourgeons bronchique primaires (33^e jour post-conception). Les bourgeons droit et gauche de l'ébauche pulmonaire sont morphologiquement différents. Le bourgeon droit est plus grand et s'étend parallèlement à l'œsophage, asymétrie qui persistera jusqu'à l'âge adulte. Chez l'humain, on retrouve trois lobes pulmonaires droits et deux lobes pulmonaires gauches, alors que chez la souris, on retrouve quatre lobes droits et un lobe gauche. Les bronches secondaires se forment après la division subséquente des bourgeons endodermiques. La fin de la période embryonnaire est caractérisée par la formation des segments des différents lobes pulmonaires.

Le stade pseudoglandulaire

Les voies de conduction de l'air, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales, sont formées durant ce stade. L'arbre bronchique sera constitué alors de 16 ramifications, bien que certaines études suggèrent que les bronchioles respiratoires (20^{ième} ramifications) seraient déjà formées à la fin du stade pseudo-glandulaire [54]. L'arbre trachéo-bronchique est initialement revêtu d'un épithélium à cellules prismatiques qui se différenciera éventuellement en cellules épithéliales ciliées et en cellules sécrétrices. Chez l'humain, l'apparition des premières cellules épithéliales ciliées a été détectée au cours de la 13^e semaine de grossesse. Au niveau des bronches pulmonaires, l'épithélium se différencie en cellules ciliées et en cellules gobelets et la sécrétion du liquide pulmonaire débute. Dès la 10^e semaine de grossesse survient l'apparition de cartilage et de cellules musculaires lisses dans les parois bronchiques. Puisque la différenciation pulmonaire se fait en direction centrifuge, certaines régions périphériques conservent un épithélium cubique peu différencié au-delà du stade pseudo-glandulaire. Ce processus est essentiel à la progression de l'arbre respiratoire dans le tissu conjonctif. À la fin de ce stade, on détecte au niveau de l'épithélium les précurseurs des pneumocytes.

Le stade canaliculaire

Cette étape du développement est caractérisée par l'élargissement et la division des voies aériennes, qui formeront les régions respiratoires proprement dites. Les bronchioles terminales donneront naissance aux canalicules qui formeront la partie respiratoire pulmonaire. Chaque bronchiole terminale formera un acinus qui comprendra plusieurs ramifications de bronchioles respiratoires. Celles-ci se prolongeront par un canal alvéolaire et donneront plus tardivement naissance aux sacs alvéolaires par bourgeonnement. Durant ce stade, quoique tardivement, on assiste notamment à la différenciation de l'épithélium respiratoire en deux types cellulaires distincts, c'est-à-dire les pneumocytes de type I et II (PTI et PTII) [56]. Un réarrangement des capillaires a aussi lieu au niveau du mésenchyme. Ce réseau de capillaires fera contact avec les PTI assurant ainsi la structure de base pour les futurs échanges gazeux. De plus, il y a un élargissement de la lumière des tubules et un aplatissement d'une partie des cellules épithéliales, alors que les PTII cubiques vont se

différencier en PTI pavimenteuses. Par ailleurs, la sécrétion du surfactant pulmonaire par les PTII débute à ce stade, parallèlement à l'augmentation de la surface des voies aériennes [56].

Le stade sacculaire

Durant ce stade, on assiste à l'élargissement des espaces aériens périphériques aboutissant à la formation de saccules qui formeront le parenchyme pulmonaire primitif. Les sacs alvéolaires se formeront au niveau des parties terminales de l'arbre respiratoire. Ainsi, à l'extrémité distale de chaque division terminale se forment les sacs alvéolaires, dont l'épithélium est composé de PTI et PTII. Les saccules sont séparées les unes des autres par des septa qui sont encore relativement épais à ce stade du développement. Ils contiennent deux réseaux vasculaires distincts reliés entre eux par diverses connexions. À ce stade, le mésenchyme des septa est riche en cellules, par contre, le contenu de l'interstitium est encore pauvre en élastine et en collagène [56]. La population fibroblastique est responsable de la production de la matrice extracellulaire. Elle a aussi un rôle dans la différenciation des cellules épithéliales et contrôle la production du surfactant par les PTII par l'intermédiaire de diverses molécules [55, 57, 58]. À la fin de ce stade, les fibroblastes interstitiels forment des fibres d'élastines au niveau des septa intersacculaires.

Le stade alvéolaire

Chez l'humain, le stade alvéolaire débute autour de la 34^e semaine de grossesse et se poursuit après la naissance. En effet, environ 80% des alvéoles se développeront après la naissance, tandis que chez la souris l'alvéolisation sera exclusivement post-natale. Chez le nouveau-né, on estime que 10% des 300 millions d'alvéoles définitives sont formées. Précédant la formation des alvéoles, une courte période d'expansion pulmonaire a lieu pendant laquelle les saccules augmentent de volume sans modification de la structure parenchymateuse [56]. Suite à cette période d'expansion, des bourgeons vont apparaître le long des septa primaires. Ces bourgeons vont croître rapidement et former les septa secondaires, qui vont diviser les espaces aériens primitifs en de plus petites unités appelées alvéoles. La septation des saccules est sous l'influence de nombreux facteurs de régulation. Les événements qui caractérisent ce stade du développement pulmonaire comprennent

notamment la prolifération cellulaire, le renouvellement de la matrice extracellulaire, le dépôt d'élastine au sommet des septa secondaires ainsi que la réduction du tissu interstitiel. Les septa secondaires possèdent deux lits capillaires, tout comme les septa primaires. La formation d'alvéoles se poursuit tant que le septum à partir duquel se forme un bourgeon conserve un double réseau capillaire. Suite à l'augmentation du volume des alvéoles nouvellement formées, celles-ci sont subdivisées par de nouveaux septa. L'épaisseur de la paroi des septa va diminuer, permettant la formation de fines parois inter alvéolaires dans lesquelles le double réseau capillaire va disparaître et ce sur de larges portions parenchymateuses. Cette étape s'effectue par la fusion des capillaires en un réseau unique qui fera face simultanément à deux lumières alvéolaires, conférant ainsi une morphologie mature aux septa inter alvéolaires.

1.3.2. Facteurs régulant le développement pulmonaire

De nombreux facteurs agissant dans le contrôle de la morphogenèse pulmonaire ont été identifiés, notamment des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, des molécules de la matrice extracellulaire, des intégrines ainsi que des molécules d'adhésion intercellulaire. Ces facteurs interagissent tout au long de l'axe proximal-distal des voies respiratoires où ils influencent localement l'expression de certains gènes et agissent directement sur le patron endodermique et la morphogenèse des embranchements, la différenciation cellulaire, la vascularisation et la réponse mécanique au stress [18, 52].

L'épithélium pulmonaire influence ses propres mécanismes de différenciation et de spécialisation spatiale par l'expression de plusieurs facteurs. On retrouve parmi ceux-ci les facteurs nucléaires hépatiques, le facteur de transcription thyroïdien 1, des membres de la famille de facteurs GATA ainsi que de la famille des boîtes homéotiques des complexes Iroquois [52]. En effet, les profils d'expression et fonctions spécifiques de plusieurs gènes ont été déterminés dans le développement pulmonaire. Par exemple, le gène MIA1 (*melanoma inhibitory activity ou cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein*) est fortement exprimé au niveau de l'épithélium distal au début du développement, mais il est absent en fin de gestation. Le traitement d'explants de poumons murins au jour gestationnel (JG) 16.5 avec la protéine MIA1 exogène provoque la réduction de certains marqueurs de

maturation pulmonaire, dont SP-A et SP-B. MIA1 n'est normalement plus exprimée après le JG 16.5, cependant une persistance de son expression cause des troubles respiratoires et la mort à la naissance en perturbant la maturation de l'épithélium distal. L'inhibition de son expression en fin de gestation est requise pour la maturation normale du système de surfactant [59]. D'autres exemples sont des protéines exprimées par les cellules de Clara, telles que la protéine des cellules sécrétoires de Clara (CCSP), la flavine monooxygénase 3, la paraoxonase 1, l'aldéhyde oxydase 3 et la claudine 10 [60]. En effet, dans les poumons foetaux murins, la claudine 10 est exprimée uniformément dans l'épithélium au JG 14.5, alors qu'elle est restreinte aux cellules sécrétoires au JG 18.5.

L'épithélium pulmonaire sécrète aussi la protéine Sonic hedgehog (Shh) et des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFs), tandis que le mésenchyme pulmonaire sécrète des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) et épidermiques (EGFs). Certains de ces facteurs sont cruciaux dans le développement pulmonaire, comme par exemple Shh et FGF10 qui sont essentiels à la détermination du patron de développement du système respiratoire primordial. En effet, des facteurs exprimés par le mésenchyme pulmonaire sont associés au contrôle du patron épithélial. On retrouve parmi ceux-ci les facteurs de transcription à doigts de zinc Gli2 et Gli3, la protéine Pod1 et les protéines Tbx2 et Tbx5. Durant les étapes tardives du développement pulmonaire, les fibroblastes formant le mésenchyme se différencient principalement le long des voies adipogénique (lipofibroblastes) ou myogénique (myofibroblastes) et expriment alors des gènes associés au métabolisme du muscle ou du tissu adipeux. Mentionnons qu'une balance entre les sous-populations fibroblastiques est importante dans la communication entre le mésenchyme et l'épithélium. Par ailleurs, plusieurs acteurs de cette communication ont été identifiés. Par exemple, il a été démontré que la protéine neuréguline-1 β (NRG-1 β) affecte la maturation pulmonaire fœtale par une action de différenciation basée sur un modèle de communication cellule-cellule [61]. Lors de la synthèse de surfactant, la quantité de NRG-1 β sécrétée par les fibroblastes augmente et stimule la maturation des PTII. Son expression augmente en bordure du mésenchyme et des cellules épithéliales, lui suggérant un rôle dans la différenciation cellulaire via un mode de signalisation paracrine. Mentionnons aussi l' α -actine du muscle lisse (α -SMA), une protéine servant à la contraction et à la formation du

cytosquelette, qui est en association avec le processus de ramification et d'alvéolisation et nécessaire au remodelage du poumon. La protéine α -SMA est un marqueur de l'initiation de la différenciation des cellules du muscle lisse et son expression est aussi régulée par des interactions mésenchyme-épithélium [62-64]. Par ailleurs, la vascularisation pulmonaire, qui se déroule en étroite relation avec l'alvéolisation, implique notamment des facteurs VEGFs, des angiopoïétines ainsi que des éphrines [18].

La morphogénèse pulmonaire est aussi dépendante d'interactions entre certains types cellulaires pulmonaires et la matrice extracellulaire [55, 65]. En effet, la matrice extracellulaire influence la migration et la différenciation des cellules mésenchymateuses et épithéliales du poumon en développement. L'expression de la fibronectine et du récepteur spécifique de la laminine (intégrine β 1) diminue pendant le développement pulmonaire [65]. La fibronectine est impliquée dans la formation du parenchyme et du stroma, alors que l'intégrine β 1 est importante dans le processus de maturation pulmonaire et dans la formation de la membrane basale. Les intégrines impliquées dans les interactions entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire jouent un rôle important dans la morphogénèse des embranchements, la polarisation des cellules épithéliales et la différenciation cellulaire [66, 67]. Le remodelage de l'interstitium et des membranes basales de la matrice extracellulaire est influencé par les MMPs et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que le système MMPs/TIMPs est impliqué dans la morphogénèse et le développement pulmonaire chez plusieurs espèces [68-72] dont l'humain [73]. L'altération du système MMPs/TIMPs peut conduire à une morphologie pulmonaire anormale ou pathologique [74]. Un déséquilibre MMPs/TIMPs a été observé dans les liquides trachéaux d'enfants atteints de SDR [75] ou de diverses maladies pulmonaires [76, 77]. Par exemple, un niveau accru de MMP8 est observé dans les liquides trachéaux de prématurés nécessitant l'apport de surfactant exogène [75]. Les niveaux de MMPs et TIMPs ont été proposés comme paramètres de prédiction de maladies pulmonaires chroniques [51, 75, 78-81].

Durant le développement fœtal, les poumons des mammifères sont des organes sécrétoires qui subissent des mouvements semblables aux mouvements respiratoires [82]. Très tôt en

grossesse (6 semaines), l'épithélium bronchopulmonaire débute la sécrétion d'un liquide dans la lumière pulmonaire [82]. Cette sécrétion du liquide intrapulmonaire entraîne une augmentation de la distension du poumon, activant ainsi une réponse de mécanotransduction qui résulte en une induction de la croissance et de la maturation [83-87]. Un volume adéquat de ce liquide est primordial pour la croissance et le développement normal du poumon [88-90]. Les processus de sécrétion et de réabsorption du liquide pulmonaire dépendent d'un transport actif d'ions entre l'épithélium pulmonaire et l'espace intra-luminal [91]. Le transport actif d'ions chlorure à la surface basolatérale des cellules épithéliales génère une force osmotique qui induit la sécrétion du liquide de la microcirculation pulmonaire vers la lumière pulmonaire [82]. Au niveau expérimental, la technique d'occlusion trachéale, qui mène à la séquestration du liquide intrapulmonaire, est utilisée avec des modèles animaux pour étudier l'impact de la mécanotransduction sur le développement pulmonaire. Chez l'humain, elle peut être réalisée à la fin de la période canaliculaire du développement pulmonaire. Cette intervention chirurgicale s'effectue par introduction endoscopique d'un ballonnet à l'intérieur de la trachée. En clinique, son utilisation semble restreinte aux fœtus porteurs d'une hernie de coupole diaphragmatique isolée ayant un mauvais pronostic [92]. Lors de la naissance, la résorption du liquide pulmonaire est cruciale car les alvéoles doivent être ouvertes et dépourvues de liquide afin d'assurer des échanges gazeux optimaux. L'épithélium pulmonaire distal qui sécrétait des ions chlorure se transforme en un épithélium d'absorption des ions sodium (Na^+), principalement par l'action des canaux ENaC (*epithelium sodium channel*) [93]. La transition d'un épithélium sécrétoire en un de résorption a été attribuée à un mécanisme intracellulaire dans lequel l'augmentation de l'adénosine 3'5'-cyclique monophosphate induite par une stimulation β -adrénergique mène à l'ouverture des canaux Na^+ à la membrane apicale de l'épithélium, permettant ainsi le transport des ions Na^+ du côté luminal de l'épithélium à travers l'interstitium [91]. Les PTII principalement seraient impliquées dans l'homéostasie du liquide pulmonaire en régulant activement le transport du Na^+ , les PTI fournissant plutôt une route pour l'absorption passive de l'eau. Cependant, les PTI constituent environ 95% de la surface d'échange pulmonaire chez l'humain et il a été suggéré que ces cellules contribueraient au transport actif du Na^+ [94]. En effet, les cellules

PTI expriment les trois sous-unités des canaux sodiques et possèdent une activité Na^+ -potassium (K^+)-ATPase, à l'instar des PTII [95-97].

Citons brièvement trois protéines identifiées comme ayant un rôle crucial dans le développement pulmonaire. Premièrement, aux JG 17.5 et 18.5 chez la souris, les poumons déficients en la protéine *Cited2* ont un espace sacculaire terminal réduit dû à une différenciation altérée des pneumocytes [98]. De plus, le poumon déficient en *Cited2* présente une expression diminuée de *Cebpa*, qui est un régulateur important de la maturation épithéliale. Deuxièmement, la Golgi α 1,2-mannosidase IB est une protéine impliquée dans la N-glycosylation de glycoprotéines requises pour le fonctionnement et la maturation du poumon. En effet, les souris déficientes en Golgi α 1,2-mannosidase IB arrivent à terme d'apparence normale, mais présentent rapidement des signes de détresse respiratoire et meurent ensuite d'une hémorragie pulmonaire [99]. Troisièmement, le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes- γ (PPAR- γ) est un membre de la superfamille des récepteurs aux hormones nucléaires impliqué dans la différenciation cellulaire et le développement tissulaire. PPAR- γ est exprimé dans le poumon par certains types cellulaires, incluant les cellules épithéliales de la portion conductrice et les lipofibroblastes. Ce régulateur de l'expression génique et marqueur de différenciation au niveau des cellules épithéliales est nécessaire à la structure et à la fonction pulmonaire [100].

1.3.3. Le surfactant pulmonaire

Le surfactant pulmonaire est un mélange complexe de lipides et de protéines dont le principal rôle est de réduire la tension de surface à l'interface alvéolaire air-liquide afin de prévenir le collapsus pulmonaire. Le surfactant pulmonaire a aussi un rôle immunologique. Les lipides et les protéines du surfactant sont synthétisés et sécrétés par les PTII. Le patron d'exocytose va du réticulum endoplasmique aux corps lamellaires, les organelles spécialisées dans lesquelles les lipides et les protéines composant le surfactant sont assemblés et stockés dans des structures denses et concentriques lamellaires [101]. La sécrétion du surfactant pulmonaire s'effectue par la fusion des vésicules contenant le

surfactant avec la membrane plasmique, ce qui permet la formation de nouvelles structures protéines-lipides spécifiques à la membrane pulmonaire appelée tubules de myélines [102].

Le surfactant pulmonaire est composé de 90% de lipides, majoritairement des phospholipides, et de 8-10% de protéines. Bien que la composition du surfactant pulmonaire puisse varier d'une espèce à l'autre, chez les mammifères il est en général composé à 80% de phosphatidylcholine, dont environ la moitié est représentée par le DPPC [102]. Le phosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol, des phospholipides acides, comptent pour 8-15% des phospholipides totaux du surfactant pulmonaire. La composition du surfactant pulmonaire diffère entre le fœtus et l'adulte, le surfactant des poumons fœtaux contenant généralement plus de phosphatidylinositol. Parmi les lipides neutres composant le surfactant pulmonaire, le cholestérol est présent dans une proportion de 8-10%. Le surfactant est aussi composé de petites quantités de mono-, di- et tri-acylglycérol, ainsi que d'acides gras libres, dont principalement le palmitate. Une caractéristique de la composition du surfactant pulmonaire, lorsque comparée à d'autres membranes mammaliennes, est son très grand contenu en DPPC et en phospholipides anioniques (phosphatidylglycérol et phosphatidylinositol).

Les protéines composant le surfactant pulmonaire se classifient en deux groupes : les protéines du surfactant hydrophiles SP-A et SP-D et les protéines du surfactant hydrophobes SP-B et SP-C [103]. SP-A est la protéine majoritaire du surfactant pulmonaire et représente 5-6% des protéines totales, tandis que SP-D représente environ 0.5%. Les protéines SP-A et SP-D sont membres de la famille des collectines, qui regroupe des protéines multimériques possédant des domaines semblables au collagène et un domaine globulaire de liaison des carbohydrates qui est dépendant du calcium. Ces caractéristiques structurales leur permettent de lier différents ligands comme le calcium, des sucres ou des lipides et leur confèrent un rôle important dans la fonction immune pulmonaire. En effet, les protéines SP-A et SP-D ont la capacité de se lier à des pathogènes viraux et bactériens. Il a été démontré que la présence de SP-A était nécessaire pour la formation des tubules de myélines qui sont les structures intermédiaires dans la formation du film superficiel. De plus, des études *in vitro* ont suggéré que SP-A jouait un rôle dans la régulation des niveaux

de phospholipides du surfactant en inhibant leur sécrétion et en augmentant leur réabsorption par les PTII. Les protéines SP-A augmentent donc le recyclage et l'étalement du surfactant, cependant elles ne sont pas essentielles à la respiration [104]. Les protéines SP-B et SP-C sont de courts polypeptides hydrophobes qui résultent du processus protéolytique de précurseurs lors de l'exocytose par les PTII du surfactant pulmonaire. Chacune compte pour 1-1.5% du poids total du surfactant pulmonaire. Ces protéines jouent un rôle crucial dans la formation et la stabilisation du film que forme le surfactant pulmonaire. Il a été démontré que SP-B était nécessaire à la survie de l'individu [105]. Par ailleurs, sans SP-B, la protéine SP-C n'est pas exprimée correctement [106]. Les données disponibles à ce jour suggèrent que les protéines du surfactant sont impliquées principalement dans la promotion de l'absorption et dans la stabilisation et l'étalement du film superficiel, tandis que les lipides composant le surfactant sont essentiellement responsables de la réduction de la tension de surface lors de la compression [102].

1.4. Stéroïdogénèse

Les hormones stéroïdiennes et leurs métabolismes sont centraux dans mon projet de doctorat et les éléments pertinents les concernant seront présentés ici.

1.4.1. Voies métaboliques générales

Les hormones stéroïdiennes comprennent les progestines, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les androgènes et les estrogènes. Leur biosynthèse à partir du cholestérol, ainsi que leur transformation en métabolites inactifs, impliquent de nombreuses enzymes, notamment : cytochromes P450, 3 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (3 β HSDs), 11 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (11 β HSDs), 3 α -hydroxystéroïdes déshydrogénases (3 α HSDs), 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (17 β HSDs) et 5 α -réductases. Un schéma général de ces réactions est présenté à la figure 2. Il est important de souligner que la formation de tel ou tel stéroïde est principalement dépendante du profil d'expression des enzymes stéroïdogéniques au niveau d'un tissu donné et des niveaux de substrats disponibles. Les androgènes et les glucocorticoïdes, de par leurs implications dans le développement pulmonaire, sont d'intérêt particulier dans le contexte de cette thèse.

Leurs voies de synthèse générales seront présentées. Par la suite, les 17 β HSDs, qui catalysent notamment les réactions menant à la synthèse ou à l'inactivation d'androgènes actifs, seront décrites plus en profondeur avec une emphase sur les 17 β HSDs de type 2 et de type 5, celles-ci faisant partie de l'étude présentée au chapitre III.

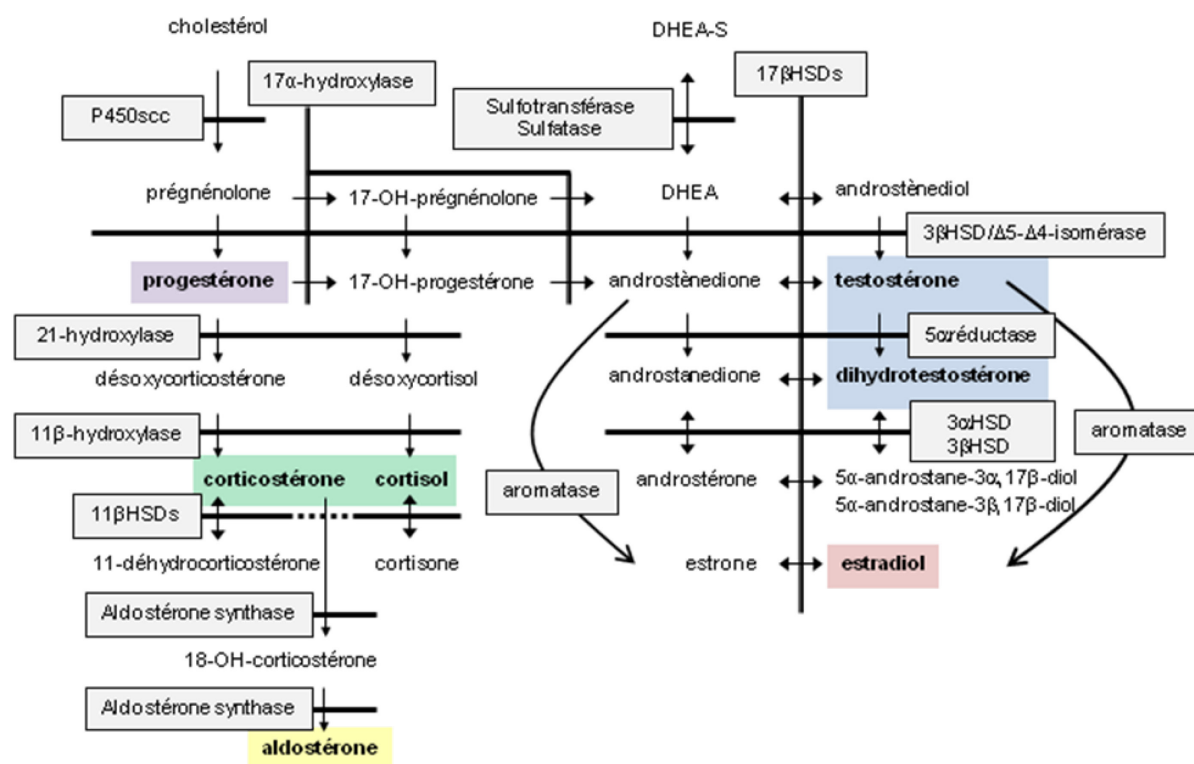


Figure 2: Aperçu général des voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes

Les différentes enzymes sont encadrées. Les zones colorées identifient les progestines (violet), les glucocorticoïdes (vert), les minéralocorticoïdes (jaune), les androgènes (bleu) et les estrogènes (rose).

Plusieurs articles de synthèse concernant divers aspects de la stéroïdogénèse ont été publiés dans les dernières années et constituent d'importantes sources d'informations [107-111]. La cascade de transformations enzymatiques menant vers toutes les classes de stéroïdes débute avec la transformation du cholestérol en prégnénolone par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (P450scc) (figure 2). Cette réaction enzymatique qui produit aussi de l'acide isocaproïque implique trois activités : 20 α -hydroxylase, 22-hydroxylase et 20,22-lyase. De plus, elle nécessite l'adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine pour le transfert

d'électrons provenant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH), tout comme les autres réactions impliquant des cytochromes P450 mitochondriaux. Le cholestérol est principalement délivré aux cellules stéroïdogéniques par les lipoprotéines de faible densité. Par ailleurs, une étape limitante importante de la stéroïdogénèse dans tous les tissus à l'exception du placenta réside dans l'activité de la protéine StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) qui permet, en association avec le récepteur à la benzodiazépine, le transport et la translocation du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie, où se retrouve la P450_{sc}. La protéine StAR est produite suite au clivage d'un précurseur, événement sous le contrôle de l'adénosine monophosphate cyclique. La prégnénolone ainsi produite est ensuite convertie en progestérone par les activités déshydrogénase et isomérase de l'enzyme microsomale 3 β HSD (réaction nécessitant le cofacteur NADP), ou encore en 17-OH-prégnénolone par l'enzyme microsomale P450_{c17} (ou 17 α -hydroxylase). Cette dernière est cruciale pour la formation des androgènes. En effet, les stéroïdes déhydroépiandrostérone (DHEA) et androstènedione sont formés suite à la transformation de la 17-OH-prégnénolone et de la 17-OH-progestérone, respectivement, par l'activité 17,20-lysase de la 17 α -hydroxylase. L'androstènedione est aussi formé à partir du DHEA par la 3 β HSD. Les cytochromes P450 microsomaux utilisent la P450 réductase comme transporteur d'électrons à partir du NADPH et du cytochrome *b5*. Les enzymes 17 β HSDs et 5 α -réductases interviennent ensuite pour mener à la synthèse des androgènes biologiquement actifs que sont la testostérone et la 5 α -dihydrotestostérone. En plus d'être des substrats pour la formation des androgènes, les progestines sont indispensables à la biogenèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. La progestérone et la 17-OH-progestérone peuvent être transformées en 11-désoxycorticostérone et en 11-désoxycortisol, respectivement, par l'enzyme microsomale P450_{c21} ou 21-hydroxylase. Il est important de mentionner que la voie menant à la synthèse de désoxycorticostérone est prédominante chez les rongeurs, alors que celle menant à la synthèse de désoxycortisol est prédominante chez l'humain, dû à l'absence de la P450_{c17} dans la surrénale murine adulte. Il semble cependant qu'elle soit exprimée au niveau de la surrénale fœtale. Ensuite, l'enzyme mitochondriale Cyp11b1 ou 11 β -hydroxylase permet la formation de la corticostérone ou du cortisol, les deux glucocorticoïdes endogènes ayant la plus forte activité biologique. De plus, les enzymes

11 β HSDs de type 1 et 2, qui font partie de la famille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne, catalysent l'interconversion du cortisol (ou de la corticostérone) et de la cortisone (ou de la 11-dihydrocorticostérone), cette dernière étant une forme inactive. L'aldostérone, le principal minéralocorticoïde, est formée suite à deux actions successives de l'aldostérone synthase sur la corticostérone et la 18-OH-corticostérone.

1.4.2. La famille des 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases

1.4.2.1. Les différentes enzymes : types 1 à 14

Les 17 β HSDs sont des enzymes impliquées dans la transformation des stéroïdes sexuels tels que la testostérone (T), l'estradiol (E₂) et la dihydrotestostérone (DHT). En effet, ces enzymes catalysent des étapes clés dans la formation des androgènes et des estrogènes. Les 17 β HSDs ont une fonction de formation de stéroïdes actifs via la réduction des 17-cétostéroïdes en 17 β -hydroxystéroïdes ou une fonction de transformation (inactivation) des stéroïdes via l'oxydation des 17 β -hydroxystéroïdes en 17-cétostéroïdes [112]. En effet, c'est sous leur forme 17 β -hydroxy que les androgènes et les estrogènes ont la plus haute affinité pour leur(s) récepteur(s). Des activités de type 17 β HSD sont présentes dans les tissus stéroïdogéniques classiques comme le placenta, l'ovaire et les testicules, ainsi que dans plusieurs organes périphériques tels que le tissu adipeux, l'endomètre, le foie, le poumon, la peau et la prostate [113, 114]. La présence des 17 β HSDs dans ces tissus mène à la modulation des niveaux locaux de stéroïdes, ce qui permet par exemple de protéger les tissus d'actions néfastes que peuvent avoir les hormones lorsque leurs concentrations sont inadéquates [112, 115], et d'autre part, de réguler finement certains processus biologiques hormono-dépendants, telle que la prolifération cellulaire. En effet, les 17 β HSDs sont partie intégrante du concept de régulation au niveau pré-récepteur de l'action hormonale en agissant comme « commutateurs métaboliques » [116].

En 1991, un article de synthèse portant sur les 17 β HSDs ne mentionnait que trois isoformes [117]. À ce jour, 14 types de 17 β HSDs ont été décrits ou annotés chez les mammifères, dont 11 isoformes identifiées chez l'humain. Les 17 β HSDs types 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 et 12 [113] ont été identifiées et/ou caractérisées chez l'humain et la souris. Il est à noter que

la 17 β HSD6 a été clonée chez le rat et correspond à la 17 β HSD9 chez la souris, alors que la 17 β HSD14 a été clonée chez l'humain. Par ailleurs, les isoformes humaines des types 1, 4, 5, 10, 11 et 14 ont été caractérisées au niveau de leur structure tridimensionnelle [113]. Une séquence correspondant à la 17 β HSD13 a été déposée dans les bases de données du *Human Gene Nomenclature*, cependant aucune étude n'est actuellement disponible pour cette isoforme.

Les 17 β HSDs, à l'exception de la 17 β HSD5 qui appartient à la famille des aldo-céto réductases (AKR), font partie de la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte. Ces enzymes diffèrent notamment par leur distribution tissulaire, leurs substrats, leur localisation subcellulaire ainsi que par les mécanismes impliqués dans leur régulation. En effet, elles utilisent les cofacteurs NAD(H) ou NADP(H) afin de catalyser l'oxydation des 17 β -hydroxy et/ou la réduction des 17-cétostéroïdes. Ces enzymes agissent de façon bidirectionnelle *in vitro*, montrant à la fois des activités d'oxydation et de réduction, en fonction du cofacteur disponible. Cependant, elles agissent de façon unidirectionnelle *in vivo*. En effet, les isoformes 1, 3, 5, 7 et 12 utilisent le cofacteur NADP(H) et ont une activité réductase, tandis que les isoformes 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 et 14 utilisent le cofacteur NAD(H) et possèdent une activité déshydrogénase (voir figure 3).

Les 17 β HSDs ont une origine évolutive commune, mais certaines ont divergé davantage au cours de l'évolution. Ainsi, il existe une faible homologie entre les séquences de certaines 17 β HSDs [118]. Par exemple, on retrouve 76% et 61% de similarité et d'identité, respectivement, entre les isoformes humaine et murine de la 17 β HSD2, alors qu'entre la souris et le rat, les isoformes de la 17 β HSD2 montrent 89% de similarité et 82% d'identité [119]. Ne partageant qu'environ 30% d'identité entre elles, les 17 β HSDs sont plus souvent similaires à d'autres membres de la famille de déshydrogénases/réductases à chaîne courte. Bien qu'elles ne partagent qu'une identité de séquence limitée l'une par rapport à l'autre, leur spectre de substrats se chevauche. Elles ont donc été regroupées en fonction de leur similarité d'action plutôt qu'en fonction de leur structure primaire. Cependant, il est à noter que les domaines catalytiques et de liaison du cofacteur sont très bien conservés entre les isoformes.

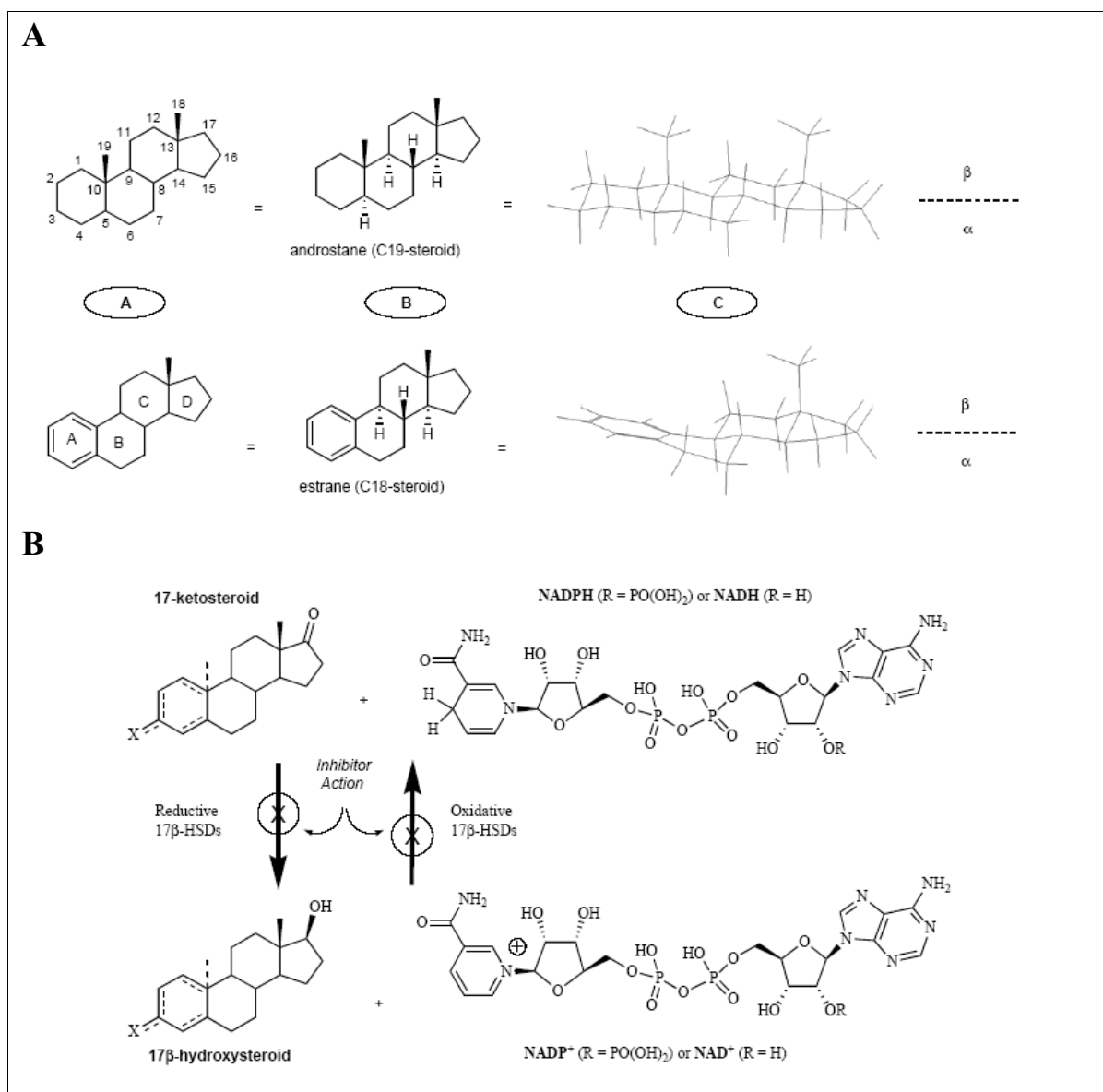


Figure 3: Structures générales des androgènes et estrogènes et réactions des 17βHSDs

(A) Identification des carbones et des cycles et représentations spatiales de la structure moléculaire des androgènes et des estrogènes. (B) Représentation des réactions de réduction et d'oxydation catalysées par les 17βHSDs. Tirées et adaptées de [120].

Structures : Les 17 β HSDs varient aussi entre elles au niveau de leur structure protéique. Par exemple, la 17 β HSD4, structurellement unique parmi les 17 β HSDs, est une protéine de 736 acides aminés avec un domaine tripartite possédant des activités enzymatiques distinctes. Le domaine N-terminal catalyse la déshydrogénation de E₂. Plusieurs structures cristallographiques complètes ou partielles de sept isoformes humaines de 17 β HSDs sont accessibles à ce jour, dont certaines complexées avec un substrat, un cofacteur, un inhibiteur ou une combinaison de ces derniers. En effet, en plus de la 17 β HSD1, la structure des types 4, 5, 8, 10, 11 et 14 a été déterminée. Par ailleurs, considérant que le nombre de repliements et de structures protéiques est limité [121], que les bases de données de séquences et de structures sont en constante évolution et que les approches de modélisation par bioinformatique sont de plus en plus performantes, des analyses strictement *in silico* seront bientôt efficaces dans la détermination, par exemple, de molécules candidates à des médicaments pour des enzymes dont la cristallisation n'a pas été réalisée, ou ne peut être réalisée suite à des contraintes techniques (*e.g.* protéine fortement hydrophobe).

Localisations : Les sites d'expression tissulaire et cellulaire des 17 β HSDs sont très diversifiés, autant entre elles que d'un tissu à l'autre pour une même 17 β HSD. Par exemple, la 17 β HSD4 est exprimée ubiquitairement dans l'organisme [122], cependant au niveau de certains tissus elle présente une expression cellulaire spécifique. En effet, au niveau du cerveau elle est présente dans les cellules de Purkinje, dans le poumon elle est exprimée par l'épithélium bronchique et dans l'utérus elle est exprimée dans l'épithélium glandulaire et luminal [112]. Un autre exemple concerne la 17 β HSD7 qui est impliquée dans la synthèse de E₂ par les cellules lutéales de l'ovaire [123, 124]. En effet, cette enzyme est abondamment exprimée dans le corps jaune, particulièrement durant la seconde moitié de la gestation [112]. Encore au niveau de l'ovaire, l'expression de la 17 β HSD8 est localisée uniquement dans les cellules du cumulus et non dans les cellules de la granulosa ou du corps jaune, là où sont exprimées les 17 β HSD1 et 17 β HSD7 [113].

Activités : Les 17 β HSDs varient aussi en ce qui concerne leurs substrats et leurs activités, qui se révèlent être plus diversifiés qu'originellement prédits. En effet, en plus de leurs

activités sur les stéroïdes, certaines 17 β HSDs ont des activités sur les acides gras, les acides biliaires, les rétinoles ou certains xénobiotiques. Par exemple, la 17 β HSD7 fut d'abord identifiée comme la *prolactin receptor-associated protein* chez le rat. Ensuite, son homologue chez la souris a été nommée 17 β HSD7 de par sa capacité à convertir l'estrone en E₂. Son expression élevée au niveau de l'ovaire lui suggérait un rôle pendant la gestation. Cependant, plusieurs études parues par la suite suggèrent une implication, possiblement prédominante, de cette enzyme dans la voie de synthèse du cholestérol. Bien qu'elle catalyse la transformation de l'estradiol, de la testostérone et de la DHT, la 17 β HSD8 a aussi été suggérée par analogie de séquences être impliquée dans le métabolisme des acides gras [125]. La 17 β HSD10 semble être la 17 β HSD démontrant la plus large spécificité de substrats. Elle est impliquée dans l'inactivation des androgènes et des estrogènes, dans la β -oxydation des acides gras ainsi que dans l'isomérisation des acides biliaires [126, 127]. Elle montre aussi des interactions protéine-protéine avec la bêta-amyloïde [128]. D'autre part, en plus de sa capacité à convertir la 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol en androstérone [129], la 17 β HSD11 aurait une activité principalement dans le métabolisme des acides gras [113]. En plus de son activité sur les stéroïdes sexuels, la 17 β HSD12 a une activité 3-ketoacyl-CoA réductase et il semble qu'elle soit impliquée dans la synthèse des acides gras, possiblement de manière prédominante. Des différences inter espèces sont aussi rapportées pour cette isoforme. En effet, chez l'humain la 17 β HSD12 catalyse la conversion de l'estrone en E₂, alors que chez la souris elle catalyse aussi la conversion de l'androstènedione en T, du DHEA en androstènediol, ainsi que de l'androstérone en 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol [130]. Bien que relativement peu d'informations soient disponibles concernant la 17 β HSD14, cette enzyme serait impliquée dans l'inactivation des stéroïdes sexuels, soit de E₂ en estrone, de la T en androstènedione et de l'androstènediol en DHEA [113].

Pathologies : Plusieurs 17 β HSDs ont été associées à des pathologies. Par exemple, en cas de mutation de la 17 β HSD3, on assiste à une diminution importante de la synthèse de testostérone qui peut mener à un pseudohermaphrodisme chez l'homme [131]. Une mutation de la 17 β HSD4 mène à une déficience en protéine D-spécifique bifonctionnelle qui est léthale. La 17 β HSD8 a été associé avec la polykystose rénale [132]. Des altérations

généétiques de la 17 β HSD10 peuvent causer des formes de retards mentaux liés au chromosome X qui peuvent mener jusqu'à la neurodégénérescence infantile [133]. De plus, cette enzyme, de par ses interactions avec la protéine bêta-amyloïde, est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, un rôle de la 17 β HSD14 dans l'inactivation des stéroïdes sexuels est supporté par l'observation qu'une expression élevée de cette enzyme est associée à un meilleur pronostic chez des patients atteints de cancer du sein [134]. Inversement, une forte expression de 17 β HSD1, de la 17 β HSD2 ou de la 17 β HSD4 corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein, du colon et de la prostate, respectivement [135]. De plus, en ce qui concerne le cancer du sein, le ratio d'expression des types 1 et 2 semble être un meilleur indicateur pronostique qu'une mesure individuelle d'expression [136]. L'implication des stéroïdes dans différentes pathologies comme le cancer, l'endométriose et le syndrome des ovaires polykystiques est bien documentée [137]. C'est ce qui poussa les recherches de variations génétiques au niveau des 17 β HSDs dans le but de prédire des susceptibilités à ces maladies. À ce jour, des variants génétiques des 17 β HSDs de type 1 à 8 furent analysés dans différentes recherches. Malgré de nombreuses études, surtout concernant la 17 β HSD1, seulement quelques associations concluantes furent déterminées (pour une revue voir [111]). En effet, l'étude de polymorphismes est compliquée notamment par les sites polymorphiques choisis et analysés, les populations ciblées (variations ethniques) et l'échantillonnage disponible (puissance statistique souvent insuffisante).

Inhibiteurs : Le développement d'inhibiteurs spécifiques pour le traitement de maladies hormono-dépendantes comme les cancers du sein et de la prostate, l'endométriose et l'ostéoporose est en constante évolution. Les 17 β HSDs, de par leurs rôles dans le métabolisme des stéroïdes sexuels, représentent des cibles très intéressantes dans le développement d'inhibiteurs [120, 138, 139]. En fonction de la pathologie, il peut être d'intérêt de bloquer la formation d'un stéroïde actif, par exemple dans le cas du cancer du sein, ou encore d'empêcher sa dégradation, par exemple dans le cas de l'ostéoporose. De nombreux inhibiteurs de type stéroïdiens ou non-stéroïdiens ont été développés par des laboratoires académiques et pharmaceutiques. Les objectifs sont de produire des inhibiteurs spécifiques, efficaces et sans effet agoniste sur les récepteurs stéroïdiens. Les 17 β HSDs de

type 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 10 sont les isoformes pour lesquelles le plus grand nombre de composés ont été développés. Ces composés démontrent une spécificité et une efficacité variables. Bien que les recherches dans les dernières années aient mené à l'élaboration de nombreuses molécules-candidates, à ce jour aucune n'est en phase clinique.

Modèles animaux : Plusieurs modèles de souris transgéniques exprimant une forme humaine de 17 β HSD ou de souris *knock-out* (KO) pour une 17 β HSD endogène ont été étudiés dans les dix dernières années [111]. En effet, des souris exprimant de manière ubiquitaire la 17 β HSD1 ou la 17 β HSD2, ou encore exprimant la 17 β HSD10 au niveau du tissu neuronal dans le système nerveux central ont été développées. Des modèles KO pour la 17 β HSD2, la 17 β HSD4 et la 17 β HSD7 ont été rapportés. L'étude de ces modèles murins ajoute à notre compréhension des rôles biologiques de ces enzymes, souvent au-delà de leur implication dans la stéroïdogénèse. Les phénotypes des modèles de 17 β HSD2 seront détaillés plus loin.

1.4.2.2. La 17 β HSD2

Les isoformes humaine et murine de la 17 β HSD2 mènent à la conversion des stéroïdes sexuels biologiquement actifs E₂, T et 5 α -DHT en leur forme moins active estrone, androstènedione et androstanedione, respectivement. Parallèlement à son activité 17 β HSD, la 17 β HSD2 catalyse aussi la conversion de la 20 α -dihydroprogestérone en progestérone par le biais d'une activité 20 α -HSD [140]. En condition *in vivo*, elle utilise le NADH comme cofacteur et a principalement une activité déshydrogénase. La 17 β HSD2 est exprimée dans plusieurs tissus fœtaux et adultes tels que le placenta, le poumon, l'utérus, le foie et les voies urinaires et gastriques [112, 141, 142].

La 17 β HSD2 a été clonée chez l'humain [140], le rat [143] et la souris [119]. Le gène murin *Hsd17b2* est localisé sur le chromosome 8, à la position E1, possède 5 exons et a une longueur de 57 kilobases (kb). L'ARNm a une longueur de 1342 paires de bases (pb), un cadre ouvert de lecture de 1146 pb et encode une protéine active de 381 acides aminés dont le poids moléculaire prédit est de 41.8 kDa. Cette protéine est associée avec le réticulum

endoplasmique [144]. Deux codons stop ont été localisés [119, 145] et deux transcrits de 0.9 kb et 1.2 kb, respectivement, sont formés. Il semblerait que l'expression relative des ARNm de 0.9 kb et 1.2 kb soit constante dans divers tissus tels que l'ovaire, la glande mammaire et les surrénales avec un rapport de 10:1, tandis que dans le foie, le cerveau et le placenta le rapport est de 2:1 [119]. Chez l'humain, le gène *HSD17B2* est localisé en position chromosomique 16q24.1-2, possède 7 exons et s'étend sur plus de 40 kb. Deux transcrits peuvent être produits par épissage alternatif, le premier est composé des exons 1-4 et 7 et le deuxième des exons 1-7. Les deux messagers diffèrent d'une centaine de nucléotides. Seulement le premier transcrit mène à la production d'une protéine active sur les stéroïdes. Cet ARNm a une longueur de 1451 pb, un cadre ouvert de lecture de 1161 pb et mène à une protéine de 387 acides aminés dont le poids moléculaire théorique est de 42 kDa.

La présence de la 17 β HSD2 dans les cellules épithéliales de l'endomètre ou du sein [146, 147] permet de transformer l'estradiol en estrone, modulant ainsi la quantité de stéroïdes actifs dans le tissu. Cette modulation permet, dans ce cas, de protéger le sein ou l'endomètre de l'action néfaste que peuvent avoir les stéroïdes sexuels actifs. Dans le placenta, la 17 β HSD2 est exprimée au niveau des cellules endothéliales [142, 148, 149], tandis que dans l'endomètre elle est exprimée au niveau des cellules épithéliales glandulaires [146]. Dans le cas du placenta, il a été proposé que la 17 β HSD2 agisse comme une barrière afin de diminuer le taux de sécrétion de E₂ dans la circulation fœtale protégeant ainsi le fœtus d'une exposition inadéquate qui pourrait être néfaste à son développement. Notre laboratoire a démontré que la 17 β HSD2 est exprimée dans le poumon murin en développement [141], ainsi qu'au niveau de lignées fibroblastiques pulmonaires humaines [150]. Une des actions de la 17 β HSD2 au niveau du poumon serait de transformer la T en androstènedione. Il est reconnu que les androgènes ont des effets négatifs sur la maturation pulmonaire [151]. En effet, les androgènes vont retarder la production de facteurs paracrines par les fibroblastes pulmonaires, ce qui a pour effet de retarder la production du surfactant. Ainsi, la présence de la 17 β HSD2 dans le poumon influencerait la capacité des fibroblastes pulmonaires à sécréter les facteurs paracrines qui induiront la production de surfactant par les cellules PTII, enclenchant ainsi le processus de la maturation pulmonaire.

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été élaborés pour étudier les fonctions physiologiques de la 17 β HSD2. Le premier modèle développé par l'équipe du Dr Poutanen consiste en l'expression ubiquitaire de la 17 β HSD2 humaine chez la souris [152]. Le phénotype observé dans ce modèle est très intéressant et soulève de nouvelles fonctions *in vivo* potentielles de l'enzyme au-delà de son rôle sur les stéroïdes sexuels. Une augmentation significative d'environ 30% de la capacité à inactiver l'estradiol en circulation a été observée dans la lignée transgénique. Chez les mâles, une réduction du poids corporel en comparaison à la lignée sauvage est observée à l'âge d'un mois. Une réduction significative du poids des testicules et de l'épididyme est aussi observée. Un délai dans l'ouverture des yeux dans la période postnatale précoce est aussi observé. Un taux élevé d'infertilité a été observé chez les mâles qui ne montrent cependant pas d'anomalie au niveau de la prostate et des vésicules séminales, ce qui indique une action androgénique normale. En effet, les niveaux sériques d'hormone lutéinisante, d'hormone folliculo-stimulante et de progestérone, ainsi que les niveaux sérique et intratesticulaire de testostérone ne sont pas différents entre les transgéniques et les sauvages. Les niveaux de testostérone dans plusieurs tissus ont aussi été comparés, mais aucune différence n'a été observée. L'expression de plusieurs gènes androgéno-dépendants est altérée au niveau de l'épididyme. Au niveau du testicule des souris transgéniques, une dégénérescence des cellules germinales est observée et cause l'infertilité. Puisque le phénotype des transgéniques est semblable à ceux obtenus dans des modèles de déficience en acide rétinoïque, un analogue synthétique de l'acide rétinoïque a été administré, ce qui mena à un rétablissement significatif des tubules séminifères. Dans l'ensemble, le phénotype observé ne reproduit pas ceux de souris déficientes dans l'action des estrogènes ou des androgènes. En conclusion, cette étude suggère un rôle direct ou indirect de la 17 β HSD2 dans le métabolisme des rétinoïdes.

Faisant suite à cette étude de surexpression, l'équipe du Dr Poutanen réalisa un modèle de souris KO pour le gène *Hsd17b2* qui démontra des impacts majeurs de l'absence de ce gène sur certains processus développementaux [153]. Les souris *Hsd17b2*-KO exhibent une importante mortalité embryonnaire alors que les survivants montrent un retard de

croissance. La mortalité embryonnaire se manifeste à partir des JG 9-12. Les souris KO qui survivent jusqu'à la naissance (environ 20% des homozygotes mutants) ont ensuite dû être euthanasiées avant l'âge de quatre mois, en raison d'hydrocéphalie et de troubles d'équilibre et de coordination. En fin de gestation, des problèmes de développement placentaire furent observés et ce dans les trois couches principales du placenta murin, soit la décidue, les spongiotrophoblastes et le labyrinthe. En effet, d'importants problèmes d'organisation cellulaire lors du développement placentaire sont en cause. Les causes de mortalité et d'anomalies ne semblent pas reliées à un excès d'estradiol ou à une déficience en progestérone, puisque que l'administration d'un antiestrogène ou encore une supplémentation en progestérone ne rétablit pas le phénotype de souris KO. Les analyses histologiques menèrent à l'identification de problèmes au niveau du cerveau ainsi qu'au niveau du rein, les autres tissus étant d'apparence normale. Plus précisément, plusieurs régions cérébrales sont structurellement anormales et l'hydrocéphalie se développe progressivement chez les souris KO. De plus, elles ont souvent seulement un rein, le deuxième ayant subi une dégénérescence. Les phénotypes observés dans ce modèle de souris indiquent de nouveaux rôles potentiels du métabolisme des stéroïdes sexuels dans le développement embryonnaire, ou encore de nouvelles fonctions du gène *Hsd17b2*.

Chez les souris mâles transgéniques surexprimant la 17 β HSD2 humaine, plusieurs paramètres du squelette sont affectés dans la période précédant la puberté [154]. Le tibia et le fémur sont plus courts et la densité de différentes régions de l'os est plus faible chez les transgéniques. De plus, un délai dans l'apparition de la puberté est observé. Les niveaux sériques du facteur de croissance apparenté à l'insuline 1 (IGF-1), dont l'implication dans la maturation du squelette est reconnue, ont montré une forte corrélation avec les paramètres de croissance osseuse. Donc, les perturbations des niveaux de stéroïdes sexuels et d'IGF-1 dans le modèle transgénique seraient responsables des perturbations dans le développement osseux et du délai de puberté.

1.4.2.3. La 17 β HSD5

Tel que mentionné précédemment, la 17 β HSD5 appartient à la superfamille des aldo-kéto réductases (AKR) et est annotée AKR1C3 (pour une ressource d'informations pertinente sur les AKR, voir www.med.upenn.edu/akr).

Les AKR sont des enzymes monomériques solubles d'environ 37 kDa dépendantes du NAD(P)(H) qui partagent un motif structural de baril-(α/β)₈ ainsi qu'une tétrade catalytique conservée. Il existe 13 isoformes de ces enzymes chez l'humain, desquelles quatre ont la capacité de réduire les cétostéroïdes en hydroxystéroïdes, soit les AKR1C1-4. Les gènes encodant les AKR1C sont localisés sur le chromosome 10p15-10p14 et partagent plus de 86% d'identité dans leur séquence d'acides aminés. Elles présentent toutefois des différences importantes au niveau de leurs préférences de substrats et de leurs activités enzymatiques, chacune montrant une plasticité fonctionnelle relativement importante. Bien qu'*in vitro* ces enzymes aient la capacité de réaliser des réactions oxydatives, les réactions de réduction prédominent *in vivo*. Le gène *AKR1C1* encode la 20 α (3 β)-hydroxystéroïde déshydrogénase dont les réactions principales sont la conversion de la progestérone en 20 α -hydroxyprogestérone et la conversion de la 5 α -DHT en 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol. Petit détail intéressant : le 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol a la capacité de lier le récepteur aux estrogènes β . Le gène *AKR1C2* encode la 3 α HSD de type 3 qui catalyse principalement la conversion de la 5 α -DHT en 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol. Le gène *AKR1C3* encode la 17 β HSD5, d'abord identifiée comme la 3 α HSD de type 2 [155], qui est aussi la prostaglandine F synthase [156], dont les principales activités sont la conversion de l'androstènedione en testostérone ainsi que la conversion des prostaglandines H2 et D2 en prostaglandines PGF2 α et 11 β PGF2, respectivement. Finalement, le gène *AKR1C4* encode la 3 α HSD de type 1 dont l'activité majeure concerne la conversion des 3-cétostéroïdes en 3 α -hydroxystéroïdes. Au niveau du foie, ces enzymes servent à protéger l'organisme contre des niveaux circulants excessifs d'hormones stéroïdiennes actives. Elles jouent aussi dans le foie un rôle important dans la synthèse d'acides biliaires. Toutefois, ces enzymes montrent des profils d'expression variés dans plusieurs tissus où elles influenceront les niveaux de stéroïdes ou hormones actifs. C'est le cas particulièrement au niveau de la prostate, du testicule et du sein où la régulation fine de l'occupation des récepteurs

d'hormones sexuelles est d'une importance capitale. De ce fait, ces enzymes font l'objet de nombreuses études visant à déterminer leurs impacts dans le cas de cancers hormono-dépendants et sont des cibles très pertinentes dans le développement d'inhibiteurs spécifiques. Aussi, au niveau du système nerveux central, l'activité 3 α HSD peut réguler l'occupation du récepteur de l'acide γ -aminobutyrique en convertissant la 5 α -dihydroprogestérone en alloprégnanolone, qui est un puissant agoniste allostérique de ce récepteur. Dans ce cas, l'activité 3 α HSD est responsable de la production de stéroïdes anxiolytiques. Fait intéressant, l'activité 3 α HSD serait importante dans les mécanismes de la parturition chez la souris. En effet, dans un modèle de souris où la 5 α -réductase est inactivée, des problèmes de parturition furent observés et ne pouvaient être corrigés suite à l'administration de 5 α -DHT. C'est plutôt l'administration de 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol qui permet de rétablir la situation. Il semble que l'absence de 5 α -réductase mène à un problème dans le métabolisme de la progestérone qui entraîne une diminution de la dilation du col utérin. Le 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol semble donc exercer un effet antagoniste à la progestérone dans ce contexte, par un mécanisme toujours inconnu. Il a été proposé que l'effet passe par un récepteur nucléaire orphelin.

Décrivons maintenant brièvement et de manière plus précise l'AKR1C3 et son homologue murine. La principale activité enzymatique des isoformes humaine et murine de la 17 β HSD5 est la réduction de l'androstènedione en testostérone (activité 17 β HSD) [157] en utilisant le cofacteur NADH. Il s'agit par ailleurs de la seule enzyme de la famille AKR1C ayant la capacité de former la testostérone. La 17 β HSD5 a aussi une activité 20 α -HSD, capable d'inactiver la progestérone en 20 α -hydroxyprogestérone ainsi que la désoxycorticostérone (qui peut lier le récepteur des glucocorticoïdes et l'activer) en son métabolite inactif 20 α -hydroxy [158]. Son activité prostaglandine synthase est très élevée et représente même *in vitro* l'activité enzymatique la plus efficace. Elle accepte donc une grande variété de substrats comprenant certains androgènes, l'estrone, la progestérone, certaines prostaglandines, l'acide cholique, ainsi que plusieurs xénobiotiques. La 17 β HSD5 humaine présente une activité réductase plus élevée sur les androgènes que sur les estrogènes, et l'affinité pour l'androstènedione est également plus élevée que pour l'androstènedione. De plus, la 17 β HSD5 n'a qu'une faible affinité pour le DHT et ne

présente pas une forte activité d'inactivation de ce substrat [159]. Il est à noter que la 17 β HSD5 murine possède une faible activité 20 α -HSD [160], suggérant qu'une autre enzyme soit responsable de cette activité chez cette espèce. En résumé, contrairement aux autres 3 α -HSDs humaines dont un rôle majeur est d'éliminer les androgènes (DHT), la 17 β HSD5 exhibe plutôt un rôle d'activation des androgènes. L'AKR1C3 a donc la capacité, tout dépendant du contexte, de réguler l'accès de ligands à plusieurs récepteurs nucléaires incluant le récepteur des androgènes, le récepteur des estrogènes, le récepteur de la progestérone, le récepteur des minéralocorticoïdes, le récepteur des prostaglandines FP ainsi que PPAR γ , dont un ligand potentiel est la prostaglandine 15delta-PGJ₂. Par ailleurs, l'activité de l'AKR1C3 sur les prostaglandines lui suggère un rôle dans la prolifération cellulaire et le développement vasculaire.

Chez l'humain, la 17 β HSD5 est exprimée à différents niveaux dans plusieurs tissus dont la prostate, les surrénales, le foie, les testicules, l'ovaire, la glande mammaire, l'utérus, l'intestin, le poumon, le rein, le cerveau et le muscle squelettique [113, 160-162]. Chez la souris, elle a été détectée par hybridation *in situ* au niveau du foie, de l'ovaire, des surrénales et des reins [163]. Fait intéressant, dans les surrénales, l'ARNm a été détecté seulement chez la femelle et plus précisément dans la zone réticulée. L'ARNm a aussi été détecté au niveau de l'estomac et des testicules [119, 160]. Les données disponibles suggèrent que les profils d'expression sont relativement différents entre l'humain et la souris. En effet, chez l'humain l'enzyme se retrouve à des niveaux relativement élevés dans les tissus cibles des hormones sexuelles, ce qui n'est pas le cas chez la souris. Par ailleurs, une étude rapporte d'importantes différences dans les activités enzymatiques ainsi que les sites d'expression des isoformes AKR1C entre les deux espèces et suggère que la souris ne serait pas un modèle adéquat pour étudier, particulièrement, l'implication des AKR1C dans les cancers hormono-dépendants de la prostate et du sein [164].

Il est important de mentionner dans le cadre de cette thèse que l'ARNm de la 17 β HSD5 a été quantifié dans le poumon foetal *in vivo* chez la souris où un pic d'expression est observé chez les deux sexes lors de la montée de la production du surfactant pulmonaire [141]. De plus, l'activité 17 β HSD5 (conversion de l'androstènedione en testostérone) a été détectée *in*

in vitro dans le modèle de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 [165]. Ces travaux réalisés dans notre laboratoire ont semé les bases de l'étude présentée au chapitre III.

1.5. Les récepteurs nucléaires

1.5.1. Les récepteurs nucléaires - général

Les récepteurs nucléaires sont impliqués dans des fonctions biologiques diversifiées comme la croissance, la différenciation, le métabolisme, la morphogénèse et la reproduction. Leurs ligands sont généralement de petites molécules lipophiles comme les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, les rétinoïdes, la vitamine D, les acides gras, les leukotriènes et prostaglandines, les dérivés du cholestérol, les acides biliaires et les prégnes. Quarante-huit membres de la superfamille ont été identifiés à ce jour, dont la plupart ont des ligands connus. Les autres sont des récepteurs dits orphelins. En effet, plusieurs récepteurs ont été identifiés suite à des comparaisons de séquences, par ce qui a été appelé « l'endocrinologie inverse », où la caractérisation du récepteur précède la détermination de sa fonction physiologique. Il est toutefois possible que certains récepteurs exercent leur(s) activité(s) biologique(s) en absence de ligand(s). L'analyse des séquences en acides aminés du domaine de liaison du ligand et du domaine de liaison à l'ADN des différents membres de la superfamille a mené à une sous-classification en six familles [166, 167].

La première famille regroupe les récepteurs de l'hormone thyroïdienne (TRs), de l'acide rétinoïque (RARs), de la vitamine D (VDRs), les *peroxisomes proliferator-activated receptors* (PPARs) ainsi que des récepteurs orphelins. La deuxième famille comprend les récepteurs rétinoïdes X (RXRs), le *chicken ovalbumin upstream stimulators* (COUPs), le facteur nucléaire hépatocytaire 4 (HFN4), les récepteurs testiculaires (TR2) ainsi que les récepteurs TLX (homologue humain du gène de drosophile *tailless*) et PNR (*photoreceptor-specific nuclear receptor*). Les récepteurs stéroïdiens pour les glucocorticoïdes (GR), les minéralocorticoïdes (MR), la progestérone (PR), les androgènes (AR), les estrogènes (ER) et les récepteurs orphelins associés aux récepteurs des estrogènes

(ERR) composent la classe III de récepteurs nucléaires. Les classes IV, V, et VI sont formées respectivement par les récepteurs orphelins NGD1-B (*nerve growth factor induced gene B*), FTZ-1/SF-1 (*fushi tarazu-factor 1*) et GCNF (*Germ cell nuclear factor*) [168]. Pour une liste exhaustive récente des différents membres des six classes de récepteurs, voir [167].

1.5.1.1. Les différents domaines des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires présentent une structure modulaire composée de différents domaines fonctionnels autonomes. Le récepteur typique est formé par une région NH₂-terminale variable (A/B), d'un domaine de liaison à l'ADN conservé (DBD), d'une région de liaison D, ainsi que d'une région conservée E contenant le domaine de liaison du ligand (LBD). Certains récepteurs contiennent une région supplémentaire F en COOH-terminal de fonction jusqu'alors inconnue. Le domaine AF-1, compris dans le domaine A/B, contribue à l'activation transcriptionnelle indépendante du ligand, alors que le domaine AF-2, qui est localisé en COOH-terminal du domaine de liaison à l'ADN, contribue à l'activation transcriptionnelle strictement dépendante de la liaison du ligand.

Parmi les domaines fonctionnels, la région A/B est la plus variable en longueur et en séquence. En effet, dans le cas d'isoformes d'un type de récepteur issues d'un même gène par épissage alternatif ou par l'utilisation de promoteurs alternatifs, la région A/B diverge dans la plupart des cas. Cette région montre une activité spécifique en fonction du promoteur et du type cellulaire (voir le cas de AR-A et AR-B présenté plus bas) et peut être une cible de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation, l'ubiquitination et possiblement la glycosylation, qui peuvent agir de concert ou encore être mutuellement exclusive dans la modulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur [169]. Le domaine de liaison à l'ADN, qui est le domaine le plus conservé des récepteurs nucléaires, permet la reconnaissance et la liaison à des séquences spécifiques de gènes-cibles. Le domaine comprend deux doigts de zinc. Le premier doigt comprend les acides aminés requis pour la reconnaissance spécifique de la séquence d'ADN, alors que d'autres acides aminés présents dans le deuxième doigt sont impliqués dans la dimérisation du récepteur. La région de liaison D n'est pas très bien

conservée entre les récepteurs et sert de charnière entre les domaines de liaison à l'ADN et du ligand, permettant la rotation des domaines. Il a été rapporté que la région D contient dans plusieurs cas des signaux de localisation nucléaire ainsi que des sites d'interactions avec des protéines corégulatrices. Le domaine de liaison du ligand est multifonctionnel et, en plus de lier son ligand, est un médiateur de l'homo- ou de l'hétérodimérisation du récepteur, de l'interaction avec des protéines régulatrices, de l'activation de la transcription dépendante du ligand et dans certains cas de la répression transcriptionnelle réversible par l'hormone.

Les séquences d'ADN spécifiques reconnues par les récepteurs nucléaires, les éléments de réponses à l'hormone, sont généralement localisées dans la région promotrice du gène cible, en 5' de la portion codante. Généralement situés relativement proches du promoteur principal, les éléments de réponses se retrouvent parfois à plusieurs kilobases en amont. Les récepteurs stéroïdiens se lient presque exclusivement sous forme d'homodimères aux palindromes de la séquence consensus AGAACA séparés par trois nucléotides, à l'exception du récepteur des estrogènes qui reconnaît la séquence consensus AGGTCA. Il est à noter que de nombreuses variations de ces séquences consensus ont été identifiées.

1.5.1.2. Les différentes isoformes d'ARNm des récepteurs stéroïdiens

Les cadres de lecture ouverts des récepteurs stéroïdiens comprennent huit exons, numérotés 1-8. Les différentes isoformes d'ARNm des récepteurs sont regroupées en sept types. Le type 1 consiste en l'utilisation alternative de sites d'initiation de la transcription, le type 2 en la délétion d'un ou plusieurs exons, le type 3 en la duplication d'un ou plusieurs exons, le type 4 en l'utilisation alternative d'exons 5' non-traduits, le type 5 en l'utilisation alternative d'exons codants 8s, le type 6 en l'utilisation d'un exon « intronique » et des exons 4 ou 5 et 8 alors que le type 7 consiste en l'insertion d'exons « introniques ». La région codante du gène de AR contient les exons 1-8 et contrairement aux autres récepteurs, aucun autre type d'exon n'a été identifié. Des ARNm encodant le AR, on retrouve seulement les types d'isoformes 1 et 2.

1.5.1.3. Les corégulateurs des récepteurs nucléaires

Un nombre grandissant de corégulateurs des récepteurs nucléaires, que ce soient des coactivateurs ou des corépresseurs, ont été identifiés [170]. Ces corégulateurs peuvent être des facteurs de liaison entre le récepteur et d'autres protéines corégulatrices, des enzymes de modifications post-traductionnelles, des complexes impliqués dans le remodelage de la chromatine ou encore des complexes interagissant entre des facteurs de transcription et le complexe de l'ARN polymérase II [171]. Ces molécules permettent de moduler la spécificité d'action des récepteurs nucléaires et expliquent en partie leur très large spectre d'action en ce qui concerne l'activation ou la répression de gènes, en fonction du contexte cellulaire. Il était en effet initialement surprenant de constater le nombre de gènes dont l'expression peut être contrôlée par une seule molécule. D'autres niveaux de contrôle sont nécessairement impliqués dans ces réponses. En effet, l'élucidation des mécanismes d'activation et de répression transcriptionnelles, ainsi que la caractérisation des complexes de corégulateurs et de leurs régulations, sont les aspects de ce champ d'études qui nécessitent de plus amples recherches et qui sont les plus prometteuses. S'ajoutant à l'identification de protéines corégulatrices, il semble que la clé de la compréhension de la diversité des fonctions associées aux corégulateurs soit les modifications post-traductionnelles des protéines corégulatrices [172]. Ces modifications incluent la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitylation, la sumoylation et l'acétylation. Différentes combinaisons de ces modifications sont possibles, ce qui permet un très vaste éventail potentiel de variations d'activités et de fonctions. Ces mécanismes régulateurs participent donc à la très grande complexité de la régulation génique et protéique des récepteurs nucléaires et expliquent, du moins en partie, les variations, adaptations et évolutions biologiques qui vont au-delà des gènes composant le génome. En effet, ces mécanismes permettent une incroyable diversité sans nouveaux gènes. Par ailleurs, une ressource en ligne très intéressante à consulter est *The Nuclear Receptor Signaling Atlas* à www.nursa.org.

1.5.2. Le récepteur des androgènes (AR)

1.5.2.1. Aspects généraux

Les androgènes sont impliqués dans une multitude de réponses développementales et physiologiques et ils sont particulièrement importants pour la différenciation sexuelle et la maturation sexuelle à la puberté, le maintien de la spermatogenèse ainsi que pour la régulation des gonadotropines chez le mâle. De plus, des effets androgéniques sont observables dès les premières semaines de développement, dans plusieurs tissus, chez les deux sexes. Les effets des androgènes sont médiés par le récepteur des androgènes (AR) qui est un membre de la classe III de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ses ligands majeurs sont les androgènes testostérone et 5α -DHT. Le gène humain du récepteur des androgènes est localisé sur le chromosome X (q11-12) et contient huit exons. Il produit un ARNm d'approximativement 2760 nucléotides et une protéine d'environ 920 acides aminés. Le gène murin du récepteur des androgènes est localisé sur le chromosome X à la position 36.0 cM. Il a une longueur de 167 kb et possède 8 exons. Le messager a une longueur de 2998 pb et il produit une protéine de 98 kDa. Chez l'humain, deux formes, nommées A et B, du récepteur ont été identifiées [173, 174]. La forme A d'environ 87 kDa est une forme tronquée en N-terminal, dû à un site d'initiation de la traduction situé en aval (méthionine 188). Cette forme a été initialement identifiée dans le cadre d'une étude portant sur la féminisation testiculaire [175]. La forme B d'environ 110 kDa est la forme complète et active. Une étude au niveau protéique avec des anticorps permettant de déterminer l'abondance relative des deux formes a permis d'établir que la forme B est prédominante, et ce dans des proportions variant de ~75-95% en fonction du tissu chez l'adulte et le fœtus (14-22 semaines de gestation) [174]. Par ailleurs, dans cette étude, le niveau de AR dans le poumon fœtal était sept fois plus élevé que dans le poumon adulte, le poumon étant parmi les tissus montrant la plus grande différence d'expression entre le fœtus et l'adulte. À la lumière de cette étude, il ne semble pas qu'un tissu en particulier, adulte ou fœtal, exprime de manière spécifique l'une ou l'autre des deux formes, bien qu'une caractérisation fine de la localisation des deux formes n'ait pas été réalisée. Les activités fonctionnelles des formes A et B ont ensuite été comparées [176]. Ces expériences ont permis de confirmer le rôle de la région amino-terminale dans la capacité de transactivation du récepteur et dans sa

stabilité. En effet, les niveaux d'induction observés varient en fonction du promoteur-rapporteur utilisé ainsi qu'en fonction de la lignée cellulaire dans laquelle les expériences sont réalisées. Toutefois, les deux formes peuvent lier les androgènes et être inhibées par la présence d'inhibiteurs. La différence entre les deux formes ne se situe effectivement pas au niveau des domaines de liaison à l'ADN ou de liaison du ligand. À ce jour, aucun rôle particulier n'est attribué à la forme A du récepteur.

Le récepteur des androgènes est exprimé dans plusieurs tissus, notamment ceux impliqués dans la reproduction. Dans le système reproducteur femelle, il est exprimé par les cellules de la granulosa et interstitielles de l'ovaire ainsi que par les cellules épithéliales, stromales et musculaires lisses de l'utérus. Le AR est aussi exprimé dans la glande mammaire au niveau des cellules épithéliales des acinis, des conduits et des cellules stromales. Dans le système reproducteur mâle, le AR est exprimé par les cellules sécrétoires et stromales de la prostate, par les cellules de Sertoli, de Leydig et myoïdes du testicule, ainsi que par les cellules stromales de l'épididyme et des vésicules séminales. Le récepteur des androgènes est également exprimé dans plusieurs tissus périphériques. Par exemple, dans le cerveau, les neurones qui expriment le récepteur des androgènes sont largement distribués. Dans la peau, le AR est exprimé par les kératinocytes, les glandes sébacées, les glandes sudoripares, ainsi que dans les follicules pileux. Le AR a été détecté chez le rat, les primates et l'humain, dans l'hypophyse antérieure, la thyroïde, le cortex surrénalien, le foie, les tubules rénaux, la vessie urinaire, le muscle cardiaque et strié ainsi que dans les os [177]. L'expression du récepteur des androgènes a également été détectée dans plusieurs tissus fœtaux humains. Chez le fœtus à la fin du premier trimestre de grossesse, on retrouve l'expression de AR notamment au niveau du tractus urogénital [178], dans le thymus, l'épithélium bronchique du poumon, la moelle épinière ainsi que dans les valves cardiaques [179]. L'expression pulmonaire fœtale de AR sera détaillée plus loin.

Sous forme homodimérique libre, le AR se situe surtout dans le cytoplasme où il est associé à des protéines de choc thermique (*heat shock proteins*), des protéines du cytosquelette et d'autres chaperonnes moléculaires. Lorsque le récepteur des androgènes est activé suite à la liaison du ligand, il est importé vers le noyau où il forme généralement un homodimère qui

va se lier sur la séquence consensus des androgènes qui est 5'-AGAACANNNTGTTCT-3' [180]. De plus, il a été démontré que le AR a la capacité de former un hétérodimère avec le récepteur nucléaire orphelin TR4 (*testicular receptor 4*), ainsi qu'avec ER α , ce qui sous-entend une variabilité supplémentaire dans la réponse transcriptionnelle induite par les androgènes [181]. Tout comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, le récepteur des androgènes contient plusieurs domaines (A à E(F)), qui sont structurellement et fonctionnellement différents. La région médiane du domaine C est très conservée et agit comme le site de liaison de l'ADN, tandis que le domaine de liaison du ligand est localisé à la portion N-terminale des domaines E/F. Le domaine de liaison du ligand contient 12 hélices α qui vont former une poche réceptrice. Après la liaison du ligand, la région C-terminale de l'hélice α -12 du domaine de liaison au ligand va changer de position afin de créer un espace, tandis que les hélices 3 et 5 vont servir d'interface lors de la dissociation de complexes corépresseurs et lors de l'association de complexes coactivateurs. Durant la transactivation induite par le ligand, le domaine N-terminal A/B et le domaine de liaison du ligand vont agir en tant que régions interactives pour les complexes coactivateurs [180].

Pour des références concernant des sites de liaison de AR dans le génome de lignées cellulaires, ainsi que des sites d'autres facteurs de transcription qui collaborent avec AR (sites chevauchants ou adjacents) voir [171]. Seulement une faible proportion (environ 25%) des sites de liaison de AR contiennent un élément de réponse canonique aux androgènes, alors que la plupart des sites contiennent soit un élément non-canonique, un demi élément de réponse aux androgènes, ou encore aucun motif. Ces résultats suggèrent que l'élément de réponse aux androgènes est moins défini (par rapport à d'autres éléments de réponse à des récepteurs nucléaires) et que la liaison du récepteur des androgènes activé à l'ADN est fortement dépendante des séquences de liaison à d'autres facteurs de transcription ou encore de la structure de l'environnement local.

1.5.2.2. Corégulateurs de l'activation de la transcription par AR

Tel que mentionné ici-haut, l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes peut être modulée par de nombreuses protéines corégulatrices [182] dont l'expression varie en

fonction du tissu et du type cellulaire [183]. Celles-ci peuvent faciliter l'accès à l'ADN et le remodelage de la chromatine, moduler les interactions entre le récepteur et la machinerie de transcription (recrutement de facteurs de transcription associés avec l'holocomplexe de l'ARN polymérase II), faciliter les changements conformationnels du récepteur, la liaison du ligand, la transactivation du récepteur, la translocation nucléaire du récepteur, ou encore médier la transduction d'un signal (voie de signalisation).

La transcription induite par les récepteurs nucléaires est un processus finement exécuté où le récepteur activé se lie à son élément de réponse et les coactivateurs sont recrutés pour participer à l'établissement ou la maintenance de la décondensation de la chromatine par leurs interactions directes sur les nucléosomes ou en recrutant d'autres complexes de modifications de la chromatine. L'acétylation des résidus lysines des histones en NH₂-terminal entraîne des modifications de la structure de la chromatine en réduisant ou empêchant les contacts entre les nucléosomes, ce qui est associé à l'activation génique. Les corégulateurs de récepteurs nucléaires SRC (*steroid receptors coregulators*), caractérisés en tant qu'acétyltransférases, sont impliqués dans la régulation de la transcription dépendante de la liaison du ligand pour plusieurs récepteurs nucléaires, dont AR. Ces protéines peuvent recruter des corégulateurs additionnels comme les protéines CBP/p300 et p/CAF, qui possèdent aussi une activité acétyltransférase de spécificité variable envers les différents types d'histones.

Certains corégulateurs influencent le repliement du récepteur, la capacité de liaison du ligand, ainsi que les interactions entre les portions NH₂ et COOH du récepteur, modulant ainsi la stabilité ainsi que l'activation transcriptionnelle du récepteur. Par exemple, BAG-1L, membre de l'hétérocomplexe protéique de Hsp90, augmente la transactivation du AR en favorisant son repliement, alors que ARA70 augmente l'activité du AR en augmentant sa stabilité et son affinité. Deux membres de la famille de c-régulateurs PIAS (*protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT)*), PIAS1 et PIASx α , ont été décrits comme coactivateurs de AR. Ils augmentent la transactivation en favorisant les interactions interdomaines.

Des protéines liantes de l'actine ou encore interagissant avec des complexes de liaison de l'actine peuvent aussi agir en tant que coactivateurs. Par exemple, la β -catenin, la gelsolin et la supervillin ont été identifiées comme coactivateurs du AR dans des cellules de cancer de la prostate, alors que la filamin a été associée à la translocation nucléaire du AR. La β -catenin, en plus de son rôle dans l'adhésion intercellulaire, est un effecteur de la voie de signalisation de Wnt qui est impliquée dans la différenciation, la prolifération et la migration cellulaires.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires peut être augmentée par des facteurs qui facilitent la localisation nucléaire du récepteur activé par l'augmentation du transport ou par la séquestration dans le noyau. Peu est connu sur la capacité de corégulateurs à influencer la distribution intracellulaire des récepteurs. Par exemple, le facteur ARA24/Ran, qui est responsable de l'exportation nucléaire de molécules d'importines, augmente la transcription par le AR par des mécanismes encore indéfinis. Une augmentation de ARA24/Ran pourrait entraîner un retour plus efficace des importines vers le cytoplasme, ce qui augmenterait la translocation nucléaire de protéines, dont le complexe AR. De plus, ARA24/Ran a la capacité d'exporter des ARNm complexés à des protéines ribonucléaires, ce qui pourrait augmenter l'exportation de l'ARNm du AR vers le cytoplasme et favoriser sa traduction. Aussi, l'exportation du AR vers le cytoplasme peut favoriser son recyclage et améliorer la réceptivité cellulaire aux androgènes.

Des facteurs de croissance et des cytokines, par l'activation de différentes voies de signalisation, peuvent influencer l'activité transcriptionnelle du AR. Ces stimulations par des kinases affectent la transcription par la phosphorylation du récepteur, de facteurs de transcription associés ou de protéines corégulatrices. Par exemple, la phosphorylation de Smad3 et de STAT3 sous l'influence de facteurs de croissance module l'activité du AR. Le AR peut être une cible directe de phosphorylation par la kinase Akt, membre de la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Cette phosphorylation provoque une baisse d'activité du AR qui est associée à la perte d'interaction entre AR et ARA70. Cependant, il a été montré qu'une stimulation par les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) amène l'effet inverse. Certains corégulateurs exercent sur la chromatine ou sur

d'autres corégulateurs des activités de phosphorylation et d'acétylation. Par exemple, le facteur CBP, qui a la capacité de médier les effets de certaines voies de signalisation, montre une activité acétyltransférase sur les histones, mais aussi sur d'autres facteurs et cette activité peut être modifiée par phosphorylation.

La répression transcriptionnelle des différents types de récepteurs nucléaires semblent s'effectuer selon des mécanismes différents. Les récepteurs stéroïdiens classiques forment un complexe protéique avec des protéines de choc thermique lorsqu'ils ne sont pas activés, alors que les récepteurs de type RXR peuvent lier l'ADN en absence de ligand, ce qui mène à la répression de la transcription. Peu de répresseurs spécifiques du AR ont été identifiés. Par exemple, la cycline D1 inhibe la transactivation du AR par un mécanisme indépendant de sa fonction dans la régulation du cycle cellulaire. La calciréticuline, suite à sa liaison au AR, empêche la liaison de ce dernier à l'ADN, alors que le facteur HBO1, membre de la famille de protéines MYST, est un corépresseur du AR malgré qu'il possède une activité acétyltransférase.

1.5.2.3. Actions non-classiques des androgènes et de AR

Le AR, en plus de ses actions en tant que facteur de transcription, est impliqué dans plusieurs voies de signalisation qui sont principalement caractérisées par des réponses cellulaires rapides ne nécessitant ni transcription ni traduction (pour des synthèses pertinentes concernant ce champ d'étude, voir [184], [185], [186] et [181]). Des effets non-classiques ont été décrits notamment au niveau du testicule, de la prostate, de l'ovocyte, du système immunitaire, du système cardiovasculaire et du muscle squelettique. Ces effets non-génomiques, ou non-classiques, peuvent être initiés à la membrane plasmique, principalement, ou encore dans le cytoplasme, et peuvent mener par exemple à un relâchement de calcium intracellulaire ou à l'activation de protéines kinases telles que les MAPKs, la protéine kinase A, la kinase Akt ou la protéine kinase C. Il a aussi été proposé que les mécanismes de régulation non-génomique aient dans certains cas un impact sur la transcription de gènes. Toutefois, en ce qui concerne AR, il semble que ces interactions puissent se produire en présence ou en absence de ligand. De plus, des effets non-classiques des androgènes dans certaines situations semblent aussi impliquer d'autres récepteurs que

le AR ou une forme membranaire ou associée à la membrane de AR, par exemple le récepteur de SHBG (*steroid hormone-binding globulin*) et le récepteur GABA_A (*gamma-aminobutyric acid A*), ainsi que d'autres récepteurs non-identifiés à ce jour. Les possibles implications d'effets non-classiques des hormones sexuelles dans le poumon en développement sont brièvement discutées à l'annexe 1.

1.5.2.4. Pathologies associées à AR

Des anomalies de AR peuvent mener à l'hypogonadisme, à l'hyperplasie bénigne de la prostate, à la perte capillaire, au syndrome d'insensibilité aux androgènes, au syndrome de Kennedy (atrophie musculaire spinale et bulbaire), ainsi qu'à la formation et la progression du cancer de la prostate. Le AR a été particulièrement étudié pour son implication dans le cancer de la prostate, qui est d'importance majeure chez les hommes âgés. Une base de données pertinente concernant les mutations de AR et leurs liens avec différentes pathologies est accessible en ligne à l'adresse suivante : <http://androgendb.mcgill.ca/>. D'un point de vue thérapeutique, les récepteurs nucléaires sont des cibles intéressantes pour l'élaboration d'antagonistes, stéroïdiens ou non [187]. Cependant, le défi dans ce champ d'étude réside dans la conception de modulateurs sélectifs, considérant le large spectre d'action de ces récepteurs. D'importance majeure dans le cadre de cette thèse, les effets néfastes des androgènes sur le poumon fœtal en cas de naissance prématurée seront décrits plus loin.

1.5.2.5. Modèles AR-KO

Plusieurs modèles de souris transgéniques, générés principalement par une stratégie Cre-loxP [188], ont été élaborés pour caractériser les fonctions de AR, surtout au niveau du système reproducteur. Des articles récents passent en revue les différents modèles de AR *knockout* et *knockin* [181, 189, 190]. Brièvement, on retrouve le modèle Tfm, cinq modèles *knockout* ARKO total où différents exons (1, 2 ou 3) du gène de AR sont excisés, des modèles où AR est inactivé spécifiquement au niveau des cellules de Sertoli (SCARKO), des cellules de Leydig, des cellules germinales, des cellules myoïdes périvitubulaires ou des cellules épithéliales de la prostate, ainsi que les *knockin* AR113Q, où un domaine répété est

ajouté dans la région NTD, et SPARKI, où la spécificité de liaison à l'ADN du AR est altérée. L'étude des phénotypes obtenus tant chez les mâles que chez les femelles permet de mettre en lumière différents rôles de la signalisation par les androgènes.

1.6. Différences sexuelles et androgènes dans le développement pulmonaire

1.6.1. Effets des androgènes sur la maturation pulmonaire

Une plus grande incidence du syndrome de détresse respiratoire chez les nouveau-nés garçons par rapport aux filles a été rapportée par plusieurs études [20, 191-193]. Les thérapies de surfactants ont notablement réduit la mortalité associée au SDR chez les deux sexes, cependant les garçons présentent toujours une plus grande morbidité que les filles [5]. Un délai de la maturation pulmonaire chez les mâles a été associé à la présence d'androgènes dans le poumon fœtal, notamment par les travaux de JS Torday et HC Nielsen. En effet, différents modèles expérimentaux d'exposition à des androgènes ou à un anti-androgène ont été utilisés pour démontrer que la présence d'androgènes retarde la production du surfactant pulmonaire [151, 194, 195]. De plus, il a été démontré à l'aide d'un modèle de souris présentant un récepteur aux androgènes non-fonctionnel que l'effet des androgènes sur la maturation pulmonaire implique un mécanisme qui est dépendant de la présence d'un récepteur fonctionnel [196]. L'implication des androgènes dans les mécanismes menant à la différence sexuelle observée au niveau de la maturation pulmonaire fœtale a été abordée par plusieurs études, brièvement présentées ci-dessous.

L'indicateur de maturité pulmonaire qu'est le rapport entre le niveau de phosphatidylcholine saturée et celui de sphingomyéline dans le liquide amniotique est plus faible chez les mâles lorsque comparé aux femelles (à certains temps de gestation précis) et est diminué suite à l'administration de 5α -DHT aux femelles gestantes chez le lapin [151]. Parmi les premiers médiateurs identifiés des effets androgéniques sur la maturation pulmonaire figure le *fibroblast-pneumonocyte factor* (FPF). Malgré que ses composants protéiques exacts n'aient pas été déterminés, son activité fut définie par la capacité d'un milieu de culture conditionné par des fibroblastes pulmonaires fœtaux à stimuler la

production de surfactant par des pneumocytes de type II. Une production retardée du facteur FPF chez les mâles par rapport aux femelles ainsi qu'une capacité de la 5 α -DHT à réduire l'activité FPF ont été observées à partir de cultures de fibroblastes pulmonaires fœtaux [197]. Plus précisément, cette étude montre qu'une administration *in vitro* de 5 α -DHT bloque l'induction de l'activité FPF par les glucocorticoïdes, mais n'a pas d'effet sur la différence sexuelle basale dans la production de FPF, alors qu'une administration *in vivo* de 5 α -DHT retarde la production non stimulée de FPF par les cellules en culture. Parce qu'elle est sécrétée par les fibroblastes pulmonaires fœtaux et qu'elle mime l'activité FPF, la neuréguline-1 β a été proposée plusieurs années plus tard comme étant la principale protéine contribuant à l'activité FPF [61]. Dans des explants pulmonaires de rat au JG 19.0, la 5 α -DHT réduit le niveau d'incorporation du palmitate à la phosphatidylcholine disaturée des femelles à celui retrouvé chez les mâles [198]. De plus, l'ajout de 5 α -DHT au milieu de culture d'explants de poumons fœtaux humains retarde l'augmentation spontanée ou induite par les glucocorticoïdes de la synthèse de phosphatidylcholine saturée [194]. Il a aussi été démontré à l'aide d'un inhibiteur de l'activité 5 α -réductase que les mécanismes menant au retard de maturation pulmonaire chez le mâle peuvent être régulés par la testostérone, suggérant ainsi que l'activité 5 α -réductase, qui permet la conversion de la testostérone en 5 α -DHT, n'est pas requise pour la différence sexuelle [199]. La liaison spécifique du facteur de croissance épidermique (EGF) en fin de gestation est augmentée plus tôt dans les fibroblastes pulmonaires fœtaux femelles (*i.e.* JG 18.0) que dans ceux isolés de mâles (*i.e.* JG 19.0) [200], alors qu'un délai dans l'activité de liaison du récepteur d'EGF est induit par les androgènes durant le développement pulmonaire fœtal chez le lapin [201]. Une diminution de la liaison spécifique du facteur de croissance transformant- β 1 (TGF- β 1) a été observée avec l'avancement de la gestation dans les fibroblastes pulmonaires fœtaux chez la souris [202]. Cette diminution survient plus tôt et est plus prononcée chez les fibroblastes isolés de femelles que chez ceux isolés de mâles. De plus, le traitement de fibroblastes isolés de femelles avec de la 5 α -DHT résulte en une augmentation dépendante du dosage de la liaison de TGF- β 1 [202]. D'un autre côté, les poids pulmonaires humide et sec de même que les concentrations d'ADN et de protéines

sont augmentés par l'administration de 5α -DHT chez le rat, ce qui démontre que les androgènes stimulent la prolifération cellulaire et la croissance pulmonaire [203].

1.6.2. Hormones sexuelles en circulation fœtale

Durant son développement, le poumon fœtal est exposé aux hormones sexuelles présentes dans la circulation fœtale et qui proviennent de la mère et du fœtus. Durant la grossesse chez l'humain, l'androstènedione, le DHEA et le DHEA-sulfate produits par les surrénales maternelles et fœtales sont les précurseurs stéroïdiens C19 principaux dans la synthèse d'hormones sexuelles actives [204]. Chez la souris, l'ovaire est la source majeure de stéroïdes C19 jusqu'à la mi-gestation alors qu'une transition vers une production placentaire d'androstènedione est observée [205, 206]. Les estrogènes sont produits par le placenta chez l'humain et l'ovaire maternel chez la souris. La différenciation sexuelle mâle mène à la sécrétion de testostérone par les testicules fœtaux. Une partie de cette testostérone se retrouve en circulation fœtale. Chez l'humain, cette sécrétion débute autour de la 8^e semaine de grossesse, est plutôt élevée entre les 10^e et 17^e semaines de grossesse, alors que la différence maximale entre les niveaux sériques de testostérone entre les mâles et les femelles survient entre les 12^e et 18^e semaines de grossesse [207, 208]. Après la 24^e semaine, les niveaux de testostérone sont relativement bas chez les deux sexes. Chez la souris, la sécrétion de testostérone par les testicules fœtaux débute autour du JG 12.5-13.0, atteint un sommet au JG 15.5-16.0 pour ensuite diminuer. Il est important de noter qu'autant chez l'humain que chez la souris le pic de production de testostérone par les testicules fœtaux survient avant la montée de la production du surfactant pulmonaire, qui survient au JG 17.5 chez la souris et autour des semaines 28 à 34 de grossesse chez l'humain. La dihydrotestostérone, la testostérone, l'androstènedione et l'estradiol ont été quantifiées dans les poumons fœtaux mâles et femelles chez la souris pendant les stades canaliculaire, sacculaire et alvéolaire [209]. Une différence sexuelle dans les niveaux de testostérone et d'androstènedione a été observée. Voir la figure 4 pour une représentation schématique mettant en perspective les stades de développement pulmonaire, les niveaux d'hormones circulantes et la période de montée de la production du surfactant et ce, chez l'humain et la souris.

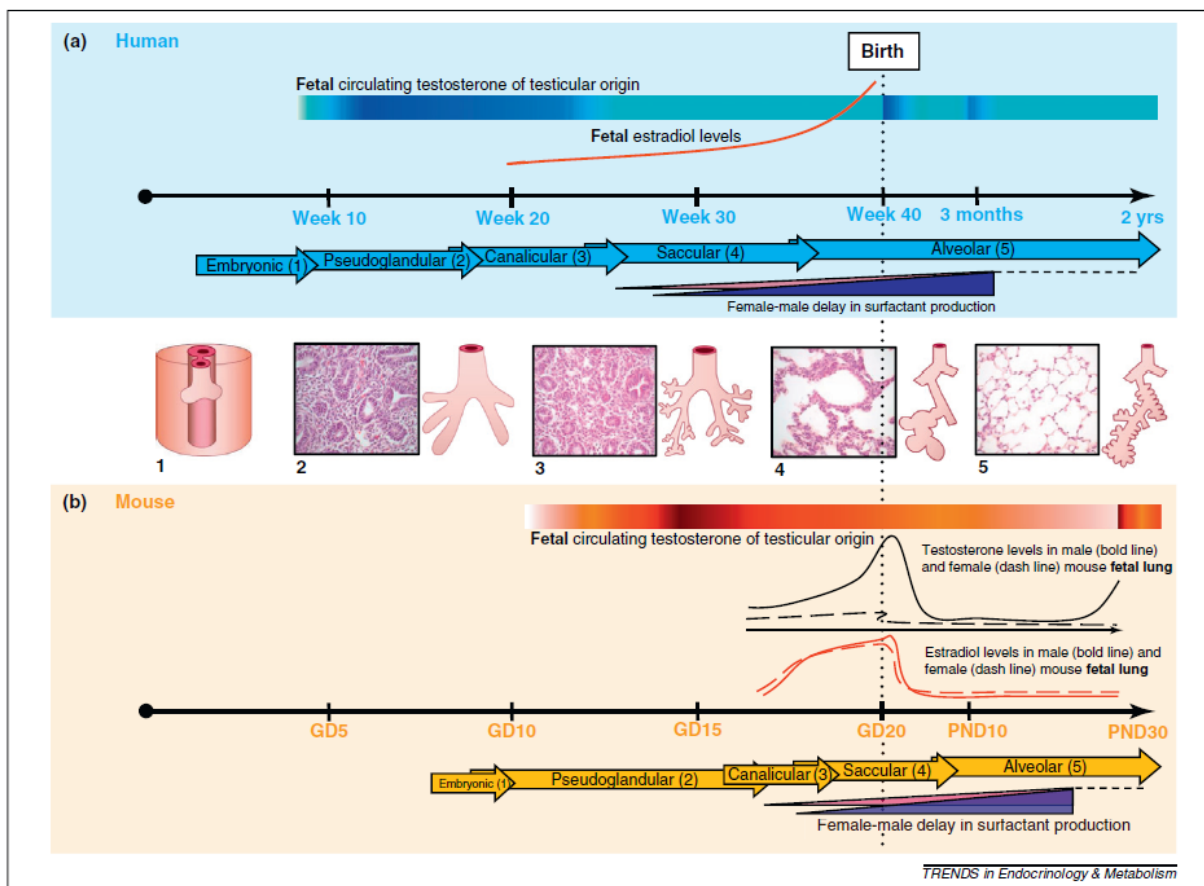


Figure 4: Stades de développement pulmonaire chez l'humain (a) et la souris (b) en relation avec les niveaux de testostérone et d'estradiol en circulation fœtale et dans le poumon fœtal

Les niveaux d'hormones dans le poumon fœtal humain et les niveaux d'estradiol dans la circulation fœtale chez la souris ne sont pas disponibles, alors que les niveaux d'estradiol dans la circulation fœtale chez l'humain ne sont pas disponibles individuellement pour chaque sexe. La production de surfactant est représentée par des triangles rose et bleu pour les femelles et les mâles, respectivement. Les différents stades histologiques du développement pulmonaire sont présentés par des schémas et des photographies de coupes de tissus pulmonaires (schéma seulement pour le stade embryonnaire). Les niveaux fœtaux de testostérone en circulation sont représentés par des bandes de couleurs dans lesquelles le gradient de couleur indique le niveau d'hormone (plus foncé correspond à plus élevé). Tirée de : [210].

1.6.3. Enzymes stéroïdéniques exprimées par le poumon fœtal

Un métabolisme stéroïdien survient au niveau de plusieurs tissus non endocriniens comme le cerveau, l'endomètre, le tissu adipeux, la peau et le poumon, chez l'adulte ainsi que chez

le fœtus. Dans ces tissus, l'occupation des récepteurs stéroïdiens peut être régulée par la conversion de précurseurs en hormones biologiquement actives ou encore par la conversion d'hormones actives en formes peu ou pas actives. Tel que mentionné ci-dessus, le poumon fœtal est exposé à des précurseurs stéroïdiens ainsi qu'à des hormones actives. Notamment, l'expression et l'activité de plusieurs enzymes stéroïdogéniques ont été caractérisées dans le poumon fœtal. Cet aspect est détaillé ci-dessous. Pour des informations complémentaires, voir l'article de synthèse présenté en annexe 1.

Plusieurs études de L Milewich ont démontré la présence d'activités stéroïdogéniques dans le poumon et les cellules pulmonaires chez le fœtus [211, 212] et l'adulte [213-223] par des approches d'enzymologie classique en utilisant des stéroïdes radioactifs. De plus, bien qu'il semble que le poumon fœtal ait une capacité limitée ou inexistante à produire des stéroïdes sexuels à partir du cholestérol due à l'absence de l'enzyme P450c17, qui permet la conversion des progestines en androgènes, plusieurs enzymes agissant sur les précurseurs immédiats des hormones sexuelles ou encore directement sur ces dernières ont été détectées dans le poumon en développement. Une synthèse des informations disponibles dans la littérature ainsi que les voies de synthèse impliquées sont présentées à l'annexe 1 (voir tableau 1 et figure 2).

Les enzymes 17β HSDs, 5α -réductases et 3β HSDs exercent leurs actions sur les précurseurs immédiats de la testostérone (androstènediol et androstènedione) et/ou de la 5α -DHT (5α -androstanedione et testostérone), qui sont les androgènes les plus biologiquement actifs (figure 2). Certaines isoformes de ces enzymes ont été détectées, en utilisant différentes approches expérimentales, dans le poumon fœtal chez l'humain et la souris (annexe 1; tableau 1). D'intérêt particulier dans cette thèse, les études ayant servi de base à celle présentée au chapitre III seront présentées ci-dessous. L'état actuel des connaissances sur la régulation des androgènes par le poumon fœtal est discuté au chapitre V, ainsi qu'à l'annexe 1.

L'expression génique ainsi que l'activité enzymatique de la 17β HSD de type 5 ont été détectées dans la lignée de cellules épithéliales pulmonaires A549 [165]. Cette lignée

cellulaire qui a été isolée d'un adénocarcinome pulmonaire humain est un modèle de PTH largement utilisé, entre autres, dans l'étude du métabolisme du surfactant. En effet, ces cellules ont la capacité de synthétiser la phosphatidylcholine disaturée *in vitro*. Par ailleurs, elles expriment le récepteur des androgènes ainsi que le récepteur des glucocorticoïdes. Le métabolisme des androgènes à partir des précurseurs surrénaliens C19 a été investigué dans ces cellules. Dans cette étude où des tests d'activités stéroïdogéniques en cellules intactes ainsi qu'en homogénats cellulaires fractionnés (cytosol et microsomes) utilisant des stéroïdes tritiés ont été réalisés, les cellules A549 ont notamment montré une capacité à transformer le DHEA en androstènediol, l'androstènedione principalement en testostérone et la 5 α -DHT en 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol. Une analyse des niveaux d'ARNm de différentes isoformes d'enzymes potentiellement impliquées dans ce métabolisme stéroïdien suggéra que les enzymes prédominantes associées au métabolisme observé sont la 17 β HSD de type 5 et la 3 α HSD de type 3. L'ARNm de la 17 β HSD de type 4 a aussi été détecté, alors que de très faibles niveaux d'ARNm et d'activité de 3 β HSD de type 1 et de 5 α -réductase de type 1 ont été mesurés. Bien que les glucocorticoïdes aient un effet sur certains composants du surfactant, l'utilisation dans cette étude de sérum exempt de stéroïde ou encore l'ajout de dexaméthasone aux milieux de culture n'ont pas altéré le profil stéroïdogénique. Il semble donc que, dans ces cellules, la production et la sécrétion de testostérone sont relativement importantes, alors que la 5 α -DHT est plutôt rapidement inactivée de manière intracrine.

Faisant suite à la caractérisation des capacités stéroïdogéniques des cellules épithéliales A549 et considérant que des interactions entre le mésenchyme et l'épithélium pulmonaire sont impliquées dans les processus de maturation qui mènent à la synthèse du surfactant, le métabolisme des androgènes par les fibroblastes pulmonaires humains fut abordé [150]. En effet, les androgènes exerçant sur les fibroblastes une part importante de leurs effets négatifs sur la maturation, il devenait intéressant d'évaluer la capacité de ces cellules à réguler les niveaux d'androgènes auxquels ils sont exposés. Plusieurs lignées de fibroblastes pulmonaires normaux, diploïdes, isolées de poumons fœtaux et néonataux mâles et femelles ont été incluses dans cette étude. La caractérisation de leur métabolisme stéroïdien révéla une incapacité à produire des androgènes actifs, mais une capacité

variable, selon les lignées étudiées, d'inactivation des androgènes par l'activité de la 17 β HSD de type 2 et de la 5 α -réductase de type 1. Fait intéressant, la testostérone ne semble pas être un substrat de la 5 α -réductase dans ces cellules. En effet, une efficacité de transformation beaucoup plus grande de l'androstènedione par rapport à la testostérone a été observée ainsi qu'une très faible formation de 5 α -DHT par les fibroblastes. La 5 α -réductase de type 1 contribue plutôt ici à métaboliser le produit de la réaction catalysée par la 17 β HSD de type 2, participant ainsi à la voie d'inactivation de la testostérone. De plus, l'existence de deux « populations » parmi les lignées de fibroblastes a été proposée suite à l'analyse des niveaux d'ARNm de la 17 β HSD2. Toutefois, il ne semble pas que ces niveaux d'expression soient reliés à l'âge ou au sexe. Ces derniers résultats amenèrent à suggérer : 1) l'existence de deux sous-populations distinctes de fibroblastes avec des niveaux différents de 17 β HSD2 et 2) l'existence d'une variation allélique du gène HSD17B2 qui pourrait influencer la prédisposition au syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né.

Les résultats obtenus de ces deux dernières études ont permis d'élaborer un modèle préliminaire de stéroïdogénèse pulmonaire fœtale. Celui-ci propose que l'occupation du récepteur des androgènes au niveau des fibroblastes pulmonaires soit déterminée par la sécrétion de testostérone par les cellules épithéliales de type II et par la capacité des fibroblastes à inactiver la testostérone. Ce modèle doit être considéré avec prudence étant donné que les données issues de modèles cellulaires pourraient ne pas s'appliquer à la situation *in vivo*.

Par la suite, une étude ontogénique des 17 β HSDs de type 2 et 5 ainsi que du récepteur des androgènes a été réalisée au niveau du poumon fœtal murin dans une période de gestation qui chevauche la montée de la production du surfactant [141]. En effet, les niveaux d'ARNm des gènes d'intérêt ont été quantifiés par PCR en temps réel dans des ADNc préparés à partir d'ARN extraits de poumons fœtaux mâles et femelles prélevés aux JG 15.5, 16.5, 17.5 et 18.5. Le gène de la protéine de surfactant SP-C ainsi qu'une courte liste de gènes reconnus pour être impliqués dans les processus de maturation pulmonaire ont aussi été mesurés. La souris semble être un bon modèle expérimental puisque chez cette

espèce, une différence sexuelle dans la montée de production du surfactant été démontrée au JG 17.5 et les androgènes ont un effet négatif sur la maturation pulmonaire. De plus, les gènes des isoformes d'enzymes stéroïdiennes étudiées précédemment dans des lignées cellulaires humaines ont des orthologues murins (alors que, par exemple, la 17 β HSD de type 5 n'a pas été identifiée chez le rat). Il a été montré que l'expression des 17 β HSDs de type 2 et 5 augmente en corrélation avec l'émergence des cellules PTII matures et ce, dans les poumons fœtaux des deux sexes. Par contre, le récepteur des androgènes n'a pas montré de variation d'expression en fonction du temps ou du sexe pendant la période étudiée. Au JG 15.5, une différence sexuelle en faveur des femelles dans l'expression des 17 β HSDs de type 2 et 5 fut observée. Cependant, en regard du rapport entre le niveau d'expression de la 17 β HSD de type 2 et celui de la 17 β HSD de type 5, de manière générale il semble que l'inactivation de la testostérone soit favorisée aux JG 15.5 et 16.5, alors que l'inverse se produit aux JG 17.5 et 18.5. Il est à noter que ces interprétations sont spéculatives puisqu'il s'agit de niveaux d'ARNm, que les quantifications d'expression génique ont été réalisées à partir de poumons complets et que les sites d'expression des gènes étudiés n'ont pas été caractérisés *in vivo*. Lorsque les portées sont analysées individuellement, les niveaux d'expression des deux enzymes montrent une différence sexuelle au JG 17.5, en faveur des mâles ou des femelles selon la portée étudiée. Ce profil d'expression pourrait s'expliquer par un court pic d'expression légèrement décalé dans le temps entre les deux sexes et dont les mesures sont biaisées par la fenêtre d'accouplement utilisée. Le profil d'expression de la 17 β HSD de type 5 ne semble donc pas expliquer la plus grande quantité d'androgènes retrouvée dans le poumon fœtal mâle. Toutefois, il est des plus intéressant de constater que le poumon fœtal chez les deux sexes a la capacité de synthétiser et d'inactiver des androgènes actifs. Il a été suggéré que la production d'androgènes après l'émergence des PTII matures pourrait être impliquée dans la régulation négative du processus de maturation.

Les trois études décrites ci-dessus ont jeté les bases de plusieurs études dans le laboratoire du Dr Tremblay, dont celle présentée au chapitre III.

1.7. Les glucocorticoïdes dans le développement pulmonaire

1.7.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien – général

Les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans l'homéostasie ainsi que dans de nombreux processus physiologiques, par exemple au niveau du système immunitaire. Leur production au niveau de l'organisme dépend de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (*hypothalamo-pituitary-adrenal*, HPA) [224]. Chez l'homme, le glucocorticoïde actif est le cortisol, alors que chez les rongeurs il s'agit de la corticostérone et ce, dû à des différences entre les espèces au niveau de l'expression d'enzymes stéroïdogéniques dans la surrénale [107]. Lorsqu'ils sont en circulation, les glucocorticoïdes se trouvent majoritairement couplés à une globuline de liaison aux corticostéroïdes (*corticosteroid-binding globulin*, CBG) [225], à l' α_2 -globuline ou à l'albumine. Les glucocorticoïdes peuvent être, au niveau du foie, conjugués en dérivés sulfates ou glucuronides qui sont ensuite éliminés par voie biliaire ou urinaire.

Le stress est le principal signal activateur de l'axe HPA. La corticolibérine (CRH) est libérée par l'hypothalamus, transportée par la circulation portale vers l'hypophyse antérieure où elle va lier le récepteur de CRH de type 1 (CRH-R1) [226]. L'activation de ce dernier mène à la sécrétion de l'adrénocorticotropine (ACTH) par les cellules corticotrophes de l'hypophyse. L'ACTH est produite suite au clivage de son précurseur proopiomélanocortine (POMC) par différentes prohormones convertases [227]. Ce précurseur mène à la production de plusieurs hormones, dont γ_3 -MSH (*melanocyte-stimulating hormone*), ACTH et β -LPH (*lipotropin*). On retrouve ensuite γ_2 -MSH à partir de γ_3 -MSH, α -MSH et CLIP (*corticotropin-lipotropin precursor*) à partir d'ACTH, γ -LPH et β -end (*endorphin*) à partir de β -LPH, et finalement β -MSH à partir de γ -LPH. La sécrétion d'ACTH peut être influencée positivement par les catécholamines et différentes cytokines ou encore négativement par l'oxytocine qui agissent directement au niveau de l'hypothalamus. L'ACTH présente en circulation va lier son récepteur, MC2R, au niveau de la surrénale pour induire la synthèse et la libération de glucocorticoïdes par la zone fasciculée de la glande, qui est l'organe majeur de sécrétion des glucocorticoïdes dans

l'organisme [110]. Par ailleurs, les zones glomérulée et réticulée de la glande surrénalienne produisent respectivement les minéralocorticoïdes et les précurseurs androgéniques C19. Le MC2R lorsque lié active l'adénylate cyclase, menant à une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique qui amorce la biosynthèse des corticostéroïdes. Les glucocorticoïdes en circulation exercent une rétroaction négative sur la synthèse et la sécrétion de CRH et d'ACTH au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus.

1.7.2. Le récepteur des glucocorticoïdes et son activité transcriptionnelle

Les glucocorticoïdes endogènes et exogènes peuvent influencer directement et/ou indirectement l'expression de plusieurs gènes suite à leur liaison avec leurs récepteurs [228]. Les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) sont maintenus dans le cytoplasme en état inactif par leur association avec d'autres protéines, comme par exemple des protéines de choc thermique telles Hsp90, Hsp70 et Hsp23. D'une importance majeure, Hsp90 maintient le récepteur dans un état de forte affinité et le séquestre dans le cytoplasme en désactivant le signal de translocation nucléaire [229]. Lorsque les glucocorticoïdes se lient au GR, il y a dissociation de ce complexe protéique chaperon, translocation nucléaire du récepteur activé, homodimérisation du récepteur, fixation sur une séquence d'ADN appelé GRE (*Glucocorticoid Responsive Element*) qui se retrouve dans la région promotrice des gènes cibles, recrutement de coactivateurs transcriptionnels et activation (ou répression) de l'expression de gènes cibles. Le complexe hormone-récepteur peut aussi influencer indirectement l'expression génique, en se liant par exemple à un autre facteur ou complexe de facteurs de transcription plutôt que directement à l'ADN. Le type de ligand, les modifications post-traductionnelles du récepteur, ainsi que le nombre et le positionnement des GRE sont aussi des paramètres qui influencent la transcription.

Le récepteur des glucocorticoïdes fait partie de la superfamille de récepteurs nucléaires [230]. Son organisation fonctionnelle est similaire à celle des autres récepteurs stéroïdiens (voir section 1.5). Il est essentiellement régulé via sa localisation cellulaire, ses modifications post-traductionnelles par phosphorylation, ubiquitination ou sumoylation et ses interactions avec des cofacteurs protéiques [231]. Contrairement aux autres récepteurs

nucléaires, de nombreuses isoformes du GR ont été identifiées chez l'humain [232]. Ce polymorphisme s'explique principalement par différents épissages de l'ARNm de hGR. Plusieurs promoteurs dirigent la spécificité d'expression cellulaire. Les deux formes majeures de hGR sont les hGR α et hGR β et diffèrent par un épissage alternatif de l'exon 9. Le hGR α est considéré comme la forme active du récepteur et peut être traduit à partir de plusieurs sites d'initiation de la traduction, ce qui mène à différentes isoformes fonctionnelles mais montrant des capacités d'activation et des localisations cellulaires différentes. Le hGR β , dont l'expression est moins large dans l'organisme, est plutôt considéré comme un dominant négatif du hGR α par sa capacité à entrer en compétition pour les sites GRE, ses capacités à former un hétérodimère inactif avec hGR α ou encore en liant les cofacteurs transcriptionnels nécessaires à l'activation de la transcription par hGR α [233, 234]. Contrairement à hGR α , hGR β est essentiellement localisé dans le noyau et ne lie pas les glucocorticoïdes. Des isoformes appelées hGR γ , hGR-A et hGR-P présentant des arrangements d'exons différents ont aussi été identifiées et associées à différentes pathologies ou syndrome de résistance aux glucocorticoïdes. Chez la souris, la forme active du récepteur est aussi appelée GR α , alors qu'un GR β a été récemment identifié [235]. Il est à noter que la caractérisation des différentes isoformes du GR a été réalisée de manière beaucoup plus importante chez l'humain que chez la souris. Donc, de multiples promoteurs, une diversité d'événements d'épissage alternatif, plusieurs sites potentiels d'initiation de la traduction ainsi que des polymorphismes d'un seul nucléotide contribuent à la diversité d'expression du GR et de réponses physiologiques aux glucocorticoïdes.

Les éléments de réponses aux glucocorticoïdes situés dans la région promotrice de gènes cibles consistent en une séquence nucléotidique composée de deux hexamères séparés par trois nucléotides. La séquence consensus associée est GGTA $CAnnn$ TGTTCT, cependant de nombreuses séquences ont été identifiées [236]. En effet, il y aurait plus de 300 séquences GRE pouvant être liées par GR [237]. Les GRE peuvent activer ou réprimer la transcription. Par exemple, les gènes POMC et CRH possèdent dans leur région promotrice des éléments de régulation négative qui répondent aux glucocorticoïdes et participent ainsi à la boucle de rétroaction négative de l'axe HPA [238]. Par ailleurs, les GREs peuvent aussi être liés par d'autres récepteurs stéroïdiens, notamment par le récepteur des

minéralocorticoïdes et le récepteur de la progestérone, avec différentes affinités, ce qui ajoute à la complexité des réponses hormonales [239].

1.7.3. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien au cours de la période fœtale

La boucle de rétroaction négative des glucocorticoïdes implique l'hypophyse, l'hypothalamus et l'hippocampe. En effet, le contrôle de l'axe HPA semble se faire au niveau de l'hippocampe. Durant le développement, la production de glucocorticoïdes commence aux alentours du JG 14 et montre un pic à la naissance. Des expériences réalisées sur un modèle de souris où le GR est muté ont permis d'établir que POMC et CRH sont sous le contrôle négatif des glucocorticoïdes à partir du JG 16.5 [240]. Ces résultats sous-tendent aussi que plusieurs éléments de l'axe HPA sont actifs pendant le développement fœtal. Un détail intéressant est que l'expression du récepteur des minéralocorticoïdes n'est pas influencée par la perte de GR au niveau de l'axe HPA.

L'activité de l'axe HPA fœtal débute environ à la mi-grossesse chez l'humain [241, 242]. Le CRH d'origine placentaire et hypothalamique mène à la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse fœtale, qui participe à la maturation fonctionnelle de la glande surrénale et à la production par cette dernière de stéroïdes. La glande surrénale fœtale diffère de la glande adulte de par la présence d'une zone dite « fœtale », qui est le site de production principal de DHEA-S. Ce dernier servira de substrat pour la synthèse d'estrogènes par le placenta. La zone définitive de la glande produit les minéralocorticoïdes, alors que la zone transitoire produit du cortisol *de novo* et ce à partir de la 28^e semaine de grossesse. Bien qu'environ un tiers des variations dans les niveaux de cortisol en circulation fœtale soit attribuable au niveau de cortisol maternel, les réponses fœtales aux stress semblent indépendantes des réponses maternelles. Une production adéquate de glucocorticoïdes avant et pendant la naissance est nécessaire à l'adaptation du fœtus à la vie extra-utérine. Il est intéressant de mentionner que l'administration exogène de glucocorticoïdes en période anténatale ou en période post-natale peut mener à des perturbations dans la maturation de l'axe HPA, entraînant des conséquences physiologiques et comportementales [243].

Les glucocorticoïdes, pendant le développement fœtal, sont impliqués dans la maturation de plusieurs organes [244, 245]. Les niveaux de ces hormones augmentent de manière importante dans la circulation pendant le dernier tiers de la gestation. Par exemple, le cerveau, le foie, le rein, la thyroïde, le thymus, le tractus intestinal et le poumon sont des cibles de ces hormones. Notamment, les glucocorticoïdes contribuent au remodelage des dendrites et des axones au niveau du cerveau, à l'induction des enzymes de la gluconéogenèse dans le foie, ainsi qu'à l'induction des pompes ioniques et des enzymes digestives au niveau du rein et de l'intestin, respectivement. Le poumon fœtal étant central dans le cadre de cette thèse, les effets des glucocorticoïdes sur ce tissu seront détaillés plus précisément.

1.7.4. Effets des glucocorticoïdes sur le développement pulmonaire fœtal

Les glucocorticoïdes endogènes jouent un rôle primordial dans la régulation du développement pulmonaire. En fin de grossesse, la production de cortisol fœtal augmente parallèlement à une plus forte expression du récepteur des glucocorticoïdes. Ce message endocrinien vers le poumon a pour conséquence la stimulation de la maturation pulmonaire. Plusieurs changements qui mènent à l'amélioration des fonctions respiratoires sont sous l'effet des glucocorticoïdes, par exemple: la différenciation des cellules mésenchymateuses et épithéliales, l'élimination du liquide intrapulmonaire, la glycogénolyse et l'induction de la synthèse des composants du surfactant par les pneumocytes de type II. Les glucocorticoïdes influencent aussi l'expression de certains médiateurs inflammatoires, de facteurs de croissance et d'enzymes antioxydantes [246, 247]. Les facteurs TGF β , EGF et FGF dont les implications dans le développement pulmonaire sont bien connues sont aussi sous l'influence des glucocorticoïdes [248, 249]. Ces hormones stimulent les cellules PTII à augmenter leur production de phospholipides [250] et participent à la régulation des protéines du surfactant, ce qui mène à une production et une sécrétion accrues de surfactant. Les glucocorticoïdes, lorsqu'administrés pour accélérer la maturation, peuvent avoir certains effets négatifs par l'inhibition de la septation conduisant à une réduction du nombre d'alvéoles et à des alvéoles plus grandes ainsi qu'à une réduction de la croissance pulmonaire. L'expression de VEGF, qui est impliqué dans les processus d'alvéolisation,

peut aussi être perturbée par les glucocorticoïdes [247]. Donc, une accélération de la maturation peut se produire au détriment de la croissance et du développement du poumon fœtal. Il est intéressant de mentionner que d'un point de vue évolutif, la réponse du poumon fœtal à une augmentation du niveau de glucocorticoïdes est une stratégie de survie en réponse à un signal de stress qui peut protéger le fœtus en cas de naissance prématurée.

Plusieurs modèles murins ont été utilisés pour démontrer les effets et l'importance physiologique des glucocorticoïdes sur le développement pulmonaire ainsi que pour mettre en lumière certains gènes régulateurs de la production de ces glucocorticoïdes. Ces modèles seront brièvement décrits ci-dessous.

Les souris issues d'accouplements de parents hétérozygotes pour le gène CRH ont une viabilité normale [251]. Cependant, la progéniture CRH-KO issue de parents homozygotes ne survit généralement pas aux premières 24 heures après la naissance, principalement dû à une immaturité pulmonaire sévère. Puisque la progéniture CRH-KO issue d'une mère hétérozygote survit, il a été proposé qu'un facteur provenant de la mère permette le sauvetage des fœtus. Bien que le CRH soit produit par le placenta chez l'humain, ce n'est pas le cas chez la souris. Le facteur recherché n'était donc fort probablement pas le CRH lui-même chez cette espèce, mais plutôt un effecteur de CRH. Il a été postulé que les glucocorticoïdes pourraient être impliqués puisqu'ils sont sous la régulation de l'axe HPA, dans lequel CRH est un acteur important, et qu'ils ont la capacité de traverser la barrière placentaire. Ce postulat s'avéra exact puisque l'administration de corticostérone aux femelles gestantes permit de restaurer la viabilité des souriceaux. L'évaluation histologique des souris CRH-KO révéla un retard de maturation important au niveau pulmonaire. En effet, le poumon de ces souris est hypercellulaire et montre une septation déficiente. Plusieurs paramètres de maturation sont aussi affectés comme une prolifération cellulaire prolongée, un délai dans l'apparition de la protéine CCSP (*Clara cell secretory protein*), ainsi qu'un délai dans l'induction des ARNm codant les protéines de surfactant. Ces résultats suggèrent donc que les glucocorticoïdes, sous le contrôle de CRH, sont essentiels au programme normal de maturation pulmonaire. Un autre résultat intéressant qui fut obtenu est que la réponse au stress des souris CRH KO diffère en fonction du sexe, les

femelles montrant une capacité réduite à élever leur niveau de corticostérone alors que les mâles ont perdu complètement cette capacité. Ceci suggère une différence sexuelle dans la régulation de la production de glucocorticoïdes par des mécanismes indépendants de CRH.

Plusieurs modèles de souris GR-KO ont été générés et caractérisés [252-255]. En effet, il est généralement accepté que la plupart des effets des glucocorticoïdes passent par GR, il devenait donc très pertinent d'étudier l'impact de son absence sur le développement pulmonaire. Dans une première étude qui a caractérisé de manière générale le phénotype de lignées GR-KO, il a notamment été montré que les souris GR-KO, dans une grande proportion, meurent à la naissance des suites d'importantes anomalies pulmonaires [253]. Ce phénotype a été reproduit dans une autre lignée de souris GR-KO où cette fois la région promotrice et l'exon 2 de GR ont été abolis [254]. Par ailleurs, ces phénotypes sont presque identiques à celui observé dans la lignée de souris CRH-KO détaillée ici-haut, dans laquelle la production de glucocorticoïdes est absente. Lorsqu'analysés au JG 18.5, les fœtus GR-KO montrent au niveau pulmonaire un poids et un contenu en ADN plus élevés que les souris sauvages, ce qui est indicateur d'une hypercellularité. Les niveaux de corticostérone en circulation sont aussi plus élevés, probablement dû à une perturbation de la boucle de rétroaction négative de l'axe HPA. Alors qu'il n'y a pas de différence majeure dans l'ultrastructure pulmonaire entre les GR-KO et les sauvages au JG 16.5, l'architecture pulmonaire est plus condensée chez les GR-KO au JG 18.5. En effet, les espaces aériens sont réduits et les septations interalvéolaires sont plus épaisses. Les hétérozygotes présentent un phénotype intermédiaire. Les poumons GR-KO au JG 18.5 ont l'apparence générale des poumons sauvages au JG 16.5. Fait intéressant, ces changements sont très similaires à ceux observés dans le poumon fœtal suite à une adrénalectomie fœtale [256]. Les proportions de cellules épithéliales sont altérées chez les GR-KO, avec moins de PTI et plus de PTII et de cellules indifférenciées. Les PTII chez les GR-KO montrent toutefois une capacité à produire et sécréter le surfactant. De plus, les niveaux d'ARNm de SP-A et de SP-C, mais pas de SP-B, sont diminués chez les GR-KO. Ces résultats concernant des problèmes de différenciation cellulaire viennent compléter, par exemple, une autre étude dans une lignée de souris GR-KO où l'augmentation de l'expression de la protéine midkine, qui est un important facteur de croissance, n'a pas lieu quelques jours avant la

parturition [257]. Il a aussi été proposé que la régulation du fluide intrapulmonaire soit altérée chez les souris GR-KO, considérant la perturbation des populations cellulaires épithéliales et de l'expression de gènes associés au transport des fluides dans ce modèle, ainsi que les effets reconnus des glucocorticoïdes dans ce mécanisme. Considérant l'impact très important de la mécanotransduction sur la différenciation des cellules épithéliales pulmonaires, il est possible qu'une réduction de l'expansion pulmonaire soit responsable de la perturbation des proportions cellulaires observées. Bien qu'une dérégulation du fluide pulmonaire puisse être en cause, ces problèmes d'expansion pulmonaire pourraient aussi être associés à une distensibilité pulmonaire diminuée.

Une étude subséquente menée sur des souris GR-KO aborda le rôle de la signalisation par les glucocorticoïdes dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose dans le poumon en développement, en utilisant notamment des micropuces d'ADN [258]. Il a été démontré que l'activation de GR médie la répression de mécanismes de prolifération, particulièrement dans le mésenchyme de la région péri-sacculaire, alors que le niveau d'apoptose ne semble pas être affecté. De nombreux gènes différenciellement exprimés, près de 1500, entre les GR-KO et les sauvages ont été identifiés. Les principales fonctions biologiques représentées par les gènes dont l'expression est augmentée chez les GR-KO sont la régulation d'activité kinase, le métabolisme des hydrates de carbone et la réponse immune, ce qui indique que la signalisation par GR dans les poumons normaux réprime ces fonctions. D'autre part, des fonctions associées au métabolisme, à la réplication et à la réparation de l'ADN sont inhibées dans les GR-KO. En effet, des processus associés à la prolifération cellulaire, à la division et au cycle cellulaire sont inhibés. Ces résultats suggèrent que la signalisation par GR induit l'expression de gènes qui sont responsables de l'inhibition de la prolifération plutôt que d'inhiber l'expression de gènes qui sont impliqués positivement dans la prolifération.

De légères différences dans la progression du développement pulmonaire sont observées entre les lignées de souris, de même qu'entre différents rongeurs. En effet, la souche de souris utilisée pour générer des lignées GR-KO a une influence sur le phénotype observé [253, 259]. Dans ce contexte, il a été montré que chez les souris homozygotes pour GR

inactivé, la sévérité de l'insuffisance respiratoire à la naissance corrèle avec le degré d'immaturation structurale pulmonaire [259].

L'impact de la signalisation par GR sur le développement pulmonaire a aussi été étudié dans des modèles de souris transgéniques où le GR est exprimé seulement [260], ou inactivé seulement [261], dans les cellules épithéliales pulmonaires. Dans le premier cas [260], l'objectif était de déterminer si les changements observés dans le cas des modèles GR-KO complet seraient abolis par l'expression de GR exclusivement dans l'épithélium distal. Bien que l'hypercellularité pulmonaire ait été réduite, les souriceaux montrent encore des signes d'insuffisance respiratoire. L'expression de plusieurs marqueurs de maturation n'a pas été altérée par la présence du transgène. Ces résultats supportent le concept que la perte normale de mésenchyme est due à une stimulation par les cellules épithéliales qui est GR dépendante, cependant la présence de GR dans les cellules non-épithéliales semble requise pour une maturation complète et normale du poumon. Dans le deuxième cas [261], l'objectif était de déterminer l'impact sur la maturation pulmonaire d'une inactivation conditionnelle de GR uniquement au niveau des cellules épithéliales. Une hypercellularité a été observée, de même qu'une augmentation des quantités de glycogène dans l'épithélium. La viabilité des souriceaux a été réduite et l'expression de plusieurs éléments importants (protéines du surfactant, canaux à sodium ENaC, CCSP, aquaporine 5) de la maturation a été diminuée par la perte de GR dans l'épithélium. Ces deux études indiquent que la présence de GR est requise dans le mésenchyme et dans l'épithélium pour permettre une maturation adéquate.

Un résultat très intéressant concernant la régulation génique par le GR dans le développement pulmonaire fœtal est le fait que la dimérisation et la liaison du GR à l'ADN ne semblent pas requises pour la survie des fœtus, bien que plusieurs fonctions des glucocorticoïdes soient alors perturbées [168, 262]. Ce résultat souligne l'importance de mécanismes indépendants de la liaison à l'ADN du GR, par exemple des associations avec d'autres facteurs de transcription.

1.7.5. Métabolisme pulmonaire des glucocorticoïdes par les 11 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 et de type 2

L'action des glucocorticoïdes au niveau des tissus périphériques cibles n'est pas déterminée uniquement par l'expression et les capacités de signalisation du GR. En effet, une importante régulation locale des niveaux de glucocorticoïdes par l'action des enzymes 11 β HSDs a été démontrée dans plusieurs tissus, dont le poumon en développement [248]. La 11 β HSD de type 1 a la capacité de convertir la cortisone en cortisol (11-déhydrocorticostérone en corticostérone), alors que la 11 β HSD de type 2 catalyse la réaction inverse. Par ailleurs, dans plusieurs tissus dont le rein, le type 2 est retrouvé au niveau de cellules qui expriment le récepteur des minéralocorticoïdes afin d'empêcher la liaison du cortisol (ou de la corticostérone) à ce récepteur qui montre une affinité équivalente pour l'aldostérone et pour les glucocorticoïdes actifs. Il est important de mentionner que le patron d'expression pulmonaire des 11 β HSDs est très différent entre l'humain et les rongeurs.

Chez l'humain, la conversion du cortisol en cortisone est prédominante *in vivo* ainsi que dans des explants de poumons fœtaux intacts, cependant cette activité diminue en fin de grossesse. Toutefois, dans des cultures de cellules pulmonaires fœtales la conversion de la cortisone en cortisol est l'activité prédominante et serait principalement associée aux fibroblastes. La 11 β HSD de type 2 a été localisée dans le poumon fœtal humain au niveau de l'épithélium des stades pseudoglandulaire, canaliculaire et sacculaire du développement pulmonaire. Elle n'a cependant pas été détectée dans les cellules PTI et PTII durant la période fœtale. Toutefois, lorsque des explants sont placés en culture pendant quelques jours, ce qui mène à la différenciation de PTII, la 11 β HSD de type 2 est alors détectée dans ces cellules [263]. Dans cette dernière étude, il a aussi été montré que l'expression du type 2 est diminuée par l'estradiol dans les explants en culture, et ce uniquement chez les mâles. Chez l'adulte, le type 2 a été détecté dans les cellules épithéliales de la trachée, des bronches, des bronchioles terminales, ainsi que dans les PTII des alvéoles. Alors que la 11 β HSD de type 1 semble être exprimée dans le poumon adulte, quoique fort probablement à de faibles niveaux, quelques études rapportent son absence dans le poumon fœtal [263].

Les fibroblastes pulmonaires fœtaux et adultes en culture expriment le type 1 à des niveaux relativement élevés. Une récente étude rapporte l'expression de l'ARNm et de la protéine de la 11 β HSD de type 1 dans le poumon fœtal humain en fin de grossesse [264], ce qui contraste avec les résultats publiés précédemment.

Chez les rongeurs, l'activité prédominante observée est la conversion de la 11-DHC en corticostérone que ce soit en explants pulmonaires fœtaux intacts, en culture de cellules pulmonaires fœtales ou en homogénats de poumons fœtaux. Cette activité de conversion augmente en fin de gestation. Chez la souris, le type 1 a été détecté par hybridation *in situ* dans l'épithélium alvéolaire à partir du JG 14.5, alors qu'une augmentation du niveau d'expression a été observée au JG 18.5 et dans la période post-natale [265]. Dans cette étude, l'ARNm de la 11 β HSD de type 2 n'a été que très faiblement détecté, et ce uniquement aux JG 16.5 et 18.5. L'administration d'un inhibiteur de la 11 β HSD de type 1 à des souris gestantes mène à une baisse des mécanismes de maturation pulmonaire chez les fœtus [266], alors que les souris invalidées pour le gène encodant la 11 β HSD de type 1 présentent un retard de maturation pulmonaire important [267]. Ces études mettent en évidence le rôle important de cette enzyme dans la gestion des niveaux de glucocorticoïdes actifs auxquels le poumon fœtal murin est exposé et dont il a besoin pour sa maturation.

Finalement, bien que les 11 β HSDs catalysent les mêmes réactions chez l'humain et les rongeurs, des différences importantes sont observées en ce qui concerne l'activité enzymatique prédominante pendant le développement pulmonaire fœtal. Il a été suggéré que cette dichotomie soit reliée à des différences dans les mécanismes de régulation et/ou le déroulement temporel d'événements de développement. Il est toutefois intéressant de noter que le résultat net serait semblable entre les espèces, c'est-à-dire une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes actifs en fin de gestation, par une augmentation de la 11 β HSD de type 1 chez les rongeurs et par une baisse de la 11 β HSD de type 2 chez l'humain.

1.7.6. Production et régulation extra-surrénalienne de glucocorticoïdes

L'avancement des recherches aura permis de réaliser que le cortex surrénalien n'est pas le seul tissu capable de produire des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes. En effet, des actions paracrines et autocrines de ces hormones sont suggérées dans plusieurs tissus périphériques, une situation par ailleurs semblable à celle qui est observée pour les stéroïdes sexuels. De tels systèmes locaux impliquent la présence de la machinerie enzymatique requise pour la formation des stéroïdes de même que celle des récepteurs spécifiques nécessaires à la transduction des signaux hormonaux. Une production locale de glucocorticoïdes a été décrite au niveau du cerveau [268], du thymus [269, 270], du système cardio-vasculaire [268], de l'intestin [271], de l'épithélium de la rétine [272] et de la peau [273]. Dans ces tissus, les enzymes menant à la synthèse de glucocorticoïdes à partir du cholestérol ont été détectées, cependant les profils d'expression varient selon les types cellulaires et les tissus étudiés, de même que selon les espèces. Ces études suggèrent toutes fortement qu'une synthèse locale impliquant parfois plusieurs types cellulaires existe dans certains tissus périphériques et implique des communications paracrines et/ou autocrines.

Une étude menée par notre laboratoire aborda l'expression des enzymes de la cascade de synthèse des glucocorticoïdes au niveau du poumon fœtal murin du JG 15.5 au JG 18.5 [274]. Un résultat très intéressant obtenu de notre étude de micropuces d'ADN (voir chapitre II) est en partie à l'origine de cette investigation. En effet, l'expression des messagers de la 21-hydroxylase et de la 3 β HSD de type 1 a été détectée avec une différence sexuelle au JG 15.5. Donc, suite à une caractérisation plus poussée de l'expression des ARNm encodant les enzymes menant à la production de glucocorticoïdes, il semble que tous les gènes de la cascade, c'est-à-dire StAR, P450_{scc}, 3 β HSD de type 1, 21-hydroxylase et 11 β -hydroxylase, soient fortement exprimés de manière transitoire et ce chez les deux sexes pendant le JG 15.5. En effet, les ARNm ont été co-détectés dans le pool mâle, ou le pool femelle, de certaines des portées étudiées au JG 15.5. Ces expressions ne surviendraient donc pas au même moment gestationnel entre les mâles et les femelles. Ce résultat est intéressant considérant les effets positifs des glucocorticoïdes sur la maturation

pulmonaire et la différence sexuelle observée dans la production du surfactant. La 11 β -hydroxylase n'a pas été détectée aux autres jours de gestation étudiés. Ces pics d'expression surviennent donc deux jours avant la montée de production du surfactant qui a lieu au JG 17.5 chez la souris. De plus, dans cette étude, la forte augmentation d'expression de la 11 β HSD de type 1 en fin de gestation a été confirmée, ainsi que la très faible expression, sans modulation, de la 11 β HSD de type 2.

Des régulations locales de la stéroïdogénèse impliquant des systèmes analogues à ce qui est retrouvé dans les tissus dits classiques comme le système rénine-angiotensine et l'axe HPA pour la production de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes, respectivement, ont été décrits dans certains tissus périphériques [272, 273, 275]. Notamment, un système de régulation analogue à l'axe HPA a été particulièrement bien décrit au niveau de la peau, chez l'humain et la souris [273]. Dans ce tissu, la cascade de régulation impliquant CRH, les récepteurs de CRH, POMC et ACTH, MCR2 ainsi que StAR, P450_{scc}, 3 β HSD, 21-hydroxylase et 11 β -hydroxylase est présente et fonctionnelle et semble être impliquée dans diverses fonctions biologiques, principalement en réponse au stress et au maintien de l'homéostasie. La présence de tels systèmes dans des tissus extra-surréaliens est particulièrement intéressante à considérer dans le contexte du développement pulmonaire. En effet, ces éléments contribuent aux bases de l'étude présentée au chapitre IV.

1.8. Expression génique globale du poumon fœtal

Un certain nombre d'études ont abordé l'expression génique globale du poumon fœtal. L'une des premières à être publiée dressa le profil d'expression global dans le poumon de souris en fonction des différents stades de développement pulmonaire, du JG 12 jusqu'à l'adulte [276]. Plus précisément, le profil d'expression de près de 11 000 gènes fut établi. L'emphase fut mise sur des groupes de gènes dont l'expression est coordonnée avec celle de gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire, donc dans le contrôle de la structure pulmonaire. Le sexe fœtal n'a pas été considéré dans cette étude. Une deuxième étude importante qui caractérisa l'expression pulmonaire globale en fonction des différents stades de développement s'attarda plus particulièrement aux facteurs de transcription, à

l'identification de groupes fonctionnels ainsi qu'à l'identification de gènes candidats dans la susceptibilité aux cancers pulmonaires [277]. Plus de 1300 gènes ont été identifiés comme étant variables entre au moins un point temporel et un autre et groupés selon les profils d'expression. Il s'agit donc là d'une autre ressource intéressante qui présente des données d'expression globale. Cependant, encore une fois le sexe n'a pas été considéré. La même équipe publia peu après un autre article d'analyses de micropuces plus particulièrement axé sur les cancers pulmonaires [278]. Une autre étude utilisant la technologie de micropuces évalua les gènes qui sont modulés pendant la différenciation des PTH en culture et en identifia plus de 388, principalement associés aux canaux ioniques, à l'adhésion cellulaire, au film superficiel, aux lysosomes, à la matrice extracellulaire et à la membrane basale [279]. D'autres études d'ontologie portant sur l'expression génique pulmonaire fœtale, utilisant les micropuces d'ADN, furent publiées après la publication de l'étude présentée au chapitre II et seront présentées et discutées au chapitre V.

Plusieurs études ont utilisé les micropuces d'ADN pour déterminer des différences sexuelles dans l'expression génique au niveau de différents tissus, de l'embryon jusqu'à l'adulte. Une analyse du transcriptome embryonnaire chez la souris a révélé que 591 transcrits étaient exprimés différenciellement entre les embryons mâles et femelles au jour embryonnaire 3.5, ce qui correspond au stade de 60 cellules [280]. Une autre étude présente les différences sexuelles au niveau de l'expression génique dans le cerveau chez la souris et ce au JG 10.5, avant la formation des gonades [281]. Cinquante et un gènes furent considérés comme différenciellement exprimés, dont 35 en faveur des femelles et 16 en faveur des mâles. Ces deux études présentent des différences sexuelles qui sont indépendantes des hormones sexuelles, du moins des hormones circulantes provenant des gonades. La maturation de ces dernières représente un événement majeur dans le développement sexuel fœtal. En effet, l'expression génique globale des ovaires et des testicules en formation a aussi été étudiée par analyse de micropuces d'ADN [282]. Sur une période de quelques jours de développement, l'expression de plus de 2300 gènes varie entre l'ovaire et le testicule. Cette étude permis de dresser un modèle du programme transcriptionnel des gonades en développement et d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la différenciation sexuelle. Une étude semblable, menée cette fois chez

l'adulte, a identifié 892 gènes exprimés différenciellement entre l'ovaire et le testicule [283]. Différents tissus somatiques ont aussi été comparés (foie, rein, tissu adipeux, etc), permettant l'identification de centaines, voire de milliers de gènes différenciellement exprimés entre les sexes [284]. Il est toutefois important de mentionner que le nombre de gènes identifiés dans une étude ou une autre est fortement dépendant de l'approche technique utilisée, ainsi que du type d'analyse réalisée. Finalement, il semble que plusieurs mécanismes distincts, dépendants ou non de l'influence des hormones sexuelles, soient impliqués dans les régulations géniques spécifiques au sexe.

Ces éléments complètent le contexte et les bases de l'étude présentée au chapitre II. Dans cette étude, nous avons utilisé une approche de micropuces d'ADN pour déterminer les gènes différenciellement exprimés entre les mâles et les femelles au niveau du poumon foetal pendant une période qui chevauche la montée de la production du surfactant par les cellules épithéliales de type II chez la souris.

1.9. Projet d'étude – présentation générale

1.9.1. Hypothèses

D'un point de vue global, mon projet de doctorat s'appuie sur les hypothèses de travail suivantes : 1) La différence sexuelle dans la maturation pulmonaire foetale implique une expression génique pulmonaire variable en fonction du sexe ; 2) Un métabolisme et une régulation des hormones stéroïdiennes sont présents dans le poumon foetal pendant la période de maturation pulmonaire. La fenêtre gestationnelle d'intérêt est celle qui est à haut risque de détresse respiratoire lors d'une naissance prématurée, complication qui affecte préférentiellement les garçons.

Plus spécifiquement, l'hypothèse concernant la première étude de cette thèse, présentée au chapitre II, est que le transcriptome pulmonaire foetal présente une différence entre les mâles et femelles pendant une période gestationnelle qui précède et chevauche la montée de production du surfactant chez la souris. Ces gènes dont l'expression est fonction du sexe pourraient contribuer à expliquer le délai de maturation observé chez le mâle.

L'hypothèse spécifique de la deuxième étude, présentée au chapitre III, est que les enzymes 17 β HSD2 et 17 β HSD5 qui sont impliquées dans l'inactivation et la synthèse des androgènes, respectivement, ainsi que le récepteur des androgènes présentent une expression régulée pendant le développement pulmonaire humain. La validation de cette hypothèse supporterait le concept stipulant que le poumon fœtal n'est pas seulement exposé de manière passive aux niveaux d'androgènes circulants, mais possède la machinerie moléculaire nécessaire à une modulation locale des niveaux d'hormones actives.

En troisième lieu, l'hypothèse concernant l'étude présentée au chapitre IV est qu'un système de régulation analogue à celui retrouvé au niveau de l'axe HPA est présent dans le poumon fœtal chez la souris et contribue à la régulation de la production de glucocorticoïdes *de novo*, c'est-à-dire à partir du cholestérol comme c'est le cas au niveau de la surrénale. Encore une fois ici, une capacité intrinsèque du poumon à réguler la production de ces hormones est stipulée.

1.9.2. Objectifs

Les objectifs spécifiques principaux associés à mon projet de recherche sont :

Premièrement, de déterminer l'expression génique globale dans les poumons fœtaux murins mâles et femelles aux JG 15.5, 16.5 et 17.5 en utilisant une approche de micropuces d'ADN. L'identification des gènes exprimés selon une différence sexuelle, leurs profils d'expression en fonction du temps, ainsi que les catégories fonctionnelles auxquelles ils sont associés sont déterminés à l'aide de différents outils d'analyse bioinformatique. Une attention particulière est apportée aux gènes dont les fonctions seraient reliées au métabolisme des hormones stéroïdiennes et à la régulation des composants du surfactant.

Deuxièmement, d'investiguer les niveaux et les sites d'expression des 17 β HSDs de type 2 et de type 5 et du récepteur des androgènes dans des poumons fœtaux humains mâles et femelles pendant la période de mi-grossesse en utilisant les techniques de PCR en temps réel, d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et d'immunobuvardage. L'âge

gestationnel et le sexe sont des variables prises en considération dans ces analyses. L'identification des types cellulaires qui expriment ces enzymes stéroïdogéniques et le récepteur des androgènes, mise en perspective avec les niveaux d'expression génique correspondants mesurés dans les échantillons de poumons totaux, permettra de clarifier les capacités du poumon en développement à métaboliser les androgènes et à y répondre.

Troisièmement, d'investiguer les niveaux et les sites d'expression de gènes associés à la régulation de l'axe HPA, soit *Crh*, *Crhr1*, *Crhr2 β* , *Crhbp* (*CRH-binding protein*), *Pomc*, *Mc2r* et *Nr3c1* (qui encode GR), par PCR en temps réel, hybridation *in situ* et immunohistochimie dans les poumons fœtaux murins mâles et femelles aux JG 15.5, 16.5 et 17.5. Aussi, de déterminer l'effet des hormones CRH et ACTH sur l'expression génique d'enzymes de la voie de synthèse des glucocorticoïdes, soit la 21-hydroxylase et la 11 β -hydroxylase, et sur la production de glucocorticoïdes dans des explants de poumons fœtaux murins aux JG 15.5 et 17.5. Le métabolisme des stéroïdes est étudié en utilisant des précurseurs stéroïdiens radioactifs et une technique de chromatographie sur couche mince. Les différents gènes à l'étude sont aussi quantifiés dans des cultures primaires enrichies en cellules mésenchymateuses et en cellules épithéliales préparées à partir de poumons fœtaux afin de comparer ces résultats à ceux obtenus à partir des poumons complets.

CHAPITRE II

Différences sexuelles au niveau du transcriptome pulmonaire fœtal chez la souris pendant une période gestationnelle chevauchant la maturation des cellules épithéliales de type II

Article publié dans le journal *Reproductive Biology & Endocrinology* [285]
sous le titre:

Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumonocytes in fetal mouse lungs

2.1. Avant-propos

Ce chapitre présente un article qui a été publié dans le journal *Reproductive Biology & Endocrinology* [285]. Voir ci-dessous une brève description des co-auteurs et de leur contribution à cette étude.

Pierre R Provost, Ph.D. : Le Dr Provost est professeur associé au département d'obstétrique et de gynécologie de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon co-directeur de thèse et s'impliqua au niveau de l'élaboration du plan expérimental, de la collecte des échantillons et de la rédaction de l'article.

Yves Tremblay, Ph.D. : Le Dr Tremblay est professeur titulaire au département d'obstétrique et de gynécologie de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon directeur de thèse. Ses implications se situèrent au niveau de l'élaboration du plan expérimental, de la révision de l'article et de la supervision globale du projet.

En ce qui me concerne, j'ai contribué à l'élaboration du plan expérimental, mené les analyses bioinformatiques, les recherches de littérature ainsi que les analyses de résultats et j'étais responsable de la rédaction du manuscrit et de la préparation des figures et tableaux.

2.2. Résumé en français de l'étude

Chez l'humain, le syndrome de détresse respiratoire qui peut survenir lors d'une naissance prématurée montre une prévalence chez les nouveau-nés mâles. En deuxième moitié de grossesse, la maturation des pneumocytes de type II et conséquemment la montée de production de surfactant est décalée chez les fœtus mâles par rapport aux fœtus femelles. Bien que la présence de plus hauts niveaux d'androgènes dans le poumon fœtal mâle pourrait expliquer cette différence sexuelle, l'identité des gènes impliqués dans la maturation pulmonaire et dont l'expression est modulée par le sexe n'est pas connue. Nous avons étudié cette différence sexuelle dans le poumon murin en développement par une approche de profilage génique global durant une fenêtre de gestation de trois jours qui précède et inclut l'émergence de pneumocytes de type II matures (la montée de production du surfactant chez la souris survient au jour gestationnel 17.5). L'ARN total a été extrait de

poumons fœtaux mâles et femelles, convertit en ARNc, marqué avec de la biotine et hybridé à une micropuce d'ADN (Affymetrix MOE430A). L'analyse des données a été réalisée à l'aide des logiciels MAS5.0, LFCM et Genesis. Plusieurs gènes reconnus pour être impliqués dans la maturation pulmonaire sont exprimés sans différence sexuelle. Approximativement 14 000 transcrits sont représentés sur la micropuce d'ADN utilisée et parmi ceux-ci, seulement 83 gènes présentent une différence sexuelle dans leur expression à un ou plusieurs points temporels entre les JG 15.5 et 17.5. De ces gènes différenciellement exprimés, certains sont impliqués dans la régulation et le métabolisme hormonal (i.e. voie stéroïdogénique), l'apoptose, la transduction de signal, la régulation transcriptionnelle et le métabolisme des lipides incluant des gènes d'apolipoprotéines. Des gènes impliqués dans des fonctions immunes et d'autres métabolismes ont aussi montré une différence sexuelle dans leur expression. Parmi ces gènes qui montrent une différence sexuelle, certains sont des candidats intéressants pour un rôle, de par les protéines qu'ils encodent, dans la maturation pulmonaire. En effet, au JG 17.5, la différence sexuelle dans le niveau des lipides du surfactant corrèle avec la différence sexuelle observée pour les gènes d'apolipoprotéines, qui sont impliquées dans le transport des lipides. Un rôle est donc suggéré pour ces gènes dans la production du surfactant. Nos résultats ont le potentiel d'aider à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né.

2.3. Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumonocytes in fetal mouse lungs

Marc Simard^{1,3}, Pierre R. Provost^{1,2,3} and Yves Tremblay*^{1,2,3}

¹Laboratory of Ontogeny and Reproduction, CHUQ, PCHUL, Faculty of Medicine, Laval University, Québec City, Québec, Canada

²Ob/Gyn Department, Faculty of Medicine, Laval University, Québec City, Québec, Canada

³Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Faculty of Medicine, Laval University, Québec City, Québec, Canada

*Corresponding author

Email: Yves Tremblay*, yves.tremblay@crchul.ulaval.ca

2.4. Abstract

Background: In human, respiratory distress of the neonates, which occurs in prematurity, is prevalent in male. Late in gestation, maturation of type II pneumonocytes, and consequently the surge of surfactant synthesis are delayed in male fetuses compared with female fetuses. Although the presence of higher levels of androgens in male fetuses is thought to explain this sex difference, the identity of genes involved in lung maturation that are differentially modulated according to fetal sex is unknown. We have studied the sex difference in developing mouse lung by gene profiling during a three-day gestational window preceding and including the emergence of mature PTII cells (the surge of surfactant synthesis in the mouse occurs on GD 17.5).

Methods: Total RNA was extracted from lungs of male and female fetal mice (gestation days 15.5, 16.5, and 17.5), converted to cRNA, labeled with biotin, and hybridized to oligonucleotide microarrays (Affymetrix MOE430A). Analysis of data was performed using MAS5.0, LFCM and Genesis softwares.

Results: Many genes involved in lung maturation were expressed with no sex difference. Of the approximative 14 000 transcripts covered by the arrays, only 83 genes presented a sex difference at one or more time points between GDs 15.5 and 17.5. They include genes involved in hormone metabolism and regulation (i.e. steroidogenesis pathways), apoptosis, signal transduction, transcriptional regulation, and lipid metabolism with four apolipoprotein genes. Genes involved in immune functions and other metabolisms also displayed a sex difference.

Conclusions: Among these sexually dimorphic genes, some may be candidates for a role in lung maturation. Indeed, on GD 17.5, the sex difference in surfactant lipids correlates with the sex difference in pulmonary expression of apolipoprotein genes, which are involved in lipid transport. This suggests a role for these genes in the surge of surfactant synthesis. Our results would help to identify novel genes involved in the physiopathology of the respiratory distress of the neonates.

2.5. Background

Hyaline membrane disease (respiratory distress of the neonate) occurs primarily in premature infants. A major cause of this disease is surfactant deficiency. Hyaline membrane disease and surfactant synthesis are both affected by fetal sex. Indeed, the surge of surfactant synthesis is normally delayed in the developing male lung when compared with the female, while hyaline membrane disease is prevalent in males [20, 192, 193, 196, 286].

Surfactant synthesis occurs in type II pneumocytes (PTII) following maturation of these cells, which is promoted by fibroblast-PTII cell communication [286]. This maturation process is stimulated by glucocorticoids [287] and involves some cytokines including epidermal growth factor (EGF) [288, 289], neuregulin-1 [61], and keratinocyte growth factor (KGF) [290] as positive regulators and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) [291] [292-294] as negative regulator.

Androgens have been shown to both delay fetal lung maturation *in vivo* [151, 196] and block the stimulatory effect of corticosteroids on surfactant synthesis *in vitro* [295]. These effects are mediated through binding of androgens to androgen receptors [151, 196, 197], which are present in both male and female lung tissues [141, 296]. There is an active androgen metabolism in the developing lung where androgen synthesis [141, 165] and inactivation [141, 150] occur. In mice, many genes involved in androgen metabolism are regulated specifically on gestation day (GD) 17.5 in parallel with the emergence of mature PTII cells ([141] and unpublished data).

The surge of surfactant synthesis occurs on GD 17.5 in the mouse [141, 196] with a sex difference in pulmonary surfactant lipid levels [196]. Male mice carrying the *Tfm* gene (male with testicular feminization), which have no functional androgen receptors, have surfactant levels comparable with those of normal females at a comparable developmental time point [196]. Therefore, the mouse is a good model to study the effect of fetal sex on the timing of the developmental events related to the surge of surfactant synthesis.

Knowing that the surge of surfactant synthesis is delayed in male fetal mouse lungs compared with females, we were interested to identify genes that are expressed with a sex difference during the gestational period that overlaps the surge of surfactant production. We found, by microarray analysis, genes exhibiting a sex difference in expression in lung development during a three-day window preceding and including the emergence of mature PTII cells. To date, no gene profiling study of sex differences in the embryonic lung tissue exists. Using Affymetrix technology, we have studied about 14,000 transcripts and variants with more than 22,600 probe sets in male and female fetal lungs on GDs 15.5, 16.5, and 17.5.

2.6. Methods

2.6.1. Animals

Protocols were approved by the animal care and use committee and the institutional review board of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (protocol 2002-080). Balb/C mice (*Mus musculus*) were mated during the night. Appearance of the copulatory plug was considered as gestation day 0.5 (GD 0.5). Pregnant females were euthanized by exposure to CO₂. Fetal sex was determined by examination of the genital tract with a dissecting microscope at 15 X magnification. Fetal lungs were collected and one pool of tissues was prepared for each sex and each pregnant animal prior RNA extraction.

2.6.2. RNA extraction

Total RNA was extracted using Tri-reagent, a mixture of phenol and guanidine thiocyanate in a monophasic solution (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) as described previously [297]. Each RNA sample was purified on a CsCl gradient as described [298], using a TLA 120.2 rotor in an Optima MAX centrifuge (Beckman, Mississauga, ON, Canada).

2.6.3. Preparation of probes

Samples were processed following the Small Sample Labeling Protocol version II from Affymetrix [299]. This protocol is based on the principle of performing two cycles of cDNA synthesis and *in vitro* transcription reactions for target amplification. Briefly, 10 µg of total RNA were converted to cDNA by incubation with 400 units of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), a T7 oligonucleotide-d(T)₂₄ as a primer (5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG(T)₂₄-3'), combined with 1 mM dNTPs (deoxynucleotide triphosphates) in 1x first strand buffer (50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) at 42°C for 1 h. Second strand cDNA synthesis was performed using 40 units of DNA polymerase I (Invitrogen), 10 units of *E. coli* DNA ligase (Invitrogen), 2 units of RNase H (Invitrogen), and 0.2 mM dNTPs in 1x reaction buffer (18.8 mM Tris-HCl pH 8.3, 90.6 mM KCl, 4.6 mM MgCl₂, 3.8 mM DTT, 0.15 mM NAD, 10 mM (NH₄)₂SO₄) at 16°C for 2 h. Each cDNA sample was blunt ended by addition of 10 units of T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) and incubation at 16°C for 10 min. cDNA samples were purified by phenol-chloroform extraction using phase lock gels (Brinkmann Instruments Inc., Mississauga, ON, Canada), ethanol precipitated and resuspended in 10 µl of DEPC- (diethylpyrocarbonate) treated H₂O. First cycle amplification was performed using a MEGAscript T7 Kit (Ambion, Austin TX). The mixture (10 µl final volume) was incubated at 37°C for 5 h. cRNA was purified using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the protocol of the manufacturer. Purified cRNA was reverse-transcribed to cDNA for a second time following the protocol used for the first cycle. For the second amplification, a T7 BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) was used to produce biotinylated cRNA. The mixture (20 µl final volume) was incubated at 37°C for 5 h with gentle mixing every 30 min. Labelled cRNA was purified using a RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the protocol of the manufacturer. Purified cRNA was fragmented into segments of 20-300 nucleotide length by incubation in a fragmentation buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM magnesium acetate, 40 mM Tris-acetate pH 8.1) for 20 min at 94°C. The quality of cRNA amplification and cRNA fragmentation was monitored by micro-capillary electrophoresis (Bioanalyser 2100, Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada).

2.6.4. Microarray hybridization, scanning, and analysis

Each preparation of cRNA probe was hybridized to two GeneChip Mouse Genome 430A arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). Each microarray was pre-hybridized in 1x hybridization buffer (0.1 mg/ml herring sperm DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA) at 45°C for 10 min under constant rotation (60 rpm). Then, the buffer was replaced by a mixture containing 15 µg of fragmented cRNA in 1x hybridization buffer, and the following internal controls from Affymetrix: 5 nM control oligonucleotide B2 and 1x eukaryotic hybridization control (1.5 pM *BioB*, 5 pM *BioC*, 25 pM *BioD* and 100 pM *cre*). Samples were incubated at 45°C for 16 h under constant rotation. Microarrays were processed using an Affymetrix GeneChip Fluidic Station 400 (protocol EukGE-WS2Av4). Staining was initiated with streptavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE), followed by amplification using a biotinylated anti-streptavidin antibody and by a second round of SAPE. GeneChips were scanned using a GeneChip Scanner 3000 with autoloader (Affymetrix). Data acquisition and analysis were performed using the Microarray Suite 5.0 software (Affymetrix). Signal intensities for β-actin and GAPDH genes were used as internal quality controls; their ratio of fluorescence intensities for the 5' and 3' ends was <2. Differentially expressed genes were determined using the LFCM software [300]. Briefly, variable fold change limit (LFC) decreasing with gene expression value was used to select differentially expressed genes. The LFC equation is $Y = a + b / X$, where X is the minimum gene expression intensity from two arrays and Y is the fold change limit. The parameters a and b were estimated from the distribution of ratios calculated from replicated chips. The resulting cut-off point, $Y = 1.8 + 62.0 / X$, gave an approximately constant rate of false positive modulated genes of 0.1%. All the genes having a fold change above this curve were considered significantly modulated. Data were also analysed with the Genesis 1.6.0 Beta1 software [301]. The MOE430A microarray provides coverage of over 22,600 probe sets corresponding to about 14,000 transcripts and variants. The probe sets were selected from sequences derived from GenBank, dbEST and RefSeq. The sequence clusters were created from the UniGene database (Build 107, June 2002) and then refined by analysis and comparison with the publicly available draft assembly of the mouse genome from the Whitehead Institute Center for Genome Research (MSCG, April 2002) (for more details see [299]).

2.7. Results

Pregnant Balb/C mice were sacrificed on GDs 15.5, 16.5, and 17.5. Total RNA prepared from male and female fetal lungs, from each litter, was pooled in order to obtain the following six samples: GD 15.5 males; GD 15.5 females (each from 2 litters); GD 16.5 males; GD 16.5 females (each from 2 litters); GD 17.5 males; and GD 17.5 females (each from 1 litter) (number of fetuses per RNA preparation were respectively of 6, 9, 7, 9, 2, and 4). Previously, the litters corresponding to GDs 15.5 and 17.5 have shown sex differences in expression for several genes [141, 274]. Microarray analysis was performed using six probes prepared from these RNA samples and 12 GeneChip Mouse Genome 430A array (in duplicate). Values obtained for each gene were compared between sexes for each GD.

2.7.1. Validation of data

Internal controls assessing the validity and reproducibility of the data were satisfied (see Methods). For each experiment, Table 2 shows the number of probe sets detected (p -value ≤ 0.05 based on raw signals obtained for each probe set). Of these, the number of associated known and unknown transcripts was determined from analysis of probe set IDs using NetAffx (Affymetrix) and Excel (Microsoft) softwares. Expressed sequence tags (ESTs), Riken sequences, and all other unknown transcripts (“hypothetical”, “similar to”...) were sorted into the category named “Unknowns”.

Sex determination of fetuses was confirmed by analysis of several genes associated with the Y-chromosome. Specifically, Ddx3y (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked) (Id. #56, Table 3), Jarid1d (jumonji, AT rich interactive domain 1D (Rbp2 like)) (Id. #57), also called Smcy, Eif2s3y (Y chromosome-encoded subunit of the initiation of translation factor Eif2) (Id. #50) and Uty (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome) (Id. #65) were expressed, as expected, exclusively in male samples for each GD studied (Table 3).

The expression patterns of surfactant associated protein C (SP-C) obtained from microarray experiments (Figure 5A) and real time PCR (Figure 5B) using the same RNA preparations are presented. The reported increase in SP-C mRNA was observed in both cases.

2.7.2. Several genes of interest exhibiting no sex difference in expression

Several genes involved in lung development and expressed with no sex difference in our study are presented in Table 4. These genes encode members of the fibroblast growth factor (FGF) [58] and the TGF β [302] gene families, their receptors, epidermal growth factor-receptor (EGF-R) [303], insulin-like growth factor I (IGF-I) [304] and members of the surfactant-associated protein family [305].

2.7.3. Genes with sexually dimorphic expression

Genes with sexually dimorphic expression in mouse lungs on GDs 15.5, 16.5, and 17.5 are presented in Table 3. These genes are distributed according to an adaptation of the functional categories defined by the Gene Ontology Consortium [306]. Only 33 genes displayed a sex difference on GD 16.5 compared with 62 and 38 on GD 15.5 and 17.5, respectively. Of these, similar numbers of genes showed higher expression levels for each sex on GD 15.5, while 21 of the 33 genes identified on GD 16.5, and 32 of the 38 genes identified on GD 17.5 presented higher expression in the female lung. Hierarchical clustering and expression profile of these genes are presented in Figure 6.

2.8. Discussion

This study targeted elucidation of a sex difference in the fetal lung during a three-day gestation period overlapping PTII cell maturation. This sex difference results in more concern for a poorer prognosis for respiratory distress in premature male infants. The genes identified here, with a sexually dimorphic expression during the gestation period examined in the mouse, likely contain key genes involved in PTII cell maturation. Further studies are essential to identify and to characterize these key genes, as our data indicate that PTII cell

maturation is not the only aspect of lung development affected by sex during this period of gestation.

Analysis of the data has to be performed in the context of lung development where a transient delay in the surge of surfactant synthesis is observed. Therefore, as in the case of the surge of surfactant synthesis, some genes can be subject to a transient delay in expression for one sex. The case of the *Cyp21a1* gene clearly illustrates this occurrence. Recently, we showed that *Cyp21a1*, a gene involved in corticosteroid synthesis, is expressed specifically on GD 15 in the fetal mouse lung [274]. Of the six litters studied on GD 15.5 and obtained using the same mating window of ± 8 hours, two litters presented high expression of *Cyp21a1* in females only, whereas one litter had high expression of this gene only in male fetuses. The three remaining litters did not show any elevated levels of expression for this gene (Figure 7). The exact gestation time at which the pregnant females were sacrificed varied from litter to litter according to the time where the females were mated during the mating window of ± 8 h. Knowing that Balb/C is an inbred strain, variations from litter to litter should represent the expression pattern of *Cyp21a1* gene at different times on GD 15. Consequently, our results strongly suggested that *Cyp21a1* should present a narrow peak of expression on GD 15 with a delay for one sex [274]. In the present study, expression of *Cyp21a1* (Id. #30) was detected by gene profiling only in males on GD 15.5. Real-time PCR analysis of the two litters pooled to prepare probes on GD15.5 revealed that *Cyp21a1* was expressed at high levels only in male lungs (one out of two litters) (data not shown). Therefore, our microarray results are compatible with our previous report [274]. In this example, the fact that we detected expression only in male fetuses by microarrays depended only on the litters used. Therefore, for the analysis of our microarray results, the identity of the sex where expression is higher compared to the other sex has to be considered with caution. Other animals, mated some hours before or after the pregnant females used in this study within the same mating window, could show elevated expression levels for the other sex, or even present no sex difference at all, as a consequence of a delayed expression in one sex.

Recently, we reported that all the genes involved in corticosteroid synthesis from cholesterol in the mature adrenal gland are transiently expressed in the developing mouse lung on GD 15 [274]. Hsd3b1 (Id. #28) encodes the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme that is involved in this cascade of reactions (pregnenolone \rightarrow progesterone) along with Cyp21a1 (Id. #30) (progesterone \rightarrow deoxycorticosterone) as mentioned already. Both genes were also found by microarray analysis to be expressed transiently on GD 15 with a sex difference.

Some other genes related to steroid hormone metabolism/regulation are expressed also with a sex difference in fetal mouse lungs. This is the case for Akr1b7 (Id. #29) which showed a sex difference in expression on GD 15.5. This gene encodes an aldose reductase-like protein whose major function is detoxification of isocaproaldehyde generated by conversion of cholesterol to pregnenolone by the enzyme P450scc [307], the latter also being expressed on GD 15.5 in the mouse fetal lung [274]. Scgb1a1 gene (Id. #53) is expressed also on GD 15.5 with a sex difference. This gene encodes the secretoglobin family 1A member 1, also called Clara cell secretory protein (CCSP), which is required for the appearance of Clara cells secretory granules and thus participates to the composition of the epithelial lining fluid [308]. Scgb1a1 gene can be induced by glucocorticoids [309] and CCSP can act as an anti-inflammatory protein [310]. It was also shown to bind progesterone [311]. Some other genes were not detected by microarrays although they are known to be expressed with a sex difference in lung development as evidenced by real-time PCR. These genes include 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 2 and type 5 [141] which are expressed at low levels in the lung, probably below the minimal threshold of sensitivity of the microarray technology.

Some genes involved in the metabolism of non-steroidal hormones were also found to be expressed differentially between genders. This is the case for Ttr (Id. #32), which codes for transthyretin, a common plasma carrier protein for thyroid hormones and vitamin A metabolites [312]. Interestingly, retinoids are important regulators of normal epithelial cell differentiation and proliferation [313] and are involved in lung development [314]. Ren1 (Id. #33) encodes for renin 1 and presented a sex difference in expression on GD 15.5.

Genes of the renin-angiotensin system are known to be expressed in the fetal lung and, interestingly, angiotensin II can present mitogenic effects on human lung fibroblasts through the activation of the type 1 angiotensin II receptor [315]. In our study, Ace (angiotensin II converting enzyme), Agtr1, and Agtr2 (angiotensin II receptor type 1 and type 2) are expressed with no sex difference (data not shown).

Our results demonstrate that genes coding for apolipoprotein (apo) AI (Id. #45), apoAII (Id. #47), apoCII (Id. #46), and apoH (Id. #44) are co-expressed in the developing lung. To our knowledge, none of these genes has been found expressed in the lung. All of these genes present a sex difference in favor of females in the developing lung on GD 15.5 and 17.5, with no detectable expression on GD 16.5. As demonstrated by real-time PCR, 17 β HSD types 2 and 5 were also expressed on GDs 15.5 and 17.5 with a sex difference for the majority of litters, but not on GD16.5 [141]. Our results suggest that the expression of these four apolipoprotein genes in the developing lung is under active modulation. 17 β -HSD types 5 and 2 genes are involved in androgen synthesis and inactivation, respectively. Such a similar pattern of expression for these apolipoproteins and 17 β -HSD genes may suggest a common regulatory mechanism, or an effect of androgens on expression of these apolipoprotein genes. Apolipoproteins are constituents of circulating lipoproteins. ApoCII is an essential cofactor/activator of lipoprotein lipase (LPL) [316, 317] while apoH was shown to enhance LPL [318]. This enzyme catalyses the hydrolysis of the triacylglycerol component of circulating lipoproteins (chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDLs)). It was reported that the presence and activity of LPL in the lung may be important for surfactant production [319] LPL expression was detected with no sex difference. ApoAI [320] and apoAII [321] are major protein components of high density lipoproteins (HDLs). ApoAI is a potent activator of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), an HDL-associated enzyme playing a role in reverse cholesterol transport. It is possible that the sex difference in expression of four apolipoprotein genes in the lung could explain in part the sex difference in surfactant lipids observed on GD 17.5; although such a role in the surge of surfactant synthesis has never been suspected for these genes before the present study. It is also noteworthy that many genes involved in lipid metabolism were expressed with no sex difference during each gestational day studied (data not shown). For

example, this is the case for genes encoding for LDL receptor, LDL receptor-related protein 1, phospholipid transfer protein, and HMG-CoA-reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase), the latter being known to catalyze the rate-limiting step of cholesterol synthesis.

Along with other pathways, fibroblast growth factors (FGFs) and TGF β signaling pathways have been shown to be involved in many aspects of lung development. We observed expression of many genes that belong to these pathways (Table 4). However, in the present study, these genes exhibit no sexually dimorphic expression. This is in line with our previous study by real-time PCR that showed expression of 5 genes involved in lung maturation on GDs 16.5 and 17.5 with no sex difference, namely, LIF, IGF-I, KGF (FGF-7), EGF-R, and neuregulin-1 [141]. Although it is possible that these genes could be expressed with a sex difference within a time window not covered by our studies, it seems that the sex difference in PTII cell maturation could rely on other genes.

Tissue remodeling and structure also seem subject to sexual differences in gene expression. Indeed, two genes involved in apoptosis, namely, Rock1 (Rho-associated coiled-coil forming kinase 1) (Id. #1) and Casp8ap2 (caspase 8 associated protein 2) (Id. #2) are differentially expressed on GD 16.5 between genders, while many genes involved in cell adhesion are expressed with a sex difference on GD 15.5. In addition, IGF signaling pathway has been shown to be important in mouse lung development where it is involved in regulation of cell proliferation and differentiation [304, 322, 323]. Igfbp1 (Id. #9) presented a sex difference in expression on GD 15.5, whereas Igfbp1 deficiency was associated with massive hepatocyte apoptosis [324].

In preparation for important immunological challenges related to its function, the developing lung acquires many elements associated with innate and adaptive immunity. Our data suggest that modulation of several genes involved in immune functions of the lung is subject to sex differences. Indeed, the predominating functional category of genes showing sexual dimorphism on GD 16.5 concerns “immune functions”. It has been shown that many signaling pathways involved in lung morphogenesis and immune responses are

crosslinked [325]. These include TTF-1, GATA6 and HNF-3 β transcription factors; and FGF- and NF- κ B-dependant signaling pathways. However, we did not detect any sex difference in expression for these genes.

2.9. Conclusions

This study revealed that many genes are expressed with a gender difference in the fetal lung. Although we focused on a brief gestational period overlapping the surge of surfactant synthesis, our data demonstrates that PTII cell maturation is not the only aspect of lung development under the influence of fetal sex. We suggest that, among the genes identified here, some are related to the transient delay in lung maturation observed for males. This would help identify novel genes involved in the physiopathology of respiratory distress of the neonate.

2.10. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

2.11. Authors' contributions

MS participated in the design of the study, performed the data analysis and wrote the manuscript. PRP participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. YT conceived the study, participated in its design and in its coordination. All authors read and approved the final manuscript.

2.12. Acknowledgements

We thank Drs Fernand Labrie and Ezequiel Calvo of the CRCHUL for the use of the Affymetrix platform, and Drs Paul Khan and Tommy Seaborn for a critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the CHUQ Foundation, Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and Natural Sciences and Engineering Research

Council of Canada (NSERC) to YT. MS was supported by a Ph.D. studentship award from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec-Réseau Santé Respiratoire*.

2.13. Figure Legends

Figure 5: Relative levels of SP-C gene expression on GDs 15.5, 16.5 and 17.5

Relative levels of SP-C gene expression (\pm SD) on GDs 15.5, 16.5 and 17.5 obtained by microarray hybridization (A) and real-time PCR (B). RNAs corresponding to samples “a” and “b” in panel B were pooled prior to preparation of probes used in panel A. “a” and “b” refer to different litters.

Figure 6: Hierarchical clustering and expression profile of differentially expressed genes

Hierarchical clustering and expression profile of genes presented in Table 3. The day of gestation is indicated at top. Accession numbers and gene symbols are presented. For each gene individually, each value was normalized by division with the root mean square calculated from the six values. As a consequence, the relative values obtained for one gene cannot be compared to those of other genes. Expression levels are presented from black (no expression) to yellow (high relative expression level). The clustering was generated using the Genesis 1.6.0 Beta1 software (agglomeration rule of average linkage and Euclidean measurement distance) [301]. M, male; F, female.

Figure 7: Hypothesis concerning the expression profile of some differentially expressed genes

Our previous results suggest that Cyp21a1 is expressed at different precise gestation time on GD 15 for each gender [274] as shown in the present figure. This hypothesis would explain why the expression profile of Cyp21a1 on GD15.5 varied from litter to litter and presented one of the following patterns : 1) high expression in female fetal lungs only; 2) high expression in male fetal lungs only; or 3) no elevated expression in male and female fetal lungs. Because Balb/C is an inbred strain, the mating window of 16h would explain the variation between litters. Genes presenting such an expression profile cannot be studied by microarrays from a pool of many litters because the sex difference in expression could be lost.

2.14. Figures

Figure 5

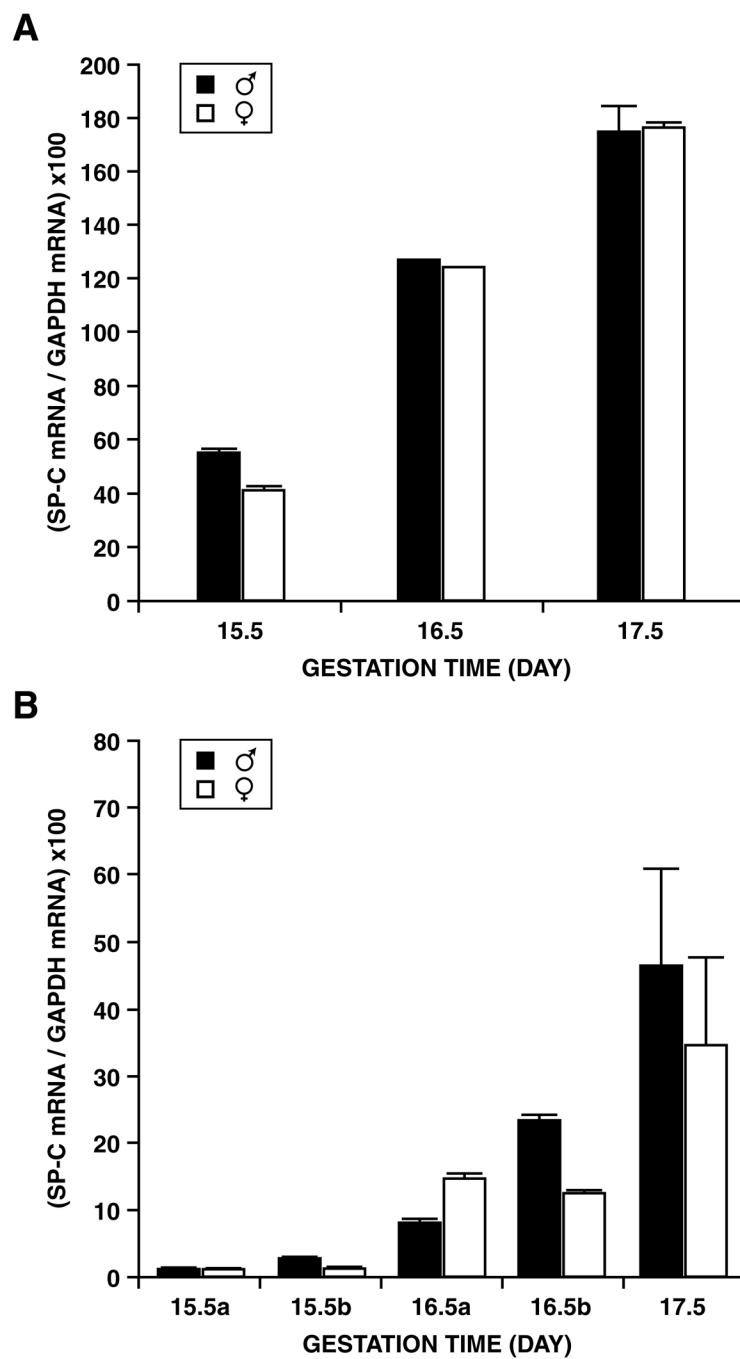


Figure 6

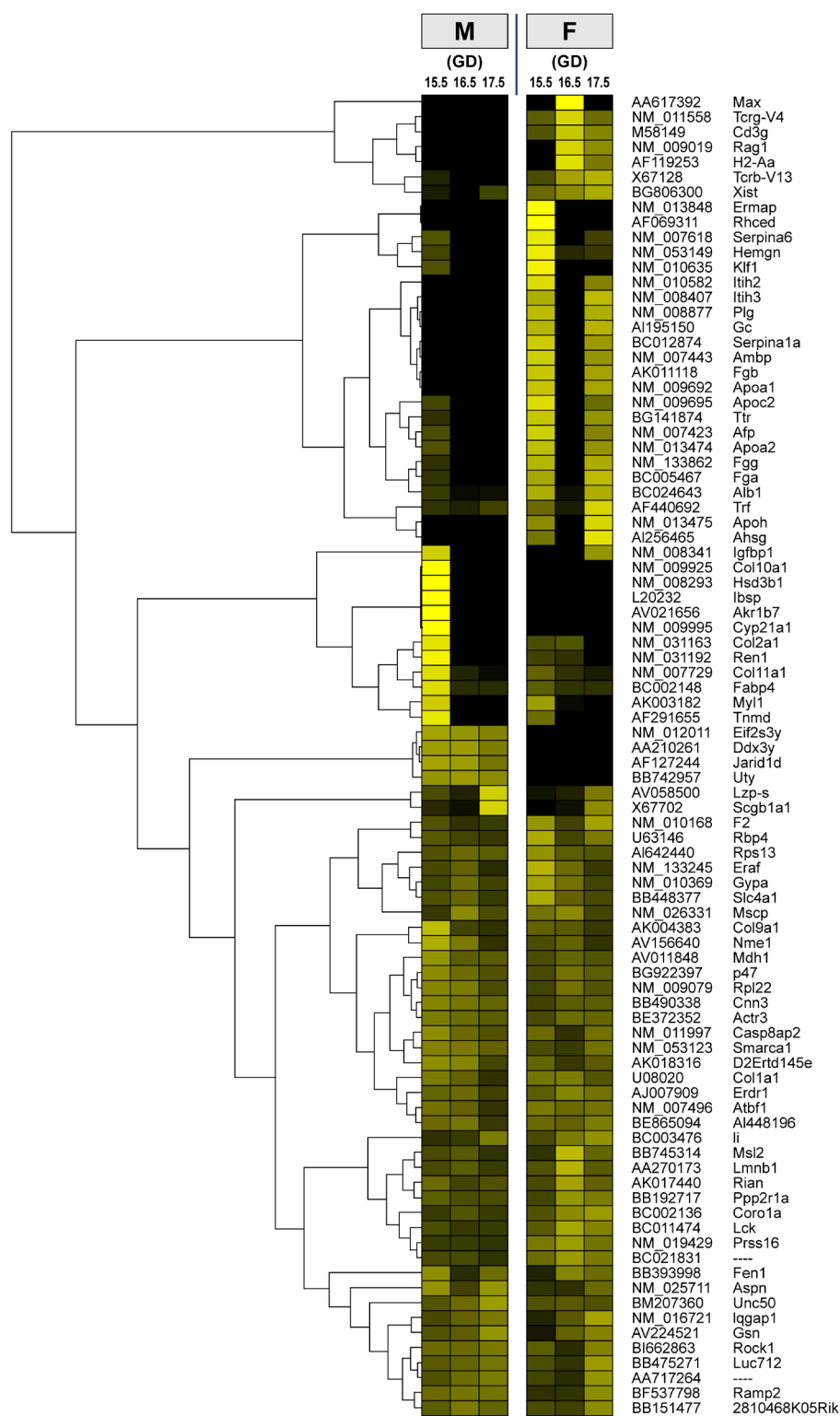
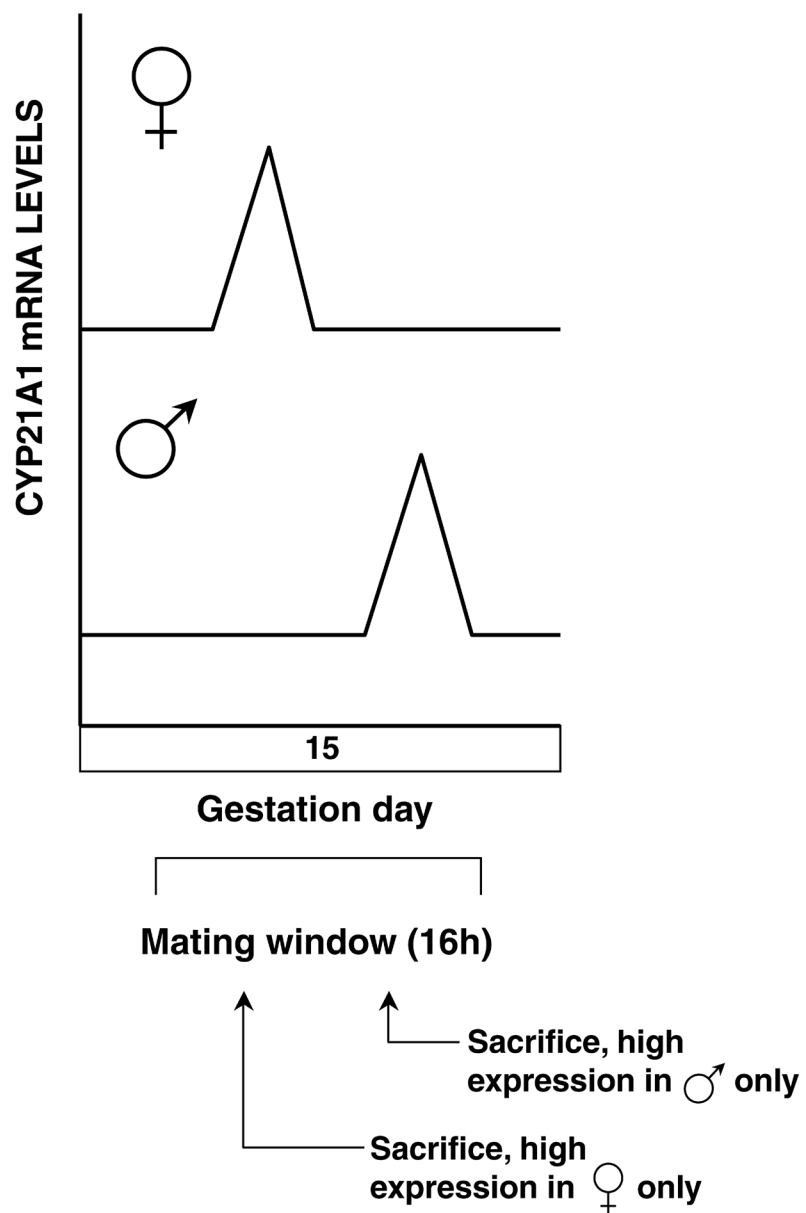


Figure 7



2.15. Tables

Tableau 2: Overview of the microarray data characteristics

	GD15.5		GD16.5		GD17.5	
	M	F	M	F	M	F
Detected probesets	12955	12988	12660	12455	12234	12808
(% present)*	(57,3%)	(57,4%)	(56%)	(55%)	(54,1%)	(56,6%)
Known genes[†]	6490	6464	6466	6424	6321	6561
Unknown transcripts[†]	2406	2433	2030	2019	1965	2060

* - Number of probe sets detected (p-value ≤ 0.05) relative to the total number of probe sets on the array

[†] - When multiple probe sets are associated to the same transcript, only one is considered
M, male; F, female

Tableau 3: Differentially expressed genes in the lung according to sex at GDs 15.5, 16.5 and 17.5

Id *	Accession number	Gene name †	Symbol	Fold changes ‡			Chr.
				GD15.5 § (62)	GD16.5 (33)	GD17.5 (38)	
Apoptosis							
#1	BI662863	Rho-associated coiled-coil forming kinase 1	Rock1		2.25		---
#2	NM_011997	caspase 8 associated protein 2	Casp8ap2		2.15		4 11.4 cM
Cell adhesion							
#3	NM_009925	procollagen, type X, alpha 1	Col10a1	M			10 22.0 cM
#4	L20232	integrin binding sialoprotein	lbsp	M			5 56.0 cM
#5	NM_031163	procollagen, type II, alpha 1	Col2a1	2.96	F		15 54.5 cM
#6	NM_007729	procollagen, type XI, alpha 1	Col11a1	2.25			3 53.1 cM
#7	AK004383	procollagen, type IX, alpha 1	Col9a1	1.96			1 15.0 cM
#8	U08020	procollagen, type I, alpha 1	Col1a1			(1.77)	11 56.0 cM
Cell growth							
#9	NM_008341	insulin-like growth factor binding protein 1	igfbp1	M			11 1.3 cM
Coagulation							
#10	NM_008877	plasminogen	Plg	F		F	17 7.3 cM
#11	AK011118	fibrinogen, B beta polypeptide	Fgb	F		F	3 48.2 cM
#12	NM_133862	fibrinogen, gamma polypeptide	Fgg	(3.81)		F	3 41.3 cM
#13	BC005467	fibrinogen, alpha polypeptide	Fga	(3.10)		F	3 44.8 cM
#14	NM_010168	coagulation factor II	F2			(2.67)	2 47.5 cM
Endopeptidase activity							
#15	BC012874	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1a	Serpina1a	F		F	12 51.0 cM
#16	NM_007443	alpha 1 microglobulin/bikunin	Ambp	F		F	4 30.6 cM
#17	NM_010582	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	Itih2	F		F	2 1.0 cM
#18	NM_008407	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	Itih3	F		F	---
#29	NM_007618	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 6	Serpina6	(2.66)		F	12 51.0 cM
#20	NM_019429	protease, serine, 16 (thymus)	Prss16		(2.65)		13 10.0 cM
Erythroid-associated							
#21	NM_013848	erythroblast membrane-associated protein	Ermap	F			4 57.0 cM
#22	AF069311	Rhesus blood group CE and D	Rhced	F			4 65.7 cM
#23	NM_053149	hemogen	Hemgn	(3.29)	F	F	---
#24	NM_010635	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	Klf1	(3.01)			---
#25	NM_133245	erythroid associated factor	Eraf	(2.38)			---
#26	NM_010369	glycophorin A	Gypa	(2.27)			8 36.0 cM
#27	AJ007909	erythroid differentiation regulator 1	Erdr1			(1.75)	---
Hormone metabolism/regulation							
#28	NM_008293	hydroxysteroid dehydrogenase-1, delta<5>-3-beta	Hsd3b1	M			3 49.1 cM
#29	AV021656	aldo-keto reductase family 1, member B7	Akr1b7	M			6 14.0 cM
#30	NM_009995	cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1	Cyp21a1	M			---
#31	AI195150	group specific component	Gc	F		F	5 44.0 cM
#32	BG141874	transthyretin	Ttr	(3.93)	F	F	18 7.0 cM
#33	NM_031192	renin 1 structural	Ren1	3.67	F		---
#34	NM_007423	alpha fetoprotein	Afp	(2.64)		F	5 50.0 cM
#35	U63146	retinol binding protein 4, plasma	Rbp4	(1.89)		(2.16)	19 38.0 cM
Immune functions							
#36	NM_011558	T-cell receptor gamma, variable 4	Tcrg-V4	F	F	F	---
#37	NM_009019	recombination activating gene 1	Rag1		F	F	2 56.0 cM
#38	M58149	CD3 antigen, gamma polypeptide	Cd3g	F	F		9 26.0 cM
#39	AF119253	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa		F		---
#40	AV058500	P lysozyme structural	Lzp-s	3.42		1.70	---
#41	X67128	T-cell receptor beta, variable 13	Tcrb-V13	(1.97)	F	F	6 20.5 cM
#42	BC011474	lymphocyte protein tyrosine kinase	Lck		(2.87)		4 59.0 cM
#43	BC003476	Ia-associated invariant chain	Ii		(2.10)		18 32.0 cM

Tableau 3 - suite

Lipid metabolism							
#44	NM_013475	apolipoprotein H	ApoH	F		F	11 63.0 cM
#45	NM_009692	apolipoprotein A-I	ApoA1	F		F	9 27.0 cM
#46	NM_009695	apolipoprotein C-II	ApoC2	(3.20)		F	7 4.0 cM
#47	NM_013474	apolipoprotein A-II	ApoA2	(2.27)		F	1 92.6 cM
#48	BC002148	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Fabp4	2.33			3 13.9 cM
#49	BG922397	p47 protein	p47	1.84			---
Protein biosynthesis							
#50	NM_012011	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked	Eif2s3y	M	M	M	---
#51	NM_009079	ribosomal protein L22	Rpl22	1.86			---
#52	AI642440	ribosomal protein S13	Rps13	(1.81)			---
Signal transduction							
#53	X67702	secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)	Scgb1a1	M			---
#54	BF537798	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	Ramp2	2.07	2.16		11 61.5 cM
#55	NM_016721	IQ motif containing GTPase activating protein 1	Iqgap1	1.96			7 39.0 cM
Transcriptional regulation							
#56	AA210261	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	Ddx3y	M	M	M	Y 2.07 cM
#57	AF127244	jumonji, AT rich interactive domain 1D (Rbp2 like)	Jarid1d	M	M	M	Y 2.03 cM
#58	AA617392	Max protein	Max		F		12 32.0 cM
#59	BB393998	flap structure specific endonuclease 1	Fen1	3.70	(2.96)		---
#60	NM_007496	AT motif binding factor 1	Atbf1			(2.16)	8 E1
Transport							
#61	BC024643	albumin 1	Alb1	(2.71)		(8.68)	5 50.0 cM
#62	AF440692	transferrin	Trf	(2.02)		(3.29)	9 56.0 cM
#63	BB448377	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1	Slc4a1	(2.07)			11 62.0 cM
#64	NM_026331	mitochondrial solute carrier protein	Mscp	(1.90)			---
Others							
#65	BB742957	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chr.	Uty	M	M	M	Y 2.06 cM
#66	AI256465	alpha-2-HS-glycoprotein	Ahsg	F		F	16 15.0 cM
#67	AK003182	myosin, light polypeptide 1	Myl1		F		1 34.1 cM
#68	BG806300	inactive X specific transcripts	Xist	(3.34)	(13.22)	(2.41)	X 42.0 cM
#69	AV224521	gelsolin	Gsn	3.27			2 24.5 cM
#70	NM_025711	asporin	Aspn	2.72			---
#71	BC002136	coronin, actin binding protein 1A	Coro1a			(2.48)	7 62.5 cM
#72	AK017440	RNA imprinted and accumulated in nucleus	Rian		(2.27)		12 54.5 cM
#73	AV156640	expressed in non-metastatic cells 1, protein	Nme1	2.23			---
#74	AF291655	tenomodulin	Tnmd	2.12			---
#75	BB745314	male-specific lethal-2 homolog (Drosophila)	Msl2		(2.11)		---
#76	BB490338	calponin 3, acidic	Cnn3	2.04			---
#77	BB475271	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)	Luc7l2		1.96		---
#78	NM_053123	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	Smarca1		1.93		---
#79	BM207360	unc-50 homolog (C. elegans)	Unc50			1.91	---
#80	AV011848	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Mdh1	1.89			11 12.0 cM
#81	AA270173	Lamin B1	Lmnb1		(1.89)		18 29.0 cM
#82	BB192717	protein phosphatase 2 (formerly 2A), reg. subunit A (PR 65), alpha isoform	Ppp2r1a		(1.88)		---
#83	BE372352	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	Actr3	1.77			---
Unknowns							
#84	AA717264	Transcribed sequences	---		2.51		---
#85	BC021831	CDNA clone MGC:67258 IMAGE:6413648, complete cds	---		(2.14)	(2.36)	---
#86	AK018316	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 145, expressed	D2Erd145e		2.31		2 31.0 cM
#87	BE865094	expressed sequence AI448196	AI448196			(2.14)	---
#88	BB151477	RIKEN cDNA 2810468K05 gene	2810468K05Rik		1.88		---

* - Identification numbers of genes found in this study.

† - Genes are presented in only one functional category although some of them could have been placed in more than one category.

- ‡- Values with no bracket correspond to higher levels for males, while values in brackets correspond to higher levels for females. The letter M (Male) or F (Female) replace the fold change value when the gene was expressed in one sex only.
- §- The number of genes differentially expressed at each gestational day (GD) is indicated.

Tableau 4: Several genes involved in lung development and expressed with no sex difference

FGF signaling pathway		TGF-beta signaling pathway	Surfactant associated proteins	Others
Spry	Fgfbp1	Tgfb1	Sftpa	Egfr
Fgf1	Fgfr1op2	Tgfb2	Sftpb	Igf1
Fgf7	Fgfrap1	Tgfb3	Sftpc	
Fgf13	Akr1b8	Tgfbr1	Sftpd	
Fgf18	Fgfr11	Tgfbr2		
Fgfr1		Tgfbr3		
Fgfr2				
Fgfr3				
Fgfr4				

CHAPITRE III

Les 17 β -hydroxystéroïdes de type 2 et de type 5 ainsi que le récepteur des androgènes dans le poumon fœtal humain

Article publié dans le journal *Molecular and Cellular Endocrinology* [326]
sous le titre :

**Type 2 and 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and androgen
receptor in human fetal lungs**

3.1. Avant-propos

Ce chapitre présente un article qui a été publié dans le journal *Molecular and Cellular Endocrinology* [326]. Voir ci-dessous une brève description des co-auteurs et de leur contribution à cette étude.

Julie Plante, M.Sc. : Mlle Plante, qui a complété une maîtrise en Physiologie-Endocrinologie sous la direction du Dr Yves Tremblay, réalisa les expériences d'hybridation *in situ* et collabora à celles d'immunohistochimie. Elle contribua aussi à la rédaction du manuscrit.

Mélanie Boucher, M.D. : La Dre Boucher, alors étudiante en médecine à l'Université Laval et stagiaire dans le laboratoire du Dr Yves Tremblay, contribua aux expériences d'immunohistochimie et à la recherche de littérature associée à la prématurité.

Pierre R Provost, Ph.D. : Le Dr Provost est professeur associé au département d'obstétrique et de gynécologie de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon co-directeur de thèse et s'impliqua au niveau de l'élaboration du plan expérimental et de la rédaction de l'article.

Yves Tremblay, Ph.D. : Le Dr Tremblay est professeur titulaire au département d'obstétrique et de gynécologie de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon directeur de thèse. Ses implications se situèrent au niveau de l'élaboration du plan expérimental, de la révision de l'article et de la supervision globale du projet.

De mon côté, j'ai contribué à l'élaboration du plan expérimental, collecté les échantillons de poumons fœtaux humains, mené les expériences de PCR en temps réel, contribué aux expériences d'immunohistochimie, coordonné les expérimentations menées par le Dr Pei Min Rong en ce qui concerne les expériences d'immunobuvardage et mené les analyses statistiques ainsi que les analyses de résultats. J'étais aussi responsable de la rédaction du manuscrit et de la préparation des figures et tableaux.

3.2. Résumé en français de l'étude

Les androgènes retardent la maturation pulmonaire par un mécanisme qui est dépendant du récepteur des androgènes (AR). Les 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (17 β HSD) de types 2 et 5 sont respectivement impliquées dans l'inactivation et la synthèse des androgènes. Nous visons dans cette étude à caractériser plus en profondeur le potentiel du poumon fœtal en ce qui a trait au métabolisme des androgènes et à la réponse androgénique. Les niveaux d'ARNm de la 17 β HSD2, de la 17 β HSD5 et de AR ont été déterminés par PCR quantitatif dans des poumons fœtaux de mi-gestation et de dernier trimestre, ainsi que dans des poumons adultes, alors que les protéines à l'étude ont été investiguées par immunohistochimie et immunobuvardage dans les poumons de mi-gestation. Des corrélations entre les niveaux d'expression et l'âge gestationnel ont été observées pour les trois gènes étudiés. Le niveau protéique de AR a montré d'importantes différences entre des individus appartenant pourtant à la même fenêtre gestationnelle. La 17 β HSD2 et le AR ont été co-localisés dans les cellules épithéliales, ainsi qu'au niveau du mésenchyme. Le AR a été détecté dans le cytoplasme ainsi qu'au niveau nucléaire, ce qui suggère une régulation fine de l'occupation du récepteur. La 17 β HSD5 a quant à elle été localisée dans certaines cellules épithéliales des voies aériennes. Nos résultats supportent l'existence d'un métabolisme local des androgènes dans les poumons fœtaux mâles et femelles durant la période où une naissance prématurée présente de hauts risques.

3.3. Type 2 and 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and androgen receptor in human fetal lungs

Marc Simard^{1,3}, Julie Plante^{1,3}, Mélanie Boucher^{1,3}, Pierre R Provost^{1,2,3}, and Yves Tremblay^{1,2,3§}

¹Laboratory of Ontogeny and Reproduction, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ);

²Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine;

³Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR); Laval University, Québec, Canada.

§Address all correspondence and requests for reprints to:

Dr. Yves Tremblay, Ontogeny and Reproduction Unit, Rm T-1-49, Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 Boul. Laurier, Québec City, Québec, Canada, G1V 4G2; Email : yves.tremblay@crchul.ulaval.ca Tel 418-656-4141 ext. 46158; Fax 418-654-2705.

Key words: prematurity, lung maturation, steroidogenesis, testosterone, housekeeping gene stability.

3.4. Abstract

Androgens delay fetal lung maturation through an androgen receptor (AR)-dependent mechanism. Type 2 and 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β HSD) are involved in androgen inactivation and synthesis, respectively. We aimed to further characterize the human fetal lung potential for androgen metabolism and response. 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA levels were determined in lungs of mid-late gestation and in adult lungs, while protein detections were performed at mid-gestation. Relationships between levels of each mRNA and gestational age were observed. AR protein levels showed important differences among individuals of the same gestational window. 17 β HSD2 and AR were co-localized in epithelial and mesenchymal cells. AR was detected in both, cytoplasm and nucleus, which suggests fine-tuning of AR occupancy. In contrast, 17 β HSD5 was localized in a few epithelial cells of conducting zones. Our results support the existence of a local androgen metabolism in male and female human fetal lungs during the period of high-risk premature birth.

3.5. Introduction

Respiratory distress syndrome of the neonate [20] mainly results from surfactant deficiency and exhibits a male prevalence among preterm infants [192, 193]. Numerous positive and negative regulators are involved in the mechanisms leading to surfactant production and secretion by type II pneumocytes (PTII) in late gestation [286]. Steroid hormones have been shown to exert important effects on pulmonary development. Indeed, glucocorticoids accelerate lung maturation [327], while estrogens and androgens have opposite effects, estrogens accelerating, and androgens inhibiting this process [10, 328].

It is well established that androgens delay fetal lung maturation in many species. Indeed, it was shown by Nielsen and co-workers that administration of 5α -dihydrotestosterone (5α -DHT) to pregnant rabbits decreased surfactant production of female fetuses at 26 day gestation, while administration of the antiandrogen flutamide abrogated the sex difference in surfactant production by increasing male levels to those of the females [151]. Exposure of rat lung fibroblasts to androgens decreased their capacity to stimulate surfactant production by PTII cells [295]. Both testosterone and 5α -DHT have been shown to delay surfactant production in organ cultures of human fetal lung tissues [194]. Similar deleterious effects of androgens on surfactant production have been observed in pregnant mice, rats, and rabbits [196, 199, 203]. On the other hand, 5α -DHT has been proposed as positive regulator of branching morphogenesis in developing mouse [329] and human [330] lungs. Androgenic actions in pulmonary development are mediated by androgen receptor (AR), which is present in both male and female fetal lungs [141, 174, 196, 197, 296, 330, 331].

17β -hydroxysteroid dehydrogenases (17β HSD) are involved in the enzymatic control of the amount of active sex steroids in peripheral tissues. Type 5 and 2 17β HSDs are known to catalyze synthesis and inactivation, respectively, of the biologically active androgen testosterone [113]. We previously reported that 17β HSD5, 5α -reductase 1, and 3α HSD3 are the predominant steroidogenic enzymes expressed in the PTII-like cell line A549 [165] and that normal human lung fibroblasts showed a pattern of steroid metabolism oriented

towards androgen inactivation, through expression of 17 β HSD2 and 5 α -reductase [150]. Indeed, 5 α -reductase activity in lung fibroblast cell lines had a marked substrate preference for androstenedione over testosterone, with no formation of 5 α -DHT. The androgen synthesis and inactivation activities reported for A549 cell model and lung fibroblasts, respectively, were interesting in the context of androgen-sensitive regulation of the surge of surfactant through fibroblast-PTII cell-cell communication. We also performed an ontogenetic study in the mouse from gestational day (GD) 15.5 to GD18.5 in which we showed that type 2 and 5 17 β HSD mRNAs are co-expressed in developing male and female mouse lungs with one peak of expression on GD17.5 [141], when the surge of surfactant synthesis occurs. It was therefore suggested that fetal lung of both sexes should produce androgens. In addition, AR mRNA was detected in the gestational time window analyzed, without sex difference or temporal regulation [141].

Accumulating evidences suggest local modulation of androgenic action in both sexes on pulmonary developmental events, while type 2 and 5 17 β HSDs are recognized as key enzymes in the regulation of active steroid levels in peripheral tissues. We aimed to further characterize the human fetal lung potential for androgen metabolism and response. Indeed, one important step in the understanding of such a local metabolism is the determination of cell phenotypes capable of androgen synthesis and inactivation, respectively. We investigated 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA and protein expression in human male and female fetal lungs during the mid-late gestation period.

3.6. Methods

3.6.1. Human Tissues

Adult lung tissues were obtained from patients who have undergone lung surgery for various diagnoses, but the biopsy was taken from a normal part of the resected tissue. The three adult lung samples that are presented in Figure 8 show 17 β HSD2 and 17 β HSD5 mRNA levels that are representative of a heterogeneous sampling of 30 individuals in which both genes have been previously quantified (data not shown). Altogether, this means

that the presented values are representative of a given population and independent of the lung-associated diseases (most probably not biased by a given pathology), and thus we believe they are acceptable representations of “adult lung” levels. Human fetal lung tissues from weeks 17 to 24 6/7 of pregnancy (n = 33, 12 females and 21 males) were obtained from women who gave birth prematurely, or were undergoing termination of pregnancy. Gestational ages have been determined according to a standardized protocol in use in the obstetrics unit, and all mid-gestation samples were obtained from the same unit. Women who received corticosteroids to accelerate fetal lung maturation were excluded of the study (protocol no. 62-05-13). Informed consent was obtained from each patient before their participation in this research project. Any sample obtained from a fetus that was suffering from an abnormality that would have affected lung development was excluded of the analysis (for example, thoracic or cardiac malformations). Total umbilical cord and mid-gestation placenta samples were included as comparison points [149]. Tissues were collected on ice. Then, small lung pieces (~0.5 cm³) were prepared and extensively rinsed in PBS (135 mM NaCl, 2.65 mM KCl, 4.22 mM Na₂HPO₄, 1.45 mM KH₂PO₄). Several pieces were kept frozen until RNA or protein extraction, while others were immediately fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h prior processing for paraffin wax embedding. Tissue sections of 5 μm were then prepared. In addition, lung tissue sections from premature infants deceased after birth were obtained from the Cooperative Human Tissue Network (CHTN), USA, and seven total RNA samples of human fetal lungs (28 to 40 weeks’ pregnancy; 3 males and 4 females) were purchased from Medicorp Inc, Canada.

3.6.2. Quantitative real-time PCR and housekeeping gene stability evaluation

RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR were performed as described previously [141]. Briefly, total RNA extracts were prepared from ~0.5 cm³ lung samples and then purified on CsCl gradients. RNA integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis. An aliquot of 4 μg of total RNA was treated with DNase (DNase I, 0.25 unit/μg of total RNA), and reverse transcribed (Superscript II, Invitrogen Life Technologies Inc., CA, USA) according to the protocol of the manufacturer, using hexameric random primer (pd(N)₆, Invitrogen Life Technologies, Inc.) in a final volume of 20 μl. LightCycler-

FastStart DNA Master SYBR Green I kits (Roche, IN, USA) were used for QPCR. Reactions were performed with 0.5 μ M of each primer, 3 mM MgCl₂, and an amount of cDNA samples corresponding to 100 ng of total RNA input in a final volume of 20 μ l. The analyzed human genes and quantitative real-time PCR conditions are presented in Table 5. After enzyme activation (10 min, 95 C), PCR cycles were performed: 5 sec, denaturation 95 C; 5 sec, annealing temperature (see Table 5); 20 sec, elongation 72 C; 5 sec, temperature of fluorescence intensity reading (see Table 5). At the end of each run, samples were heated to 95 C with a temperature transition rate of 0.2 C/sec to construct dissociation curves. For each gene analyzed, several amplicons were checked on a 2% agarose gel and sequenced to confirm specificity of reactions. The standard curves required in the external standard normalization method were prepared with specific PCR amplicons diluted in 0.1X reverse transcriptase buffer, i.e. the same concentration as the cDNA samples, as previously reported [332]. The LightCycler Software version 3.5 (Roche) was used to import standard curves and calculate the amount of PCR products. To ensure an accurate evaluation of target gene relative expression, we assessed the expression stability of five housekeeping genes (GAPDH, HPRT1, SDHA, TBP, and YWHAZ, see Table 5), based on the approach proposed by Vandesompele [333]. Housekeeping gene expression levels measured in lung samples were evaluated with the geNorm program [333], which estimates gene stability through numerous pair-wise comparisons. Following gene stability analysis, normalization factors were calculated from expression levels of the three most stable housekeeping genes, which were then used to normalize expression levels of target genes.

3.6.3. Protein extraction and Western blot analysis

Lung tissues were homogenized in lysis buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 20 mM β -glycerophosphate, 8 mM Na pyrophosphate, 1X protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma, MO, USA)) and protein concentrations were determined by Bradford protein assay (Bio-Rad, ON, Canada). Samples were then solubilized in SDS-PAGE sample buffer containing 1% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.025% bromophenol blue, heated at 95 C for 3 min, then stored at -20 C. Approximately 50 μ g of

fetal lung proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After transfer, proteins were visualized by Ponceau red staining. Membranes were incubated overnight at 4 C with 5% fat-free dry milk powder in PBS containing 0.1% Tween 20, then incubated with our rabbit anti-17 β HSD2 polyclonal antibody (1:1000) [149], a mouse anti-17 β HSD5 antibody (1:1000) (monoclonal, clone #NP6.G6.A6, Sigma; kindly provided by Dr. T Penning, University of Pennsylvania, USA), a rabbit anti-androgen receptor polyclonal antibody (1:500) (AR (N-20) sc-816; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), or a mouse anti- α -tubulin antibody (1:50000) (monoclonal, clone #B-5-1-2, Sigma) for 2 h at room temperature. After washing, bound antibodies were revealed by chemiluminescence with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG antibodies (1:5000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA) using a Western Lightning kit (PerkinElmer, MA, USA). As positive controls, we used protein extracts of HK293 cells expressing recombinant 17 β HSD2 or 17 β HSD5, and T47D cells (human ductal breast epithelial tumor cell line) (kindly provided by Dr. V Luu-The, CRCHUL, QC, Canada).

3.6.4. Immunohistochemistry

Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and incubated in methanol:hydrogen peroxide (97:3) 30 min. An antigen retrieval step was carried out in sodium citrate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M sodium citrate) by boiling slides in a microwave oven. Slides were then cooled down, rinsed 5 min in water and 5 min in PBS. Unspecific binding was blocked by 1 h incubation at room temperature in coupling solution (10% goat serum in PBS containing 0.1% BSA and 0.4% Triton X-100). Tissue sections were incubated overnight at 4 C in a humidified chamber with one of the following primary antibody: anti-17 β HSD2 antibody (1:200), anti-17 β HSD5 antibody (1:100), anti-androgen receptor antibody (1:50), mouse anti-cytokeratin 18 monoclonal antibody (Abcam Inc., MA, USA) (1:200), mouse anti- α -smooth muscle actin monoclonal antibody (Calbiochem, VWR International Ltd., QC, Canada) (1:200). Slides were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (DakoCytomation Inc., ON, Canada) or goat anti-mouse IgG (Chemicon International Inc., ON, Canada) antibodies for 1 h at room temperature. Antigen-antibody complexes were

revealed with the streptavidin-biotin peroxidase reaction method using an ABC Vectastain Elite kit (Vector Laboratories Inc., CA, USA) and AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) as chromagen. Counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin. Adsorbed anti-17 β HSD2 antiserum was used as negative control [149]. For the other primary antibodies, coupling solution with no antibody or with mouse or rabbit IgG (Chemicon International Inc.) was used, accordingly.

3.6.5. RNA probe synthesis and in situ hybridization

A 17 β HSD2 cDNA fragment corresponding to nucleotides 56-356 of the mRNA sequence (#accession NM_002153) was amplified by PCR from human lung cDNA using the primers 5'-GGG-GAA-TTC-TCT-CCC-CTC-CCT-TCT-TGA-CT-3' and 5'-GGG-AAG-CTT-CAC-CGA-GAA-GAG-GAT-CAA-GC-3'. The resulting fragment was then inserted into pSV-SPORT-1 (Invitrogen Life Technologies Inc.). RNA probes were synthesized using DIG-UTP substrate (Roche) with 1 μ g DNA, 2 μ l of 10X transcription buffer (Roche), 2 μ l NTP labeling mix (Roche), 20 U RNase inhibitor (Promega), and 40 U SP6 (sense) or T7 (antisense) polymerase (Roche) in a final volume of 20 μ l. Degradation of DNA matrix was made with 20 U of DNase I (Roche). After precipitation, probes were quantified by UV band densitometry following gel electrophoresis. Tissues were deparaffinized, rehydrated, and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS for 5 min. Slides were incubated in ethanol:glacial acetic acid (95:5) for 10 min at -20 C, and rehydrated. Tissues were equilibrated in PBS and then incubated in preheated proteinase K (Roche) (10 μ g/ml in PBS) 15 min at 37 C. Protease action was stopped with glycine (2 mg/ml). Tissues were acetylated in 0.25% acetic anhydride in 100 mM triethanolamine pH 8.0 for 10 min, and washed in PBS. Slides were prehybridized 2 h at 42 C in a humid chamber with hybridization solution (0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1X Denhardt's (100X = 2% BSA, 2% polyvinylpyrrolidone, and 2% Ficoll), 250 μ g/ml tRNA, 5% dextran sulfate, 0.02% SDS, 50% formamide, 250 μ g/ml herring sperm). DIG-cRNA probes were denatured and diluted at 5 ng/ μ l. Hybridization was performed overnight at 42 C in a humid chamber. Slides were washed 2x5 min in 2X SSC. After RNase A treatment for 10 min in 2X SSC, slides were washed 10 min in 2X SSC, 2x10 min

in 1X SSC at 42 C, and 2x10 min in 0.2X SSC at 42 C. Slides were equilibrated 2x10 min in detection buffer #1 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl). Unspecific binding was blocked with blocking solution (10 ml = 9.3 ml 0.3% Triton X-100 in detection buffer #1, 500 μ l goat serum, 200 μ l 100 mM levamisole in detection buffer #1) for 1 h in a humid chamber. Slides were incubated with anti-DIG-AP fab fragment (1/1000 in blocking solution) for 2 h, washed 2x10 min in detection buffer #1, and then incubated 10 min in detection buffer #2 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂). Slides were incubated with substrate solution (10 ml = 200 μ l NBT (100 mg/ml) / BCIP (50 mg/ml), 20 μ l 100 mM levamisole in detection buffer #1, 9.78 ml detection buffer #2) until reaction appeared (1.25 h to 7.5 h). Slides were then immersed 10 min in stop solution (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5), washed in water, counterstained with 0.25% neutral red, washed, dehydrated, cleared in xylene, and mounted with Permount (Fisher Scientific, ON, CAN).

3.6.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, CA, USA). Unpaired Student's t-tests were used to compare groups, and Pearson's correlation analyses were used to test relationships between variables. When normality of data could not be assumed even after a log transformation, a non-parametric test was performed (Mann Whitney test for group comparisons; Spearman test for correlations). A difference with a *p* value of less than 0.05 was considered as significant.

3.7. Results

3.7.1. Evaluation of housekeeping gene stability in human fetal lung samples and normalization of QPCR data

Expression levels of five housekeeping genes (GAPDH, HPRT1, SDHA, TBP, and YWHAZ, see Table 5) were measured by QPCR in 27 human fetal lung samples at mid-pregnancy. Gene expression stability was determined using the geNorm software [333]. The genes, ranked according to their stability score *M*, are presented in Table 5. Based on

these results, normalization of target genes was performed using normalization factors derived from expression values of the three most stable housekeeping genes, namely TBP, SDHA, and YWHAZ. In addition, two approaches of QPCR data normalization, the external standards and the delta-ct methods, were compared. A modified delta-ct method with amplification efficiency correction and normalization by multiple housekeeping genes was performed using the qBase software [334]. Relative expression levels obtained with both approaches were very similar (data not shown). Data presented in the following section were normalized using the external standards method.

3.7.2. Relative 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA levels in human fetal lungs at mid-late pregnancy and in adult lungs

Normalized expression levels of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNAs in male and female human fetal lung samples of 17-40 weeks' pregnancy, and in human adult lung samples, are presented in Figure 8. The three target genes were detected in all samples, with 17 β HSD2 mRNA showing the highest inter-individual variability. Coefficients of correlation between gene expression level and gestational age, as well as correlations in expression from gene to gene, were calculated with expression data from all individuals (n = 40) or according to sex (females = 16 and males = 24). Significant moderate relationships were observed for several groups (Table 6). There is an increase in expression over time for 17 β HSD2 and 17 β HSD5. For these two genes, a statistically significant difference in expression is also observed when samples from mid-gestation (17-24 6/7 weeks' pregnancy) and late gestation (28-40 weeks' pregnancy) are compared. 17 β HSD2 and 17 β HSD5 mRNA levels reach values close to these of the adults during the last trimester of pregnancy. A decrease in AR expression is observed over gestation time, reaching the adult level in the third trimester. A significant difference in AR expression is also observed when samples from mid and late gestation are compared. In addition, some differences in the correlation factors are observed when sexes are analyzed separately. For example, correlation of 17 β HSD2 mRNA expression with gestational age is higher in males ($r = 0.751$) than females ($r = 0.624$), and the correlation between 17 β HSD2 and 17 β HSD5 expression levels is stronger in the female group ($r = 0.747$) than in the male group ($r =$

0.436) (Table 6). For each gene, means of expression levels between fetal males and females showed no significant difference. To give other comparison points to expression data, mRNA levels were quantified in umbilical cord and mid-gestation placenta samples. When compared with the male adult lung sample (see Figure 8), 17 β HSD2 mRNA levels were 9-fold higher in umbilical cord and 144-fold higher in mid-gestation placenta. 17 β HSD5 mRNA levels were 23.5-fold and 6-fold lower, while AR mRNA levels were 3.7-fold and 12-fold lower, in umbilical cord and mid-gestation placenta, respectively, than in the male adult lung sample.

3.7.3. Western blot analysis of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR proteins in human fetal lungs at mid-pregnancy

The presence of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR proteins was investigated in 20 human fetal lung samples by Western blot (Figure 9). These samples were also analyzed by QPCR in Figure 8. Using antibodies against 17 β HSD2 and 17 β HSD5, specific bands were observed in every sample, with minor variations in intensity. In contrast, using the anti-AR antibody, a much stronger signal was detected in 7 out of 20 fetal lung samples, while a weak specific band was observed in several others when the film was exposed for longer time. No correlation between sex, gestational age, or corresponding mRNA levels was observed.

3.7.4. Localization of 17 β HSD2 mRNA and protein, and 17 β HSD5 and AR proteins in human fetal lungs at mid-pregnancy

17 β HSD2 mRNA was localized in the human fetal lung at mid-pregnancy by in situ hybridization (Figure 10). Positive signals with antisense 17 β HSD2 RNA probe were detected in epithelial cells of the respiratory zone (comprising bronchioles to alveolar ducts), and to a lesser extent in epithelial cells of the conducting zone (comprising trachea to bronchus) (Figure 10A-F). A noteworthy observation is the more intense staining found in budding portions of developing respiratory ducts (Figure 10F). Positive signal for 17 β HSD2 mRNA was also detected in mesenchymal cells (Figure 10A-F). The signal was faintly detected, or was close to the background, in smooth muscle cells surrounding blood

vessels (Figure 10D-E) and air ducts (Figure 10A-F). The signal was negative, or close to the background, in endothelial cells of blood vessels (Figure 10D-E). No signal was observed with the sense probe (Figure 10G).

17 β HSD2 protein was also analyzed by immunohistochemistry during the same gestation period (Figure 11A-C). The distribution pattern of the protein is similar to that of the mRNA. However, positive signals detected in epithelial cells of conducting zones showed stronger intensity than these in epithelial cells of respiratory zones. The protein was also detected to a lesser extent in mesenchymal cells (Figure 11A-C). Weak stainings were observed on some endothelial (data not shown) and α -smooth muscle actin-positive cells (Figure 11A-C, M). Although present in the cytoplasm, the positive signals obtained for 17 β HSD2 protein are mainly observed toward the apical side of epithelial cells (Figure 11B and data not shown) as for the positive signals obtained with an anti-cytokeratin 18 antibody (Figure 11L), which is an epithelial cell marker [335].

17 β HSD5 protein was localized by immunohistochemistry in human fetal lungs at mid-pregnancy (Figure 11D-F). Positive signals obtained with the anti-17 β HSD5 antibody were restricted to a subset of epithelial cells. Several epithelial cells of conducting zones (Figure 11D, F) showed positive signals with the anti-17 β HSD5 antibody. Interestingly, a few epithelial cells in air ducts were strongly stained, while the majority was negative. Even though some epithelial cells in the respiratory zones were positive (Figure 11E), the signal was mostly close to the background or absent in this area. Positive signals for 17 β HSD5 protein are spreaded in the cytoplasm of epithelial cells. No signal was observed on smooth muscle cells surrounding blood vessels or air ducts. Endothelial cells were also negative.

Androgen receptor protein was detected by immunohistochemistry in human fetal lungs (Figure 11G-I). Positive signal distribution obtained with the anti-androgen receptor antibody was similar to that observed with the anti-17 β HSD2 antibody. Strong positive signals were observed in epithelial cells of conducting and respiratory zones. In addition, some cells in the mesenchyme were also clearly positive. The androgen receptor was also detected weakly in some smooth muscle cells around blood vessels (data not shown) and

air ducts of the conducting zone (Figure 11I). A signal close to the background was observed in some endothelial cells, while most of these were negative. Positive signal for androgen receptor protein was concentrated in cell nuclei, although it was also present in the cytoplasm.

No difference in localization patterns was observed between sexes or according to gestational age in the time window analyzed for 17 β HSD2, 17 β HSD5, and androgen receptor. However, variability in signal intensity was observed between individuals. Localization results are summarized in Table 7.

3.8. Discussion

Important effects of androgens on mechanisms of fetal lung maturation have been reported in many species. The steroidogenic enzymes 17 β HSD2 and 17 β HSD5 catalyze inactivation and synthesis of androgens in peripheral tissues, respectively. Their expression was studied in human lung cell lines [150, 165] and in the fetal mouse lung [141], but not in the human fetal lung. Here, we report the presence of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNAs and proteins in human fetal lungs of 17-40 weeks' pregnancy. Moreover, we show for the first time that 17 β HSD2 and 17 β HSD5 proteins are expressed according to different tissue- and cell-specific patterns and that AR protein levels are suggestive of differential androgen sensitivity between individuals during a gestational time window that overlaps the period of high-risk premature delivery in humans. This is an important step in characterizing the molecular machinery involved in androgen metabolism and response in the developing lung.

Levels of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNAs by QPCR (Figure 8), and levels of their corresponding proteins by Western blot (Figure 9) in fetal lung samples support the occurrence of local androgen metabolism in the human fetal lung. We previously reported that 17 β HSD2 and 17 β HSD5 mRNAs are co-regulated in the developing mouse lung [141]. A relationship between expression levels of these two genes was also observed in human fetal lung samples in the gestation period studied (Table 6). In addition, significant

moderate relationships were observed between expression levels and gestational age with positive relationships for 17 β HSD2 and 17 β HSD5, and a negative relationship for AR. The decrease in AR mRNA level is compatible with a previous study reporting that AR protein is lower in adult than fetal human lung tissues [174]. Variations in 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA levels detected from the whole tissue could be attributed to the proportion of specific positive cells, to gene expression levels, or both. One possibility is that the correlations between gestational age and expression levels observed during the canalicular/saccular stages could arise from one or some of the cell types expressing the genes in relation to lung developmental events and structural evolution, such as remodeling.

We show that 17 β HSD2 transcript and protein are expressed in the human fetal lung mainly by epithelial and mesenchymal cells, thus suggesting that androgen inactivation potential is widely distributed in the tissue. The cellular distribution of 17 β HSD2 mRNA and protein are similar. However, positive hybridization signals in epithelial cells of the respiratory zone appears stronger than in epithelial cells of the conducting zone, while the mirror pattern is observed for immunohistochemistry positive signals. Technical considerations could explain these results since the relative intensities varied from antibody to antibody using three different anti-17 β HSD2 antibodies (data not shown). However, it is not ruled out that regulatory mechanisms may differentially control mRNA and protein levels according to the cell phenotype.

Immunohistochemistry results presented here are compatible with a previous report of AR localization in human fetal lungs at 13-16 weeks' pregnancy [330], where AR was detected predominantly in epithelial cells of the budding component. Besides, we also observed important differences in AR protein levels between fetal lung samples (Figure 9C). This could suggest that within the relatively short gestational period studied the capacity to respond to the presence of androgens may vary from individuals to individuals. In fact, we don't know whether the androgenic pressure, which is influenced by active steroid titers, receptor concentrations, and expression of co-regulators, is different between those fetuses. Since the variations in AR protein levels did not correlate to their corresponding mRNA

levels, it is possible that AR turnover be different between individuals. The similarity in 17 β HSD2 and AR localization suggests a metabolic relationship between the two proteins. Indeed, 17 β HSD2 could be involved in fine-tuning of androgen receptor occupancy, either, by its expression in AR-positive cells, or by its general effect on lung androgen levels since 17 β HSD2 is expressed in a large proportion of pulmonary cells.

We also report for the first time expression of 17 β HSD5 protein in the human fetal lung. The expression pattern of 17 β HSD5 is quite different from these of 17 β HSD2 and AR and shows that specific cells in the conducting zones have the capability to produce active androgens. One would suggest that this specific expression could be related to the cell differentiation state of 17 β HSD5-positive cells, and/or to a cellular sub-population of epithelial cells. Androgens produced locally by 17 β HSD5 could exert their effects directly on 17 β HSD5-positive cells, and/or on surrounding cells through a paracrine action. Indeed, AR was detected in 17 β HSD5-positive and -negative epithelial cells, as well as in some mesenchymal cells. We showed previously that 17 β HSD5 was expressed by the PTII-like cell line A549 [165], and we hypothesized that androgens produced in the lung could be involved in cell reprogramming following the surge of surfactant synthesis [141]. No alveolar sacs are yet formed in the human fetal lung during the gestational period studied, therefore the role of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR in mature exchange zones have still to be investigated later in gestation. Nevertheless, a role at mid-gestation may be envisaged for type 2 and 5 17 β HSDs in intracrine and/or paracrine regulation of active androgen levels.

Type II epithelial cell maturation is regulated by fibroblast-epithelial cell-cell communication [58, 336], and is known to be delayed by androgens [197, 199, 337]. More generally, there is evidence in the literature showing that expression gradients and local regulations of various growth factors and hormones play important roles in lung development [336, 338]. The spatial-specific expression of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR in the fetal lung is suggesting of a role for these proteins in such a cell-cell communication. For instance, one would postulate that expression of 17 β HSD5 in epithelial cells of

conducting zones would lead to an androgenic microenvironment that is influencing region-specific cell-cell communication. Because type 1 5α -reductase, was also localized in epithelial cells of the human fetal lung in early gestation [330], it can also participate, along with 17β HSD2 and 17β HSD5, to the control of local androgenic pressure.

In addition to their actions toward androgens that are of major interest in the physiological context of lung maturation and development, type 2 and 5 17β HSDs exert other enzymatic activities. Indeed, 17β HSD2 has the capacity to inactivate estradiol to estrone, as well as to convert 20α -dihydroprogesterone into progesterone, while 17β HSD5 displays 3α HSD, 20α HSD, dihydrodiol dehydrogenase, and prostaglandin synthase activities in addition to 17β HSD activity [113]. Therefore, the two enzymes could potentially be involved in several enzymatic pathways in the developing lung, including androgen metabolism. A role in androgen metabolism is strongly suggested by the findings of steroidogenic activities in A549 cells [165], and normal lung fibroblasts [150], as well as by co-expression of 17β HSD2 and AR presented in this report.

Our results show that male and female human fetal lungs have capability of androgen synthesis from circulating precursors through expression of 17β HSD5, and of androgen inactivation through expression of 17β HSD2, involving specific cell types. Importantly, our data support the occurrence of androgen metabolism in the developing lung of both sexes in a time window that overlaps the period of high-risk premature birth. Based on these results, a potential treatment of delayed lung maturation should consider that although androgens are responsible for deleterious effects in male premature infants, they are putatively important in the lung development of both male and female.

3.9. Acknowledgements

We thank Michèle Dubeau, Suzanne Ferland, and nurses from the Centre Mère-Enfant of the CHUQ for tissue collection, as well as staff from the pathology service of the CHUL for tissue sampling. We also thank Dr. Pei Min Rong for excellent technical assistance, as well as Dr. Trevor Penning from the University of Pennsylvania for the anti- 17β HSD5 antibody.

Some tissue sections were provided by the Cooperative Human Tissue Network which is funded by the National Cancer Institute (USA). Other investigators may have received samples from these same tissues. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the *Fonds de la recherche en santé du Québec-réseau en santé respiratoire* (FRSQ-RSR), the *Fonds de la recherche en santé du Québec-réseau en santé, développement et bien-être de l'enfant* (FRSQ-RSDBE), and the *Fondation Jeanne et Jean-Louis Lévesque* (JJL) to YT. MB was supported by a training grant from the Faculty of Medicine, Laval University. MS was supported by a Ph.D. studentship award from the FRSQ-RSR.

3.10. Figure legends

Figure 8: 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR mRNA levels in human fetal and adult lungs

17 β HSD2 (*Panel A*), 17 β HSD5 (*Panel B*), and AR (*Panel C*) relative mRNA levels were measured in human fetal and adult lungs. QPCR reactions were performed on lung samples obtained from 40 patients (24 males and 16 females) from 17-40 weeks' pregnancy, and from three adults. Each individual value (\pm SD) is normalized using factors generated from expression values of three housekeeping genes, namely TBP, SDHA, and YWHAZ.

Figure 9: Immunoblots of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and androgen receptor in human fetal lungs

Immunoblots of 17 β HSD2 (*Panel A*), 17 β HSD5 (*Panel B*) and androgen receptor (*Panel C*) in 20 human fetal lung samples (13 males, 7 females) obtained between 17 and 24 ⁶/₇ weeks' pregnancy. Anti- α -tubulin (*Panel D*) was used as control to normalize for protein amount. Positive controls (Ctl) were included: HK293/recombinant 17 β HSD2 (*Panel A*), HK293/recombinant 17 β HSD5 (*Panel B*), T47D cell extract (*Panel C*). Importantly, although AR was detected at a higher level in 7 samples (5 males and 2 females) out of 20, it was also detected in other samples when the exposure period was increased. Molecular markers (kDa) are shown (M) and arrows indicate the position of target proteins (17 β HSD2: ~42 kDa; 17 β HSD5: ~38 kDa; AR: ~110 kDa; α -tubulin: ~50 kDa). Sex (male ♂, female ♀) and gestational age (weeks) are indicated. The figure is composed of three separate representative blots (n = 3 for each).

Figure 10: Localization of 17 β HSD2 mRNA in human fetal lungs by in situ hybridization

Antisense 17 β HSD2 RNA probe (*Panels A-F*); sense 17 β HSD2 RNA probe (*Panel G*). Positive signals are blue. Experiments were performed on several male and female lungs covering the gestational period studied. Here, selected representative photographs are shown: female 20 ²/₇- (*Panels A, B, G*), male 19- (*Panel C*), and male 22 ¹/₇- weeks' pregnancy (*Panels D-F*). Magnifications: *A, B, G*, 200X (scale bar 100 μ m); *C-F*, 400X

(scale bar 100 μm). **CZ**, conducting zone; **RZ**, respiratory zone; **M**, mesenchyme; **SM**, smooth muscle; **E**, epithelium; **BV**, blood vessel.

Figure 11: Localization of 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR proteins in human fetal lungs by immunohistochemistry

Anti-17 β HSD2 antibody (*Panels A-C*); anti-17 β HSD5 antibody (*Panels D-F*); anti-androgen receptor antibody (*Panels G-I*); mouse IgG as negative control (*Panel J*); rabbit IgG as negative control (*Panel K*); anti-cytokeratin-18 antibody (*Panel L*); anti- α -smooth muscle actin antibody (*Panel M*). Positive signals are red. Experiments were performed on several male and female lungs covering the gestational period studied. Here, selected representative photographs are shown: female 20 $^{2/7}$ - (*Panels A, B, F-I*), male 23 $^{5/7}$ - (*Panels C, D, K*), female 20 $^{3/7}$ - (*Panels E, J*), and male 23 $^{2/7}$ - weeks' pregnancy (*Panels L, M*). Magnifications: *A, D, G, J-M*, 200X (scale bar 100 μm); *B, C, E, F, H, I*, 400X (scale bar 100 μm). **CZ**, conducting zone; **RZ**, respiratory zone; **M**, mesenchyme; **SM**, smooth muscle; **E**, epithelium; **BV**, blood vessel.

3.11. Figures

Figure 8

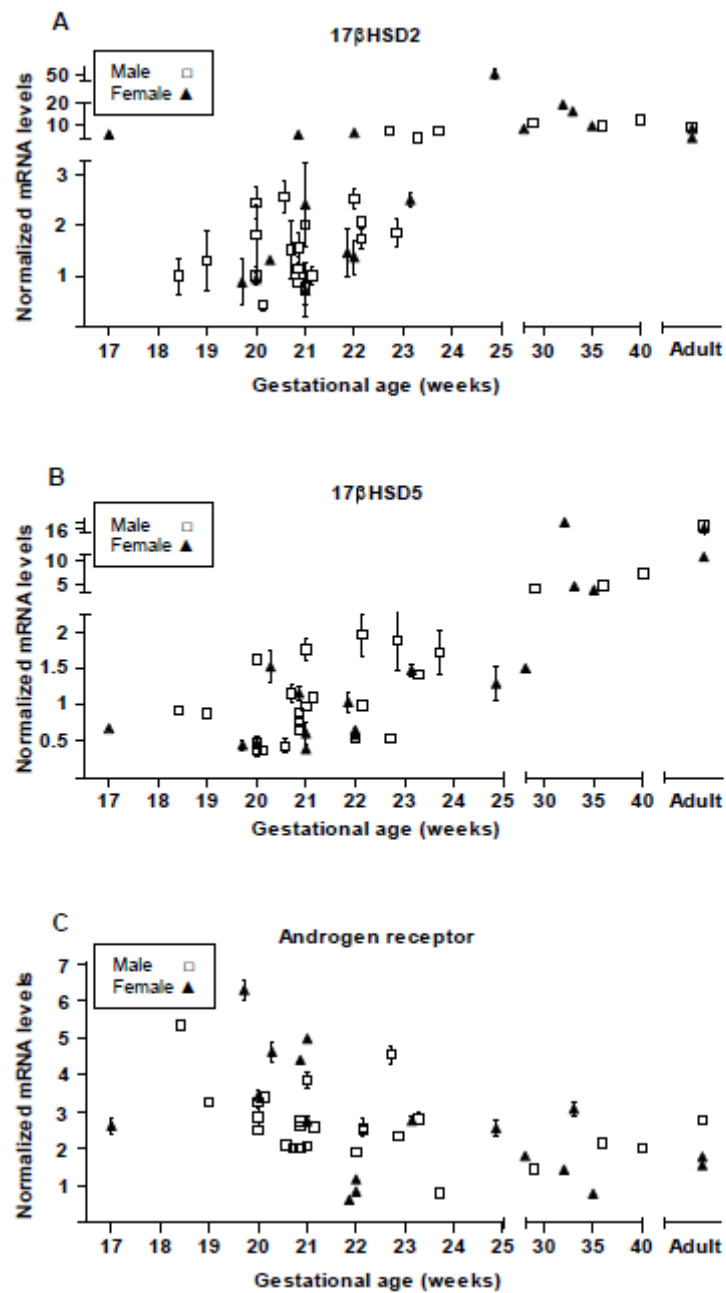


Figure 9

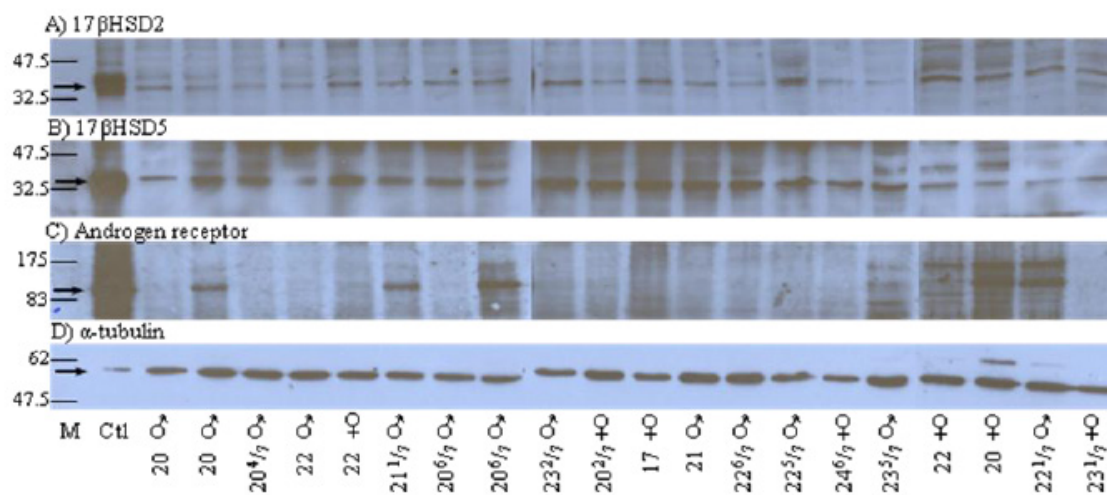


Figure 10

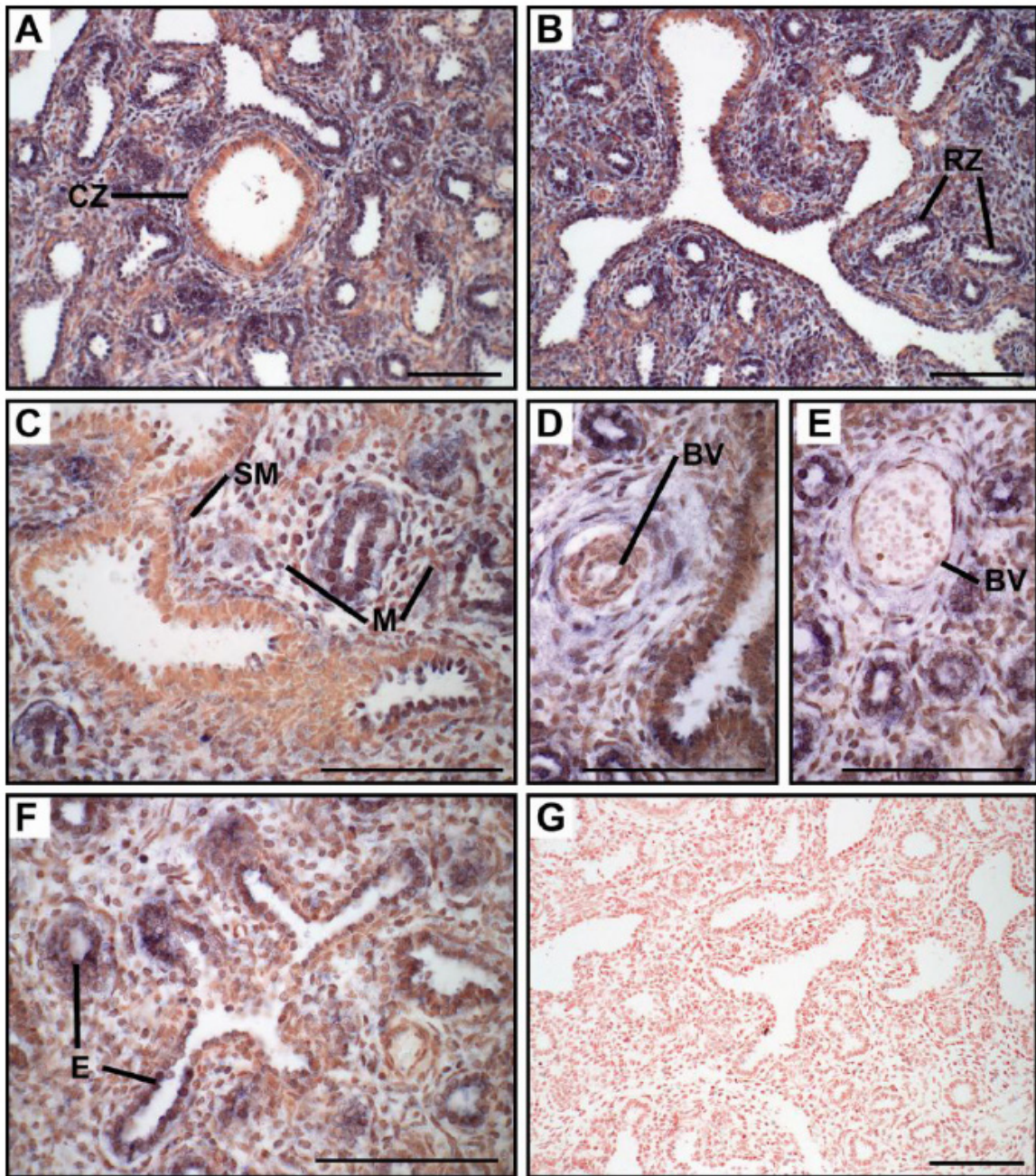
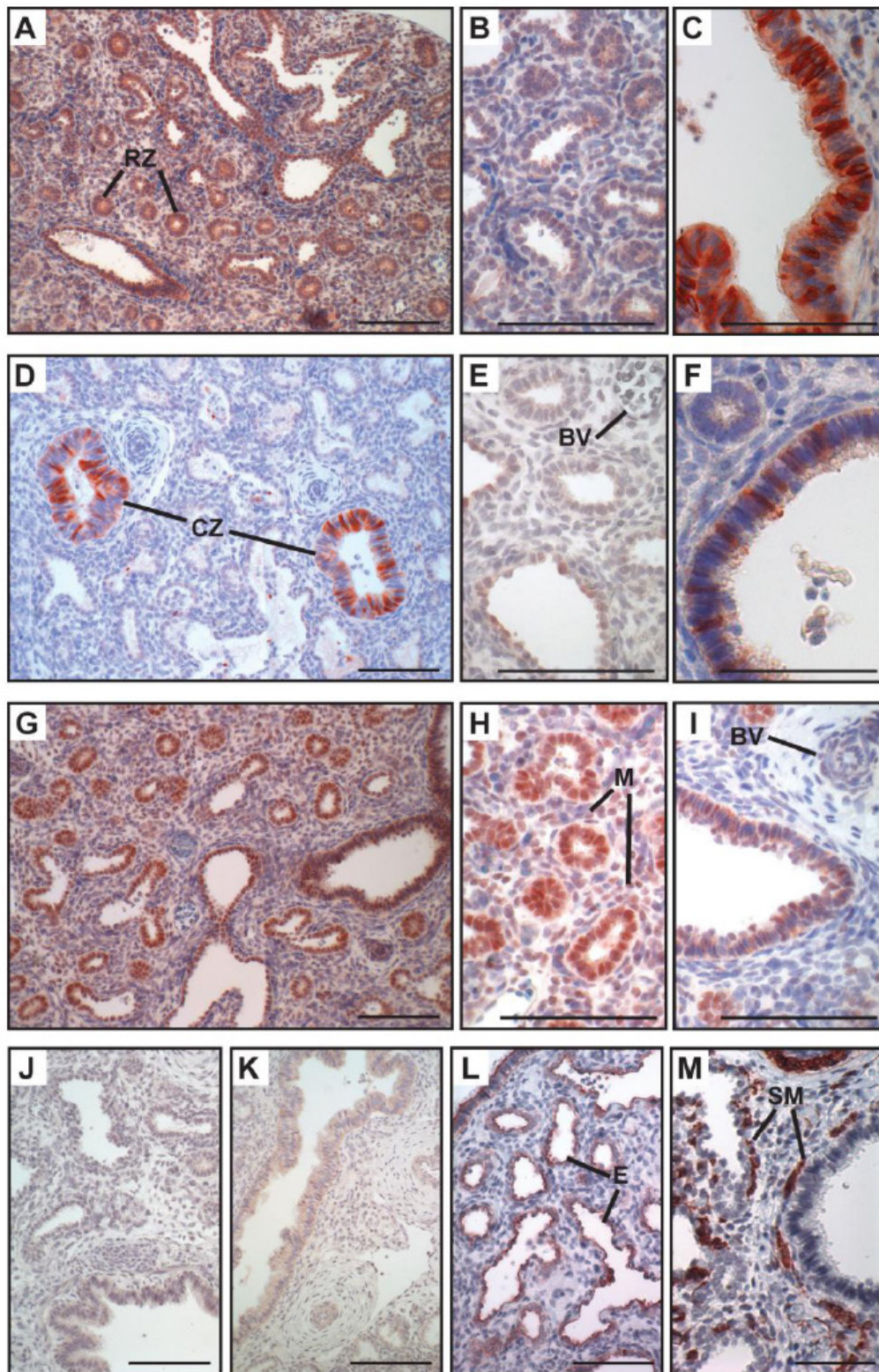


Figure 11



3.12. Tables

Tableau 5: Analyzed genes, quantitative real-time PCR conditions, and housekeeping gene rankings according to their expression stability in human fetal lung samples

Human genes ^a (GenBank Accession #)	Oligonucleotides ^b	Experimental conditions			QPCR data		
		Ann. ^c T°C	Acq. ^d T°C	# of cycles	E value ^e	M value (rank) ^f	Mean Cp ^g
<i>Target genes</i>							
17βHSD2 (NM_002153)	S: 5'-TGTCAGCAGCATGGGAGGAG-3' AS: 5'-CGCCAAGATAGCATGCTGGA-3' <i>Amplicon length</i> : 346 pb	70	84	40	1.81	---	32.24 ±1.69
17βHSD5 (NM_003739)	S: 5'-TGGAAAACCTCACTGAAGAAAGC-3' AS: 5'-ACCCATCGTTTGTCTCGTTGA-3' <i>Amplicon length</i> : 388 pb	65	84	45	1.76	---	34.26 ±1.15
AR (M23263)	S: 5'-CTTCGCCCCCTGATCTGGTTTT-3' AS: 5'-TCCAGGAGCTTGGTGAGCTG-3' <i>Amplicon length</i> : 303 pb	63	82	40	1.76	---	24.35 ±0.95
<i>Housekeeping genes</i>							
TBP (NM_003194)	S: 5'-GAACCACGGCACTGATTTTC-3' AS: 5'-CCCCACCATGTTCTGAATCT-3' <i>Amplicon length</i> : 158 pb	58	80	40	1.88	0.29 (1)	24.76 ±0.76
SDHA (NM_004168)	S: 5'-TACAAGGTGCGGATTGATGA-3' AS: 5'-CACAGTCAGCCTCGTTCAAA-3' <i>Amplicon length</i> : 175 pb	59	83	45	1.92	0.29 (1)	23.25 ±0.62
YWHAZ (NM_003406)	S: 5'-AGACGGAAGGTGCTGAGAAA-3' AS: 5'-GAAGCATTGGGGATCAAGAA-3' <i>Amplicon length</i> : 127 pb	59	76	40	1.90	0.38 (2)	20.21 ±0.58
HPRT1 (NM_000194)	S: 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3' AS: 5'-GGTCCTTTTACCAGCAAGCT-3' <i>Amplicon length</i> : 94 pb	59	78	40	1.97	0.45 (3)	25.99 ±0.74
GAPDH (NM_002046)	S: 5'-GAAGACTGTGGATGGCCCTC-3' AS: 5'-GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC-3' <i>Amplicon length</i> : 358 pb	58	88	40	2.01	0.54 (4)	19.67 ±0.81

^a17βHSD = 17β-hydroxysteroid dehydrogenase; AR = androgen receptor; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HPRT1 = hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; SDHA = succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein; TBP = TATA box binding protein; YWHAZ = tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

^bS = sense; AS = antisense; bp = base pair.

^cAnn. T°C = annealing temperature.

^dAcq. T°C = acquisition (fluorescence intensity reading) temperature.

^eThe amplification efficiency value (E), for each gene, is calculated from the slope of the corresponding standard curve, using the formulae $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

^fThe M value is an indicator of expression stability generated by geNorm. A lower value represents a higher stability. Gene stability analysis using geNorm requires gene ratios, therefore the two most stable genes cannot be ranked.

^gMean crossing point (Cp) values ± standard deviation (SD) are indicated to give an estimate on the relative abundance of the analyzed genes in samples at mid-gestation. A lower value represents a more abundant transcript.

Tableau 6: Statistically significant correlations between mRNA expression level and gestational age, and between mRNA expression levels, for 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR in human fetal lung samples (n = 40; 24 males, 16 females)

	Pearson (Spearman) r	95%CI	P value
<i>Expression level vs Gestational age^a</i>			
17 β HSD2 - all samples	0.680	0.468 to 0.818	<0.0001
17 β HSD2 - males	0.751	0.498 to 0.886	0.0001
17 β HSD2 - females	0.624	0.186 to 0.855	0.0098
17 β HSD5 - all samples	(0.666)	0.439 to 0.813	<0.0001
17 β HSD5 - males	(0.665)	0.346 to 0.849	0.0004
17 β HSD5 - females	(0.675)	0.254 to 0.881	0.0042
AR - all samples	(-0.538)	-0.732 to -0.264	0.0003
AR - males	(-0.511)	-0.764 to -0.123	0.0107
<i>Inter-gene correlations^a</i>			
17 β HSD2 vs 17 β HSD5	(0.578)	0.316 to 0.758	<0.0001
17 β HSD2 vs 17 β HSD5 - males	(0.436)	0.026 to 0.720	0.0333
17 β HSD2 vs 17 β HSD5 - females	(0.747)	0.386 to 0.910	0.0009
17 β HSD5 vs AR - all samples	(-0.376)	-0.621 to -0.0630	0.0169
17 β HSD5 vs AR - males	(-0.425)	-0.714 to -0.0136	0.0383

^aNon-significant correlations are not presented.

Tableau 7: Summary of localization results for 17 β HSD2, 17 β HSD5, and AR in human fetal lung samples

	17 β HSD2 - ISH	17 β HSD2 - IHC	17 β HSD5 - IHC	AR - IHC
Epithelial cells in conducting zones (proximal)	++	++++	+++	++++
Epithelial cells in respiratory zones (distal)	++++	+++	+/-	++++
Mesenchymal cells	+++	++	-	++
Endothelial cells	+/-	+/-	-	+/-
α -sma-positive cells – around air ducts	+/-	+/-	-	+/-
α -sma-positive cells – around blood vessels	+/-	+/-	-	+/-

ISH: in situ hybridization; IHC: immunohistochemistry; α -sma: α -smooth muscle actin; Arbitrary evaluations of staining are to be compared between structures, not between targets; Key to symbols: - negative; +/- faintly detected or close to the background; + to ++++ relative positive staining.

CHAPITRE IV

Expression de gènes associés à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien dans le poumon foetal murin tard en gestation

Article publié dans le journal *Reproductive Biology & Endocrinology* [339]
sous le titre :

Expression of genes related to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in murine fetal lungs in late gestation

4.1. Avant-propos

Ce chapitre présente un article qui a été publié dans le journal *Reproductive Biology & Endocrinology* [339]. Voir ci-dessous une brève description des co-auteurs et de leur contribution à cette étude.

Mélissa Côté, M.Sc. : Mlle Côté, alors étudiante en Physiologie-Endocrinologie sous la direction du Dr Yves Tremblay, réalisa les expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie et contribua aux expériences d'explants, à la préparation des cultures cellulaires et à la préparation du manuscrit.

Pierre R Provost, Ph.D. : Le Dr Provost est professeur associé au département d'obstétrique et de gynécologie de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon co-directeur de thèse et s'impliqua au niveau de l'élaboration du plan expérimental et de la rédaction de l'article.

Yves Tremblay, Ph.D. : Le Dr Tremblay est professeur titulaire au département d'obstétrique et de gynécologie de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon directeur de thèse. Ses implications se situèrent au niveau de l'élaboration du plan expérimental, de la révision de l'article et de la supervision globale du projet.

Dans cette étude, j'ai contribué à l'élaboration du plan expérimental, réalisé les expériences de PCR en temps réel et contribué aux expériences d'explants et à la préparation des cultures cellulaires. J'étais de plus responsable de la rédaction du manuscrit et de la préparation des figures et tableaux.

4.2. Résumé en français de l'étude

La maturation pulmonaire est modulée par plusieurs facteurs, dont les glucocorticoïdes. L'expression d'éléments reliés à l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) ainsi qu'un système de régulation analogue à celui de l'axe HPA ont été décrits au niveau de certains tissus périphériques. Dans la présente étude, un groupe de gènes associés à l'axe

HPA ont été étudiés dans le poumon fœtal murin pendant une période gestationnelle qui chevauche la montée de la production de surfactant. L'expression des gènes encodant pour l'hormone de libération de la corticotropine (CRH), les récepteurs de CRH (CRHR) de type 1 et 2 β , la protéine liante de CRH, la proopiomélanocortine (POMC), le récepteur 2 de la mélanocortine (MC2R) et le récepteur des glucocorticoïdes a été quantifiée par PCR en temps réel et localisée par hybridation *in situ* dans des poumons fœtaux aux JG (JG) 15.5, 16.5 et 17.5. L'expression de ces gènes a aussi été quantifiée dans deux types de cultures primaires de cellules pulmonaires enrichies : mésenchymateuses et épithéliales. De plus, la capacité de CRH et de la corticotropine (ACTH) à stimuler l'expression d'enzymes impliqués dans la voie « surrénalienne » de synthèse de glucocorticoïdes a été abordée, de même que la production de glucocorticoïdes par des explants de poumons fœtaux. Nos résultats indiquent que tous les gènes étudiés sont exprimés par les poumons fœtaux et ce, selon différents profils. Au JG 15.5, des pics d'expression du gène *Mc2r* ont été mesurés dans certains échantillons qui montrent une forte co-expression des gènes de la voie de synthèse des glucocorticoïdes, dont *Cyp11b1* qui encode la 11 β -hydroxylase. L'expression de l'ARNm de *Crhr1* a été co-détectée avec celle de *Pomc* dans des cellules entourant l'épithélium proximal aux JG 15.5 et 16.5. Une transition des sites d'expression vers les cellules épithéliales distales a été observée entre les JG 15.5 et 17.5 et ce pour tous les gènes étudiés. Au JG 15.5, l'incubation d'explants pulmonaires fœtaux en présence de CRH ou d'ACTH n'a pas mené à une augmentation de l'expression des gènes associés à la voie de synthèse surrénalienne de glucocorticoïdes. Cependant, l'incubation en présence de CRH augmenta significativement l'expression de *Cyp21a1* (21-hydroxylase) au JG 17.5. De plus, une production de désoxycorticostérone par les explants pulmonaires fœtaux a été détectée. Les modulations temporelles et spatiales de l'expression des gènes associés à l'axe HPA en fin de gestation suggèrent des rôles pour ces gènes dans le développement pulmonaire. Ces résultats pourraient se révéler utiles en relation avec les maladies pulmonaires associées à l'immaturation pulmonaire.

4.3. Expression of genes related to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in murine fetal lungs in late gestation

Marc Simard^{1,2}, Mélissa Côté^{1,2}, Pierre R Provost^{1,2,3} and Yves Tremblay^{1,2,3§}

¹Reproduction, Perinatal Health, and Child Health, CHUQ Research Center, Québec City, Québec, Canada

²Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Laval University, Québec City, Québec, Canada

³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Laval University, Québec City, Québec, Canada

§Corresponding author

Emails:

MS : marc.simard@crchul.ulaval.ca

MC : melissa.cote@crchul.ulaval.ca

PRP : pierre.provost@crchul.ulaval.ca

YT: yves.tremblay@crchul.ulaval.ca

4.4. Abstract

Background: Lung maturation is modulated by several factors, including glucocorticoids. Expression of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis-related components, with proposed or described local regulatory systems analogous to the HPA axis, was reported in peripheral tissues. Here, HPA axis-related genes were studied in the mouse developing lung during a period overlapping the surge of surfactant production.

Methods: Expression of genes encoding for corticotropin-releasing hormone (CRH), CRH receptors (CRHR) 1 and 2beta, CRH-binding protein, proopiomelanocortin (POMC), melanocortin receptor 2 (MC2R), and glucocorticoid receptor was quantified by real-time PCR and localized by in situ hybridization in fetal lungs at gestational days (GD) 15.5, 16.5, and 17.5, and was also quantified in primary mesenchymal- and epithelial cell-enriched cultures. In addition, the capability of CRH and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) to stimulate pulmonary expression of enzymes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis was addressed, as well as the glucocorticoid production by fetal lung explants.

Results: We report that all the studied genes are expressed in fetal lungs according to different patterns. On GD 15.5, Mc2r showed peaks in expression in samples that have previously presented high mRNA levels for glucocorticoid synthesizing enzymes, including 11beta-hydroxylase (Cyp11b1). Crhr1 mRNA co-localized with Pomc mRNA in cells surrounding the proximal epithelium on GD 15.5 and 16.5. A transition in expression sites toward distal epithelial cells was observed between GD 15.5 and 17.5 for all the studied genes. CRH or ACTH stimulation of genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis was not observed in lung explants on GD 15.5, whereas CRH significantly increased expression of 21-hydroxylase (Cyp21a1) on GD 17.5. A deoxycorticosterone production by fetal lung explants was observed.

Conclusions: Temporal and spatial modulations of expression of HPA axis-related genes in late gestation are consistent with roles for these genes in lung development. Our data are likely to lead to valuable insights in relation to lung diseases originating from lung immaturity.

4.5. Background

Corticotropin-releasing hormone (CRH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) are classically involved in the modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, leading to secretion of glucocorticoids by the adrenal glands [224, 242]. CRH also has a role in regulating neuroendocrine functions, reproduction, and immune functions [340]. The proopiomelanocortin (*Pomc*) gene encodes for several peptides with various roles, including ACTH, with highly tissue-specific regulation and processing [227, 341]. During gestation, glucocorticoids of adrenal origin are involved in the maturation of many fetal organ systems, including the lung [247, 342]. Glucocorticoids are administered to pregnant women at risk of premature delivery to accelerate fetal lung maturation and to reduce the occurrence and severity of respiratory distress syndrome (RDS) [246]. Their importance in fetal lung development was highlighted by CRH-null and glucocorticoid receptor (GR)-null mouse models, in which mice display an abnormal lung phenotype and die at birth from respiratory failure [251, 255].

Limited information is available on expression of CRH, ACTH, and other HPA axis-related components in the fetal lung. *Crh* mRNA was localized in fetal mouse lungs around branching bronchioles [343], CRH was detected in baboon fetal lungs [344], and *POMC* mRNA was detected in ovine fetal lungs [345]. A direct effect of CRH was demonstrated on differentiation and proliferation of type II pneumocytes in baboon fetal lung explants [346]. CRH receptor type 1 (CRHR1), which is associated with pituitary ACTH secretion, was detected at the mRNA level in baboon fetal lungs [346]. In addition, the melanocortin 2 receptor (MC2R), which leads to glucocorticoid production in adrenal glands following binding to its only known ligand ACTH [341], was detected in developing mouse lungs [347].

Expression of *Crh* and *Pomc* was shown in several peripheral tissues [341, 348], including thymus [349, 350] and skin [273]. In the latter, CRH/ACTH signaling was reported, leading to local glucocorticoid production. Brain, cardiovascular system, and thymus were also identified as production sites of glucocorticoids involving an adrenal-like enzymatic pathway [268, 269]. However, the implication of CRH and ACTH in these glucocorticoid

productions remains to be defined. Our laboratory previously reported that genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis, namely steroidogenic acute regulatory protein (*Star*), cytochrome P450 side chain cleavage (*Cyp11a1*), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (*Hsd3b1*), 21-hydroxylase (*Cyp21a1*), and 11 β -hydroxylase (*Cyp11b1*), are transiently co-expressed at high levels in the fetal mouse lung on gestational day (GD) 15 [274]. Whether this co-expression is modulated by pituitary ACTH, by an autocrine/paracrine mechanism involving a local HPA axis-like pathway, or by a CRH/ACTH-independent mechanism, remains to be determined.

Based on data showing 1) the expression of HPA axis-related genes in some peripheral tissues, 2) the existence of a functional HPA axis-like pathway leading to glucocorticoid production in the skin, and 3) the transient expression of genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis in the murine fetal lung, we hypothesized that HPA axis-related genes could be developmentally regulated in the murine fetal lung and that CRH and/or ACTH could be involved in the regulation of fetal pulmonary expression of enzymes leading to glucocorticoid production. In order to question their involvement in lung development, HPA axis-related genes were studied in the developing lung where their expression profiles as well as their sites of expression were investigated. For that purpose, *Crh*, *Crhr1*, *Crhr2b*, *Crhbp*, *Pomc*, *Mc2r*, and *Nr3c1* (GR) were studied by QPCR and *in situ* hybridization in male and female fetal mouse lungs on GD 15.5, 16.5, and 17.5. This gestation window overlaps the surge of surfactant production occurring on GD 17.5 [351-353]. Immunoreactive ACTH (iACTH) was also detected by immunohistochemistry. The existence of a male disadvantage in the occurrence of RDS [20], as well as the proposed transient delay for one sex in the expression of genes involved in glucocorticoid synthesis in the developing lung [274], warranted the consideration of sex. Several adult tissues including lung, spleen, thymus, brain, and adrenal gland were included in QPCR experiments for comparison. Messenger RNA levels were also measured in epithelial cell-enriched and fibroblast-enriched primary cultures originating from mouse fetal lungs to further characterize expression profiles of the target genes. In addition, fetal lung explants were incubated in the presence of CRH or ACTH to evaluate the capability of these

hormones to stimulate the expression of *Pomc*, *Star*, *Hsd3b1*, *Cyp21a1*, and *Cyp11b1*, and the glucocorticoid production by fetal lung explants was addressed.

4.6. Methods

4.6.1. Animals, housing, and fetal tissue preparation

Protocol was approved by the Animal Care and Use Committee and the Institutional Review Board of the CHUQ Research Ctr (protocol no. 2008-071). BALB/c mice (*Mus musculus*) aged 63-70 days and certified pathogen-free were purchased (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) and housed in a room maintained at 22 °C, 50 % relative humidity and on a 12-hours cycle (07:15-19:15 hours) of fluorescent lighting (300 Lux). Global 18% Protein Rodent Diet (Teklad, Montréal, QC, Canada) and tap water were provided *ad libitum*. New animals were acclimatized to these conditions for 7-14 days prior to be mated. Fetuses were obtained from overnight periods of mating. The day of vaginal plug was considered as GD 0.5. Pregnant females were sacrificed by exposure to a CO₂ atmosphere. Fetal sex was visually established and confirmed in some cases by PCR amplification of *Sry* as previously described [354]. Lungs were rinsed thoroughly in phosphate buffered saline (PBS) and snap-frozen before storage at -80 °C, or put in 4% w/v paraformaldehyde for 48 hours and then paraffin-embedded. Slices of 5 µm were prepared for *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments. A minimum of three litters, including females and males, were studied on GD 15.5, 16.5, and 17.5.

4.6.2. RNA probes

RNA probe templates were prepared from mouse lung and brain cDNAs, as previously described [355]. Briefly, a specific fragment of each studied gene was amplified and inserted into pGEM-4Z (Promega Corp., Madison, WI, USA). Specific primer pairs used for PCR amplifications are presented in Table 8. Antisense and sense RNA probes were synthesized using DIG-UTP substrate (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) from PCR products amplified with specific primers for SP6 and T7 promoters:

GGATTTAGGTGACACTATAGAATA and TAATACGACTCACTATAGGGAGAC, respectively.

4.6.3. In situ hybridization and immunohistochemistry

In situ hybridization was performed as previously described [355]. Hybridization with specific RNA probes (5 ng/ul) was performed overnight at 42 °C. Tissue sections were incubated in substrate solution [355] three hours for *Crh*, *Pomc*, and *Nr3c1* or overnight for *Crhr1*, *Crhr2b*, *Crhbp*, and *Mc2r*. Immunohistochemistry was performed as previously described [355]. The anti-immunoreactive ACTH (iACTH) antibody (rabbit anti-mouse; kindly provided by Dr Georges Pelletier, CHUQ Research Ctr, [356]) and a rabbit IgG preparation (Vector Laboratories Inc, Burlington, ON, Canada) were incubated overnight at 4 °C. Microscopy was performed with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) equipped with Zeiss Plan-Neofluar objectives. Images were acquired with a QImaging Retiga 2000R camera (QImaging, Surrey, BC, Canada) using the Image-Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD, USA).

4.6.4. Quantitative real-time PCR and normalization with multiple housekeeping genes

RNA extraction and cDNA synthesis [141], and quantitative real-time PCR [326], were performed as described previously. The analyzed genes and quantitative real-time PCR conditions are presented in Table 8, except for *Star*, *Hsd3b1*, and *Cyp11b1* [274]. After enzyme activation (10 min, 95 °C), PCR cycles were performed: 5 sec, denaturation 95 °C; 5 sec, annealing (see Table 8 for temperature); 20 sec, elongation 72 °C; 5 sec, temperature of fluorescence intensity reading (see Table 8). Expression stability of three housekeeping genes (*Gapdh*, *Hprt1*, *Sdha*) was assessed based on the approach proposed by Vandesompele et al [333]. Then, normalization factors were calculated from expression levels of the three housekeeping genes.

4.6.5. Preparation of fibroblast- and epithelial cell-enriched cultures from fetal mouse lungs

Fetal lungs were removed, rinsed in PBS, cut into pieces of approximately 2 mm³, and extensively rinsed again in PBS. Digestion was made in Hank's buffered saline solution (HBSS) (Multicell, Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) containing 0.25% w/v trypsin (Multicell), 0.17% w/v collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA), DNase I (25 µg/ml) (Sigma), penicillin (50 iu)/streptomycin (50 µg/ml) (Multicell), and gentamycin (5 µg/ml) (Sigma) at 37 °C for 30 minutes under agitation. Digestion was stopped by addition of Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Multicell) containing 20% v/v fetal bovine serum (FBS) (Sigma). Residual tissue debris were discarded by 1 x g sedimentation and then, supernatants were centrifuged 7 min at 100 x g. Cell pellets were resuspended in DMEM containing 20% v/v FBS and penicillin (50 iu)/streptomycin (50 µg/ml). Cells were incubated for one hour at 37 °C with 5% CO₂ to allow fibroblast adhesion. Then, culture media were removed and the fibroblast adhesion step was repeated twice. The epithelial cell-enriched fractions (non-adherent cells) were collected and filtered through a sterile 45 µm cell strainer (VWR International, Montréal, QC, Canada), centrifuged 7 min at 100 x g and then plated in 12-well plates. Cell cultures were kept 12 hours at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. Cell phenotypes were visually confirmed before harvesting. Epithelial cell-enriched cultures were then homogenized in TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) for RNA extraction. Fibroblast-enriched cultures were filtered through a sterile 45 µm cell strainer before RNA extraction. Three separate cell enrichment experiments with 2-3 litters each were done at GD15.5 (total n=44 fetal lungs) and four were done at GD17.5 (total n=42 fetal lungs). Given the low number of epithelial cells recovered at GD15.5, RNA extracts were pooled before cDNA preparation. At GD17.5, enough epithelial cells for cDNA synthesis were recovered in 2 out of 4 experiments.

4.6.6. Incubation of lung explants with CRH or ACTH

GD 15.5 and 17.5 fetal lungs were removed, rinsed in PBS, and incubated 8 h in DMEM containing penicillin (50 iu)/streptomycin (50 µg/ml) and 10⁻⁷ M CRH (C3042, Sigma) or 10⁻⁷ M ACTH (Cortrosyn, Amphastar Pharmaceuticals Inc., Rancho Cucamonga, CA,

USA) at 37 °C under gentle agitation. Three and four litters were analyzed at GD 15.5 and 17.5, respectively, with 1 to 3 fetal lungs per condition (control, CRH, and ACTH) for each litter. Explants were then homogenized in TRI reagent and stored at -80 °C until RNA extraction.

4.6.7. Steroidogenic activity measures

Deoxycorticosterone (DOC) production was measured in control and CRH-treated-GD17.5 lung explants. Five litters were used, with 2-3 fetal lungs per litter per condition. The explants were incubated in 1 mL of DMEM containing pen/strep a first 3h with 2×10^{-7} M CRH or without, then 5h with 2×10^{-7} M CRH or without in the presence of [1,2,6,7- $^3\text{H}(\text{N})$]progesterone at 58 nM (6 $\mu\text{Ci/well}$) (Perkin Elmer, Boston, MA) and unlabeled DOC (Steraloids, Wilton, NH) at 10^{-5} M. Unlabeled DOC was added to reduce metabolization of tritiated DOC. Steroids were extracted from culture media with chlorobutane, and resolved by thin layer chromatography (toluene 78: acetone 20: methanol 2). Tritiated standards of progesterone, DOC, and corticosterone were included. Revelation of the tritiated products and quantification were performed using a Storm apparatus (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). Data are expressed as deoxycorticosterone radioactivity count/total radioactivity count/mg tissue.

4.6.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-way ANOVA with randomized-block design was used for QPCR experiments on total fetal lung extracts, where male and female values were matched. One-way ANOVA with randomized-block design followed by a Tukey's test was used for experiments with lung explants incubated with CRH or ACTH, where samples from the same litter were matched. Paired t-test was used to analyze data of deoxycorticosterone quantification, where mean control samples and mean treated samples from each litter were paired. When normality of data could not be assumed following a normality test in GraphPad Prism, logN transformation was performed. A difference with a *P* value of less than 0.05 was considered as significant.

4.7. Results

4.7.1. Expression levels of HPA axis-related genes in male and female fetal mouse lungs

The gene expression profiles of *Crh*, *Crhbp*, *Crhr1*, *Crhr2b*, *Pomc*, *Mc2r*, and *Nr3c1* were determined in male and female fetal lung pools from several mouse litters collected on GD 15.5, 16.5, and 17.5 (Figure 12). Several mature tissues were included for reference. To give estimates of raw mRNA levels in fetal lungs, mean crossing point values are presented in Table 9.

Crh mRNA levels were higher in fetal lung samples than in other tissues, including total brain (Figure 12A). In addition, a trend in increase in *Crh* mRNA levels was observed according to gestation time ($p=0.053$). For *Crhbp* mRNA levels (Figure 12B), a significant interaction between time and sex ($p=0.019$), as well as a significant impact of sex ($p=0.017$), were observed. Moreover, expression levels tend to decrease according to gestational age. A high *Crhbp* mRNA level was detected in brain, which is recognized as the major expression site of this gene [357]. Very low levels of *Crhr1* mRNA were observed in several fetal lung samples (Figure 12C; Table 9), while no expression was detected in the others. For comparison, brain and spleen expressed *Crhr1* mRNA at relatively high levels, and no expression was detected in adult lung and adrenal gland. *Crhr2b* expression in fetal lung samples showed more interindividual variability than the other considered genes (Figure 12D), but no significant effect of time or sex was observed. A higher mRNA level was detected in adult lung than in the other control tissues. *Pomc* mRNA levels were similar between fetal lungs and adult tissues, except for adrenal gland in which expression level was very low (Figure 12E). *Mc2r* mRNA was detected in fetal lungs and was found to be expressed at much higher levels in two GD 15.5 samples (one female pool and one male pool) (Figure 12F). These two samples were previously shown to express high levels of genes involved in the adrenal glucocorticoid synthesis pathway (samples 70F and 71M in [274]). As expected, the expression level of *Mc2r* in adrenal gland was very high. No significant effect of time or sex was observed for *Pomc* and *Mc2r*. Gene expression of melanocortin receptor associated protein (MRAP), which is important

in MC2R signaling [358], was also detected in fetal lung samples (Table 9 and data not shown). High *Nr3c1* mRNA levels were detected in fetal lungs (Table 9) and a significant increase in expression was observed over time (about 2-fold between GD 15.5 and 17.5, $p=0.0003$) (Figure 12G). Among the analyzed mature tissues, the highest *Nr3c1* expression level was observed in the lung.

4.7.2. Expression sites of HPA axis-related genes in male and female fetal mouse lungs

In situ hybridization was performed on male and female fetal mouse lungs from GD 15.5, 16.5, and 17.5 to localize expression sites of *Crh*, *Crhbp*, *Crhr1*, *Crhr2b*, *Pomc*, *Mc2r*, and *Nr3c1* (Figures 13, 14, and data not shown). In addition, iACTH was detected by immunohistochemistry (Figure 13).

Crhr1 and *Pomc* mRNAs were localized on GD 15.5 and 16.5 in cells surrounding epithelial cells of conducting zones (Figure 13A-C, F-H), whereas iACTH protein was detected in epithelial cells (Figure 13K-M). On GD 17.5, *Pomc* and iACTH signals were strong in epithelial cells of distal zones (Figure 13I and N). Adult pituitary gland was used as positive control and, as expected, *Crhr1*, *Pomc*, and iACTH were localized in intermediate and anterior lobes (Figure 13E, J, and O) [359].

For *Crh*, *Crhbp*, *Crhr2b*, *Mc2r*, and *Nr3c1* mRNAs, positive signals were widely distributed on GD 15.5 (Figure 14A, C, E, G, and I) and 16.5 (data not shown). However, no signal was observed in epithelial cells of conducting zones, except for a few cells. For these five genes, as for *Crhr1* and *Pomc*, an important change in expression sites is observed when tissues originating from GD 15.5-16.5 and GD 17.5 are compared, the distal epithelium being the major site of expression on GD 17.5 (Figure 14B, D, F, H, and J). *Nr3c1* mRNA was also detected in mesenchymal cells, although at lower levels than in epithelial cells. For every gene studied, no sex difference was observed in mRNA expression sites.

4.7.3. Expression levels of HPA axis-related genes in primary cell cultures derived from fetal mouse lungs

Next, we determined whether the transition in gene expression sites from GD 15.5 to 17.5 can be observed in cell cultures. Levels of *Crh*, *Crhbp*, *Crhr1*, *Crhr2b*, *Pomc*, *Mc2r*, and *Nr3c1* mRNAs were compared between fibroblast-enriched cell cultures, epithelial cell-enriched cell cultures, and total lungs. Fetal sex was not considered in these experiments because only *Crhbp* showed a sex difference in expression by QPCR in whole lungs, whereas no sex difference was observed for any of these genes by *in situ* hybridization. Messenger RNA levels of *Krt18* and *Vim*, which are epithelial and mesenchymal markers, respectively, confirmed cell enrichments (Figure 15C). For each analyzed gene, ratios corresponding to mRNA levels in epithelial cell-enriched cultures over those in fibroblast-enriched cultures are presented in Figure 15D. Interestingly, *Crh* mRNA was not or barely detected in cell cultures. On GD 15.5 and 17.5, *Crhr1* mRNA was detected in mesenchymal cells, whereas the transcript was not or barely detected in epithelial cells. On GD 15.5, *Crhr2b* expression level was higher in mesenchymal cells than in epithelial cells, while on GD 17.5 the opposite situation was observed. *Crhr2b* mRNA was not detected in all samples. *Crhr1* and *Crhr2b* mRNA levels were lower in cell cultures than in whole fetal lungs, similarly to *Crh* (data not shown). The expression of *Crhbp* was higher in epithelial cells than in fibroblasts on GD 15.5 and 17.5, while *Pomc*, *Mc2r*, and *Nr3c1* are preferentially expressed in fibroblasts on GD 15.5 and in epithelial cells on GD 17.5 (Figure 15D). Expression levels of these last four genes were similar between cell cultures and total lung pools (data not shown).

4.7.4. Expression of Cyp21a1 and Cyp11b1 in fetal mouse lungs and fetal lung primary cell cultures

Cyp21a1 and *Cyp11b1* encode the last two steroidogenic enzymes involved in *de novo* corticosterone synthesis [360, 361]. *Cyp11b1* expression was previously observed on GD 15.5, but not on GD 16.5, 17.5, and 18.5 in the fetal lung [274]. There was no available data on expression of *Cyp21a1* after GD 15.5. We detected *Cyp21a1* mRNA in fetal lung pools and in lung explants obtained on GD 17.5 (data not shown). Interestingly, *Cyp21a1*

mRNA was detected at much higher levels in primary cell cultures than in non-incubated whole lung samples and lung explants. Indeed, *Cyp21a1* mRNA levels were ~15 and ~40 fold higher in fibroblast- and in epithelial cell-enriched cultures, respectively, than in lung explants (data not shown), and were higher in epithelial fractions than in fibroblast fractions on both GD 15.5 and 17.5 (Figure 15D). In agreement with previous data, *Cyp11b1* mRNA was not detected in lung explants obtained on GD 17.5 in the present study. However, *Cyp11b1* mRNA was surprisingly detected at relatively high levels in cell cultures, as *Cyp21a1*.

The potential effect of reciprocal exposure of epithelial- and mesenchymal-enriched cell cultures to their respective secreted factors on gene expression of *Crh*, *Crhr1*, *Crhr2 β* , *Cyp21a1*, and *Cyp11b1* was addressed. Target gene mRNA levels were quantified in epithelial- and mesenchymal-enriched cells after co-culture using porous filters (0.1 μ m) during 96 h (n=16 fetal lungs from 3 litters). *Crhr2 β* mRNA level was 4-fold higher in co-cultured fibroblasts than in fibroblasts cultured alone. For the other analyzed genes, results obtained from co-cultured cells were similar to those from separated cells (data not shown).

4.7.5. Incubation of fetal mouse lung explants in the presence of CRH or ACTH, and determination of glucocorticoid formation

GD 15.5 and 17.5 lung explants were incubated in the presence of CRH or ACTH to evaluate the potential modulatory roles of these hormones on mRNA levels of *Pomc*, *Star*, *Hsd3b1*, *Cyp21a1*, and *Cyp11b1*. The fetal sex was not considered for the reasons exposed above. No effect of CRH or ACTH was observed on GD 15.5 on the expression level of any of the studied genes (data not shown). On GD 17.5, a significant stimulatory effect of CRH (n=4, ANOVA, p=0.0307; Tukey's test Ctl vs CRH, p<0.05) was observed on *Cyp21a1* mRNA levels (Figure 16). No significant effect was observed on *Pomc*, *Star*, and *Hsd3b1* expression. To determine whether the CRH-induced increase in *Cyp21a1* expression leads to increased enzymatic activity, we measured the level of newly-formed tritiated deoxycorticosterone in control and CRH-treated fetal lung explants isolated on GD17.5 using tritiated progesterone as substrate. Unlabeled deoxycorticosterone was added

to reduce metabolism of newly-formed tritiated deoxycorticosterone. Accumulation of tritiated deoxycorticosterone was detected in all samples, and a non-statistically significant 25% increase of deoxycorticosterone production was observed in CRH-treated samples compared to controls (paired t-test, $p=0.36$) (data not shown). No corticosterone accumulation was detected.

4.8. Discussion

We report expression of HPA axis-related genes in the fetal lung during late gestation, a period that includes the surge of surfactant synthesis occurring on GD 17 in the mouse. More precisely, we present expression profiles of *Crh*, *Crhr1*, *Crhr2b*, *Crhbp*, *Pomc*, *Mc2r*, and *Nr3c1* and we also report marked co-expression of *Mc2r* with genes encoding for glucocorticoid synthesizing enzymes from cholesterol on GD 15.5. We show that *Crhr1* and *Pomc* mRNAs are localized in cells surrounding proximal epithelia where iACTH is detected on GD 15.5 and 16.5, and that a major switch in expression sites toward epithelial cells of distal zones occurred between GD 15.5 and 17.5 for all the studied genes. In addition, a significant CRH-modulated increase in *Cyp21a1* expression was observed in fetal lung explants isolated on GD 17.5 as well as a deoxycorticosterone production by fetal lung explants. Even though our data do not suggest a functional HPA axis regulating the previously reported pathway of glucocorticoid synthesis on GD 15, they support roles for HPA axis-related components, as well as autocrine/paracrine actions of CRH and ACTH, in developing lungs.

In several species, a local metabolism of glucocorticoids through the action of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases (11 β HSDs) was shown in the developing lung where it leads to a net increased formation of active glucocorticoids by the predominant 11 β HSD type 1 activity [265, 337, 362-364]. It was also reported that the fetal mouse lung expresses all the genes involved in glucocorticoid synthesis from cholesterol [274]. High expression of the latter genes was observed in several litters on GD 15 but only in male or female lung pools according to the analyzed litter, and this occurred before an important rise in *Hsd11b1* expression [274]. Interestingly, in the present study, *Mc2r* was highly expressed in the same pools where the genes involved in glucocorticoid synthesis from cholesterol

showed high expression levels, thus suggesting a role for *Mc2r* in the control of the “adrenal” pathway of glucocorticoid synthesis in the fetal lung. Accordingly, expression of *Mrap* was detected in fetal lung samples, the expression of this gene being necessary for MC2R signaling [358]. We localized a weak *Mc2r* mRNA signal in distal epithelial cells and in the mesenchyme on GD 15.5, while staining in epithelial cells was more intense on GD 17.5. MC2R was previously detected by immunohistochemistry in fetal mouse lungs from GD 11.5 to 14.5 in the bronchial epithelium and in the mesenchyme [347]. Taken together, these observations suggest that the site of *Mc2r* expression varies according to gestational time. Expression of *Mc2r* has been shown to be regulated temporally in the fetal testis [365], as in the fetal lung.

In the present study, incubation of lung explants isolated on GD 15.5 with CRH or ACTH did not up-regulate the genes involved in the “adrenal” pathway of glucocorticoid synthesis. A postulated narrow window of CRH and/or ACTH receptivity may explain the absence of stimulation. Indeed, the fast progression of tissue development observed in the mouse where gestation is completed after only 19 days adds to the difficulty to characterize transitory events occurring within a very narrow developmental time window. Alternatively, it is not excluded that the previously reported transient co-expression of the five genes of the “adrenal” pathway may not be dependant on the presence of CRH and/or ACTH. Nevertheless, a significant increase in *Cyp21a1* mRNA expression was observed in lung explants isolated on GD 17.5 following incubation with CRH, along with a 25% increased deoxycorticosterone production ($p=0.36$). The high expression levels previously observed on GD 15 for the genes of the cascade were not reached in both control and stimulated lung explants in the present study, suggesting that the absent or modest activation of expression reported here for these genes is not a consequence of a saturated system caused by endogenous CRH and ACTH production.

After GD 15.5, 21-hydroxylase may not be involved in corticosterone synthesis since *Cyp11b1* mRNA is neither expressed in intact tissue [274] nor stimulated following CRH or ACTH incubations in lung explants (Figure 16). A common observation to both adult mouse lung [269] and fetal lung after GD 15.5 is that expression of *Cyp11a1* and *Cyp21a1*,

but not that of *Cyp11b1*, occur. Interestingly, the immediate corticosterone precursor, deoxycorticosterone, produced from progesterone by 21-hydroxylase, was shown to have a low glucocorticoid effect [239, 366]. In the present study, steroidogenic activity experiments showed deoxycorticosterone production by fetal lungs through 21-hydroxylase activity, as also reported in [367]. In addition, based on the reported affinity of deoxycorticosterone for the mineralocorticoid receptor [368] and on the very low aldosterone synthase mRNA level in fetal lungs ([274] and data not shown), one would suggest that this steroid could have also mineralocorticoid effects in the lung.

Incubation of GD 17.5 lung explants in the presence of ACTH led to a non-significant 1.5-fold increase in *Cyp21a1* expression, and the stimulatory effect of CRH on *Cyp21a1* did not involve an increase in *Pomc* mRNA expression. Therefore, if CRH acted through ACTH, it would rather be at another regulatory level, such as prohormone processing or hormone release. A similar slight but not statistically significant effect of ACTH was observed on the capability of thymic epithelial cells to stimulate a glucocorticoid-regulated reporter system [269]. Further studies are needed to clarify whether a local HPA axis-like regulatory pathway is functional in the fetal lung as it is the case in the adult skin, where glucocorticoid production has been shown to be regulated by a local cascade of CRH and ACTH production and signaling [273].

In epithelial- and mesenchymal-enriched primary cell cultures, *Crh*, *Crhr1*, and *Crhr2b* were not or barely detected whereas *Cyp11b1* and *Cyp21a1* were detected at relatively high levels. A different situation was observed in total lungs for these five genes. Such noticeable differences in expression levels between primary cell cultures and total lungs were not observed for the other studied genes. These discrepancies should not arise from cell enrichment but rather from dysregulation of regulatory pathways that are active in the whole tissue because: *Crh* expression was undetectable in both epithelial-enriched and mesenchymal-enriched cell cultures but was clearly detected in vivo by in situ hybridization in cell types that are represented in cell cultures, and; mRNA levels of *Cyp11b1* were elevated in both epithelial-enriched and mesenchymal-enriched cell cultures in contrast to whole lungs where only barely detectable levels were detected. Accordingly,

cell-cell communication between mesenchymal and epithelial cells was reported in the developing lung [336], and may be involved in the *in vivo* regulation of the above-mentioned genes. Results from our co-culture experiments suggest that such a potential regulation is not explained alone by secreted factors from epithelial and mesenchymal cells. A similar situation was also observed in the lung where glucocorticoids had differential effects on the expression of *Nr3c1* in fetal lung primary cell cultures compared to whole fetal lung tissues in the rat [369].

Our data suggest paracrine and/or autocrine regulation and action of CRH and POMC-related peptide(s) in the developing lung. However, an effect of circulating ligands on specific CRH and ACTH receptors expressed in the lung is not excluded. Noteworthy, changes in expression sites of the studied receptors also suggest different functions according to the developmental status of the tissue.

Crh mRNA was detected at higher levels in fetal lung samples than in control tissues, including the adult lung, which is consistent with a specific role for CRH in lung development (Figure 12). Accordingly, detection of *Crh* mRNA by *in situ* hybridization was reported on GD 12.5 in the mouse lung around branching bronchioles with an increase until GD 15.5, followed by a constant expression level until GD 17.5, while no signal was detected on GD 18.5 and postnatal day 1 [343]. However, the change in *Crh* expression sites that we present here was not reported in that study. Interestingly, in a previous microarray analysis in mouse fetal lungs, *Crh* expression was significantly higher in lungs from males exposed to the anti-androgen flutamide compared to control males (~50% increase, $p < 0.05$), suggesting an inhibitory effect of endogenous androgens on *Crh* expression [354]. We observed by QPCR that *Crh* mRNA levels tended to increase between GD 15.5 and 17.5, while levels of *Crhbp* tended to decrease. This is suggestive of an increased CRH bioactivity considering the inhibitory action of CRHBP on CRH signaling [357]. *Crhbp* was the only gene showing a significant sex difference in expression in the present study. Interestingly, a sex dimorphism in *Crhbp* expression was reported in the mouse pituitary gland [370]. *Crhr1* mRNA was detected at very low levels in fetal lungs. However, the fact that its expression is limited to a low proportion of cells

may explain the low mRNA levels measured from total lung extracts. Similarly to our *Crhr1* expression data, an important interindividual variability in *CRHR1* mRNA levels was observed in developing fetal baboon lungs, with detection in about 30% of samples on GD 125 (term ~180 days) [346].

Interestingly, *Crhr1* and *Pomc* mRNAs are co-localized on GD 15.5 and 16.5 in cells surrounding the proximal epithelium. In contrast, this staining pattern was not observed on GD 17.5. These results suggest that CRHR1 signaling could lead to ACTH production in a developmental time-specific manner. However, the question whether MC2R ligand is produced in the lung or is imported from the circulation still remains. The detection of immunoreactive ACTH in cells adjacent to those expressing *Pomc* mRNA (GD 15.5-16.5) and in *Pomc* mRNA-positive cells (GD 17.5) suggests a paracrine/autocrine action of ACTH. Gene expression of several prohormone convertases [371], namely FURIN, endoprotease PACE4, proprotein convertase subtilisin/kexin (PCSK) type 5, and PCSK7 were detected in the developing mouse lung at GD 17.0 and 18.0 by DNA microarrays [354]. *Pc1/3*, which encodes the prohormone convertase 1/3 that is associated to ACTH production in the pituitary, was not detected in this gene profiling experiment. However, FURIN and PACE4 have been shown to yield ACTH from POMC [372].

This report shows a transition in expression sites between GD 15.5 and 17.5 for all the studied genes (Figures 13 and 14). These developmental time-specific expression profiles are partly supported by QPCR data obtained from mesenchymal- and epithelial-enriched primary cell cultures (Figure 15). On GD 17.5, expression of every gene was mainly localized in the distal epithelium. This pattern of expression is interesting in the context of lung maturation since the surge of surfactant production occurs on GD 17 in some epithelial cells of this epithelium. Thus, a role for CRH/ACTH in maturation and/or development of the distal epithelium is envisaged.

4.9. Conclusions

Temporal and spatial expression patterns of HPA axis-related genes in fetal lungs during late gestation suggest local roles for CRH and POMC/ACTH in lung development. Our data are likely to lead to valuable insights in relation to lung diseases originating from lung immaturity.

4.10. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

4.11. Authors' contributions

MS participated in the design of the study, carried out QPCR experiments, participated in tissue collection, in cell culture preparation, and in experiments involving fetal lung explants, and drafted the manuscript; MC carried out ISH experiments, participated in tissue collection, in cell culture preparation and in experiments involving fetal lung explants, and helped to draft the manuscript; PRP participated in tissue collection, in the design of the study, and helped to draft the manuscript; YT participated in the design of the study and in its coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

4.12. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Tommy Seaborn and Eric Boucher for critical reading of the manuscript. We also thank Dr Denis Nadeau for helpful advices on cell culture preparation. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant numbers IC87816 and IC90831 to YT).

4.13. Figure legends

Figure 12: Relative mRNA expression levels of HPA axis-related genes in mouse fetal lungs

Crh (A), *Crhbp* (B), *Crhr1* (C), *Crhr2b* (D), *Pomc* (E), *Mc2r* (F), and *Nr3c1* (G) were quantified by QPCR in male and female total fetal lung extracts from several litters on GD 15.5, 16.5, and 17.5. For each litter, the black bar represents the male pool and the white bar represents the female pool. Dashed bars represent adult tissues. Number of animals in each litter (litter #: number of males (M), number of females (F)): #1: 2M, 2F; #2: 4M, 5F; #3: 4M, 3F; #4: 2M, 3F; #5: 3M, 6F; #6: 4M, 3F; #7: 1M, 2F; #8: 4M, 4F; #9: 3M, 4F; #10: 3M, 1F. Each value (\pm SD) was normalized using a factor generated from expression values of three housekeeping genes, namely *Hprt1*, *Sdha*, and *Gapdh*. ANOVA was performed to evaluate the effect of time and sex. A trend in increase in *Crh* mRNA levels was observed according to gestation time ($p=0.053$) (A), a significant interaction between time and sex ($p=0.019$), as well as a significant impact of sex ($p=0.017$), were observed for *Crhbp* mRNA levels (B), and a significant increase in *Nr3c1* mRNA levels was observed over time ($p=0.0003$) (G).

Figure 13: Distribution of *Crhr1* mRNA, *Pomc* mRNA, and immunoreactive (i) ACTH protein in mouse fetal lungs

Tissue sections are from GD 15.5 (A, B, F, G, K and L), 16.5 (C, H and M) or 17.5 (D, I and N). Adult mouse pituitary sections are used as positive control (E, J and O). *In situ* hybridization was performed using anti-sense probes (A to J, positive signal is blue), while immunohistochemistry was performed using an anti-iACTH polyclonal antibody (K to O, positive signal is red). No staining was observed using corresponding sense probes (negative controls, data not shown). On GD 15.5, expression of *Crhr1* (A and B) and *Pomc* (F and G) was observed in cells surrounding airways and a change in expression sites toward distal epithelial cells was observed according to developmental time. On GD 15.5 (K and L), 16.5 (M), and 17.5 (N), iACTH was detected in epithelial cells. Scale bars, 100 μ m (A, E, F, J, K and O) or 50 μ m (B to D, G to I and L to N). **AL**, anterior lobe; **CZ**, conducting zone; **E**, epithelial cells; **EC**, endothelial cells; **IL**, intermediary lobe; **M**, mesenchyme; **PL**, posterior lobe; **RZ**, respiratory zone; **SM**, smooth muscle.

Figure 14: Distribution of *Crh*, *Crhbp*, *Crhr2b*, *Mc2r*, and *Nr3c1* mRNAs in mouse fetal lungs

Mouse tissue sections are from GD 15.5 (A, C, E, G and I) or 17.5 (B, D, F, H and J). *In situ* hybridization was performed using anti-sense probes (A to J, positive signal is blue). No staining was observed using corresponding sense probes (negative controls, data not shown). Results obtained on GD 16.5 (data not shown) are similar to those obtained on GD 15.5 for all the genes. A change in expression sites between GD 15.5-16.5 *versus* 17.5 was observed. Expression of mRNAs encoding for all the analyzed genes was observed in epithelial cells of distal zones on GD 17.5. Scale bars, 50 μ m (A to J). **CZ**, conducting zone; **E**, epithelial cells; **EC**, endothelial cell; **M**, mesenchyme; **RZ**, respiratory zone; **SM**, smooth muscle.

Figure 15: Relative mRNA expression levels of HPA axis-related genes in differential cell cultures derived from fetal mouse lungs

Crh, *Crhbp*, *Crhr1*, *Crhr2b*, *Pomc*, *Mc2r*, *Cyp21a1*, *Cyp11b1*, and *Nr3c1* were quantified by QPCR in fibroblast-enriched and in epithelial cell-enriched primary cultures originating from GD 15.5 and 17.5 fetal mouse lungs. Representative cultures of mesenchymal cells (A) and epithelial cells (B) are presented. Expression ratios of *Krt18* (cytokeratin 18; epithelial cell marker) on *Vim* (vimentin; mesenchymal cell marker) were assessed to confirm cell enrichment (C). For each studied gene, ratios of expression levels in epithelial cells over expression levels in mesenchymal cells are presented (D). Genes for which all or some of the samples were negative are presented in the inset. Values that are over the dashed line represent higher expression level in epithelial cell-enriched cultures. **ND**, not detected; **E**, epithelial cell-enriched cultures; **F**, fibroblast-enriched cultures.

Figure 16: Effects of exogenous CRH or ACTH on expression levels of *Pomc*, *Star*, *Hsd3b1*, and *Cyp21a1* in mouse fetal lung explants

Fetal lungs were harvested on GD 17.5 and incubated 8h in the presence of 10^{-7} M CRH or 10^{-7} M ACTH. Messenger RNA levels of *Pomc*, *Star*, *Hsd3b1*, and *Cyp21a1* were measured by QPCR in control and treated lungs. Data are presented as ratios of treated samples over control samples \pm SEM. Experiments were performed with 1 to 3 fetal lungs

per condition per litter (n=4 litters), and statistical analysis was performed using one-way ANOVA with randomized-block design (samples within each litter were matched). *, $P < 0.05$

Figure 13

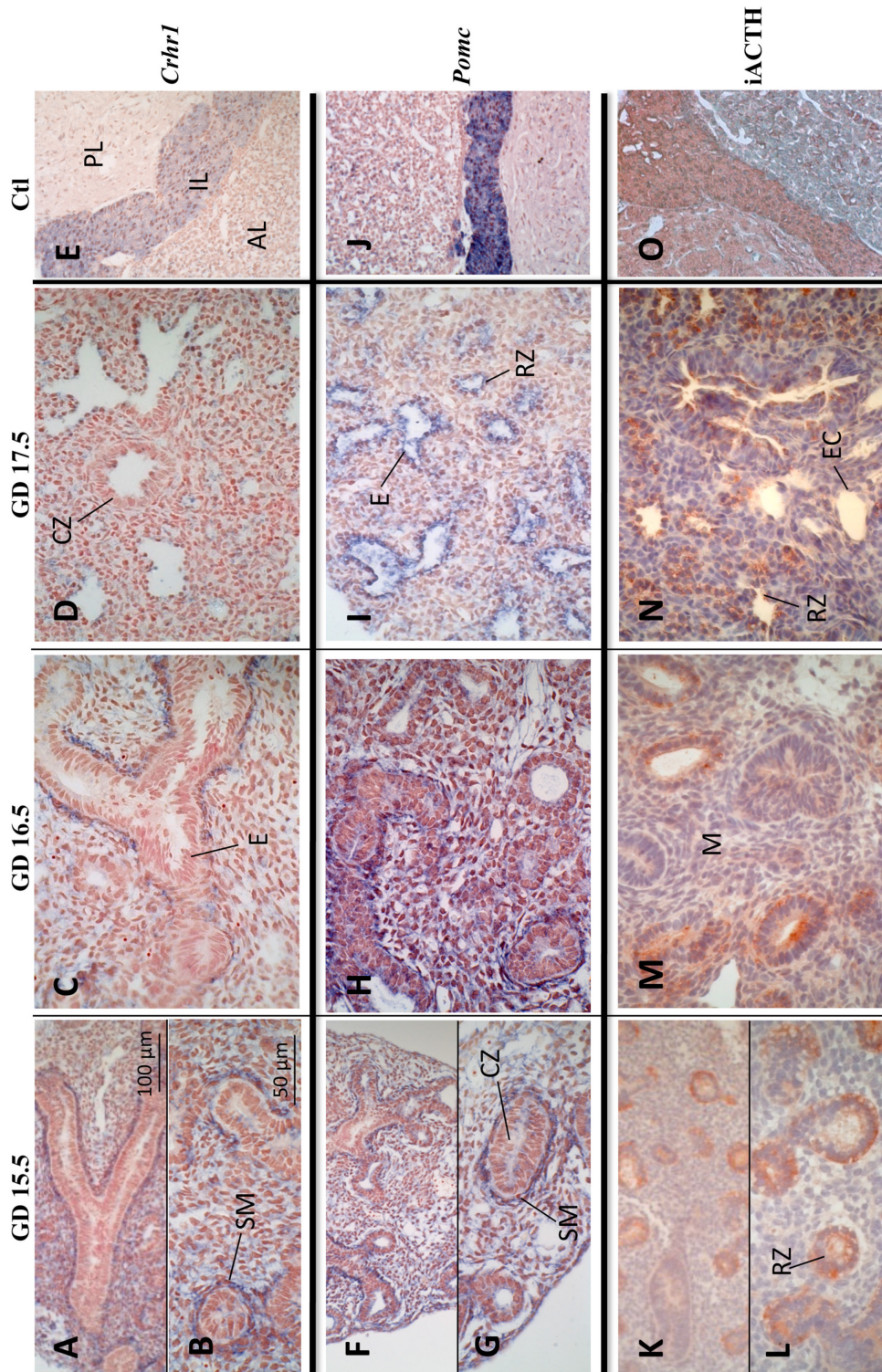


Figure 14

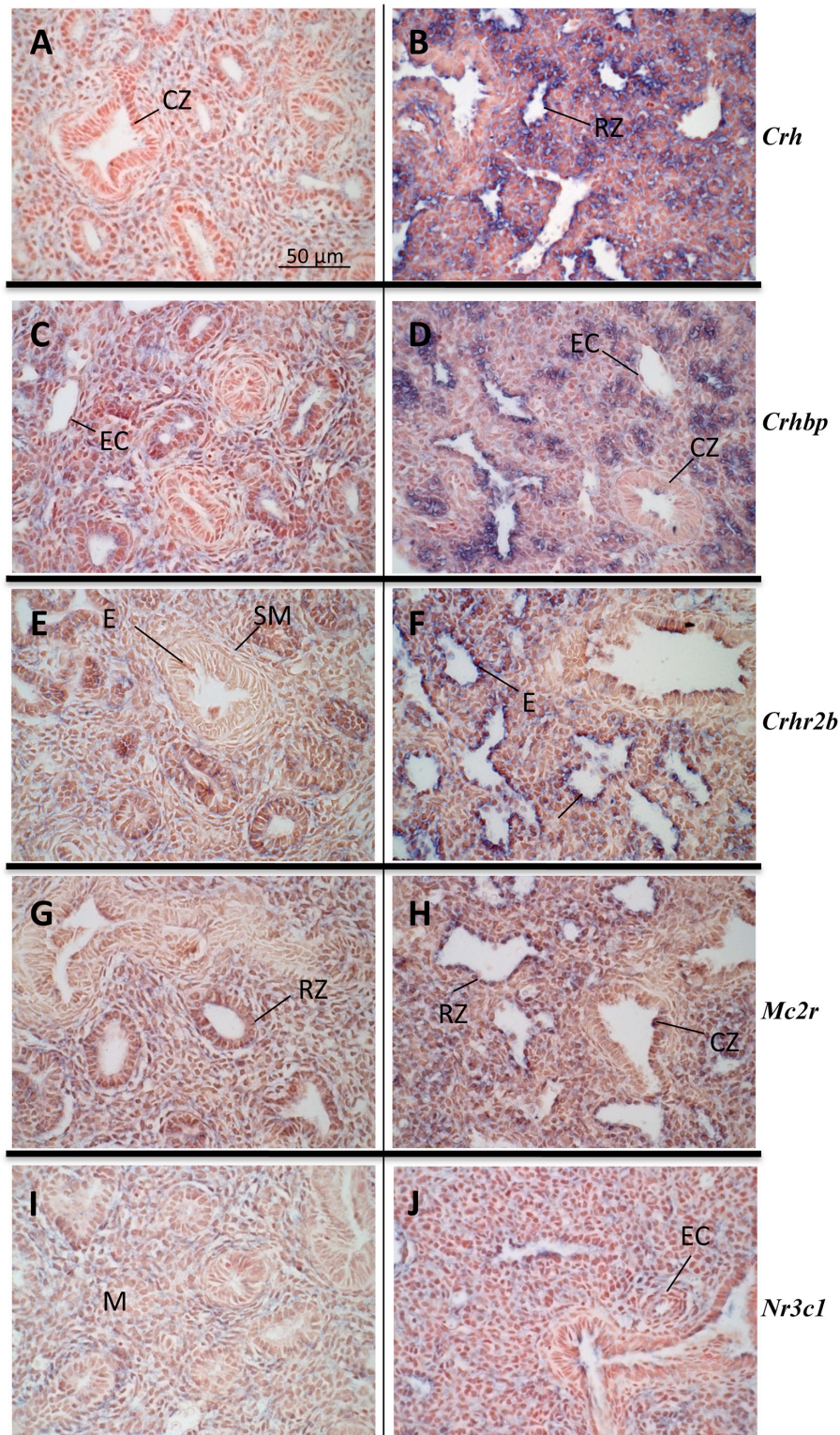


Figure 15

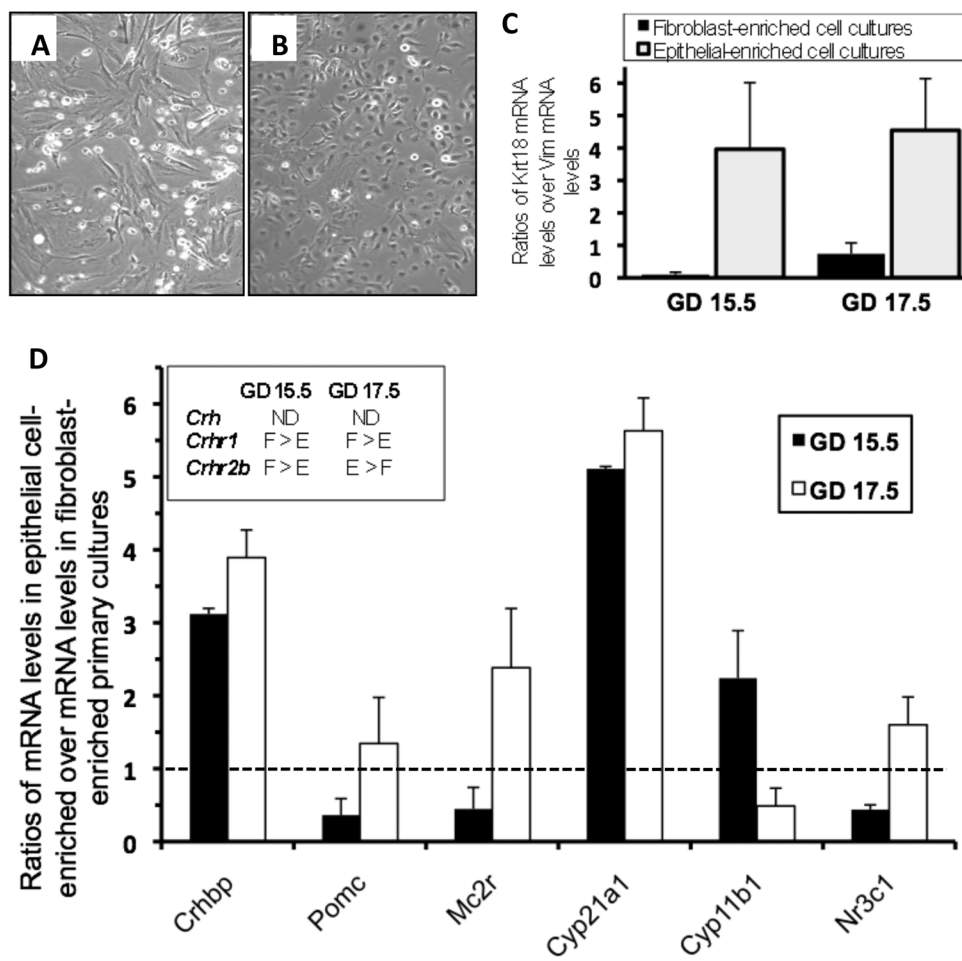
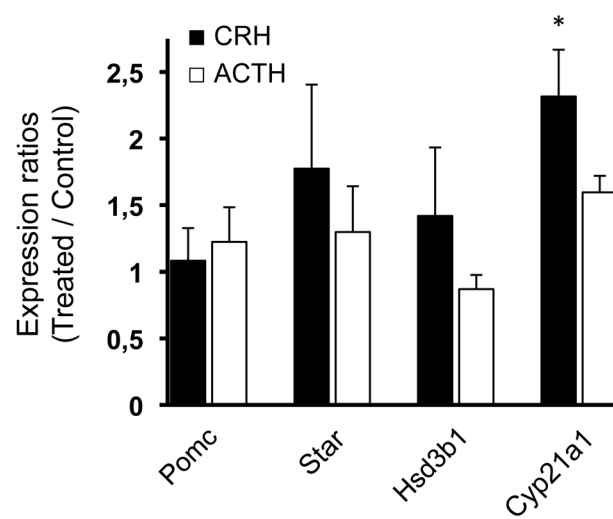


Figure 16



4.15. Tables

Tableau 8: Oligonucleotides and experimental parameters for QPCR, and oligonucleotides for in situ hybridization probe synthesis, for experiments in mouse fetal lungs

Genes ^a (NCBI)	Oligonucleotides ^b QPCR : forward / reverse RNA probes : <u>forward</u> / <u>reverse</u>	Amplicon length (bp) Probe position	QPCR conditions ^c		
			Ann. T°C	Acq. T°C	# of cycles
<i>Target genes</i>					
<i>Pomc</i> (NM_008895)	CATTAGGCTTGAGCAGGTC / TCTTGATGATGGCGTTCTTG <u>ACGTGGAAGATGCCGAGATTCTGCTACAGTC /</u> <u>CAGGAACAGCAGCAGTGC</u>	174 141-433	66	88	45
<i>Mc2r</i> (NM_008560)	CCTCTCTTTGCTGGGCTCTA / GCACCC TTCATGTTGGTTCT <u>CCTCTCTTTGCTGGGCTCTA / GCACCC TTCATGTTGGTTCT</u>	321 589-909	63	83	40
<i>Crh</i> (NM_205769)	CCTGGGGAATCTCAACAGAA / AACACGCGGAAAAAGTTAGC <u>TCCGCATGGGTGAAGAATAC / GGTGGAAGGTGAGATCCAGA</u>	120 347-649	62	89	45
<i>Crhbp</i> (NM_198408)	TCTTACCAGAAGGAGCATCAG / GTGTCCGAGGGTAAGATCAG <u>CGGGGATTTCTGAAGGTAT / CTGCAGTTTGGTGCTGGTA</u>	241 469-768	63	81	45
<i>Crhr1</i> (NM_007762)	CCAGGATCAGCAGTGTGAGA / TGTTGTAGCGGACACCGTAG <u>CCAGGATCAGCAGTGTGAGA / AGTGGCCCAGGTAGTTGATG</u>	161 265-372	64	86	43
<i>Crhr2b</i> (NM_009953)	CAGGCCAGGCACCCAGGAC / GGAACCACGCGATGTTTCTCAG <u>GGCTTTACCTTGGTGGGTAG / TGAAAAATTCCCAGTTGTGGTC</u>	477 162-492	68	85	43
<i>Nr3c1</i> (NM_008173)	GGGGAATTCACAGACTTTCGGCTTCTGGA / GGGAAGCTTCTGACCTCCAAGACTCTCG <u>ACCTGGATGACCAAATGACC /</u> <u>AGGAGAGAAGCAGTAAGGTTTCA</u>	297 1821- 2078	63	83	40
<i>Mrap</i> (NM_029844)	TTCGTGGTGCTCCTCTTTCT / TCCTGGCTCCTCTGTTGTCT	162	63	85	43
<i>Cyp21a1</i> (NM_009995)	CCTTGCCCCATCGTGCAACTA / TGGAGGCAGCAGAGTGAAGG	278	67	85	43
<i>Vim</i> (NM_011701)	GATCAGCTCACCAACGACAA / AAGACGTGCCAGAGAAGCAT	170	62	84	40
<i>Krt18</i> (NM_010664)	GTGGAATCCAGACCGAGAAA / GTTCTTCCTTGAGTGCCTCG	406	58	84	40
<i>Housekeeping genes</i>					
<i>Gapdh</i> (NM_008084)	GTCGGTGTGAACGGATTTG / AAGATGGTGATGGGCTTCC	215	61	84	40
<i>Hprt1</i> (NM_013556)	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG / AATCCAGCAGGTCAGCAAAG	228	64	82	40
<i>Sdha</i> (BC031849)	ACACAGACCTGGTGGAGACC / CAAACGGCTTCTTCTGCTGT	179	59	84	45

^a*Pomc*, proopiomelanocortin; *Mc2r*, melanocortin receptor 2 (ACTH receptor); *Crh*, corticotropin releasing hormone; *Crhbp*, corticotropin releasing hormone binding protein; *Crhr1*, corticotropin releasing hormone receptor 1; *Crhr2b*, corticotropin releasing hormone receptor 2β; *Nr3c1*, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor); *Mrap*, melanocortin2 receptor accessory protein; *Cyp21a1*, 21-hydroxylase; *Vim*, vimentin; *Krt18*, keratin 18; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Sdha*, succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein.

Tableau 9: Mean crossing point (cp) values of the amplified genes in mouse fetal lungs

	Target genes							Housekeeping genes			
	<i>Crh</i>	<i>Crhbp</i>	<i>Crhr1</i>	<i>Crhr2b</i>	<i>Pomc</i>	<i>Mc2r</i>	<i>Nr3c1</i>	<i>Mrap</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Sdha</i>	<i>Gapdh</i>
Mean cp	36.03	35.58	35.49	32.68	35.13	33.46	24.05 ±	32.87	23.15	24.10	17.86
± SD ^a	± 1.49	± 1.92	± 1.35	± 1.50	± 1.24	± 2.06	1.98	± 0.64	± 1.45	± 1.43	± 0.70

^aMean crossing points (cp) ± SD were calculated using GD 15.5, 16.5, and 17.5 mouse fetal lungs. The values are estimations of the relative abundance of the indicated mRNAs (n=16-20 pools). Samples in which no expression was detected were not included. The lower value, the higher mRNA abundance.

CHAPITRE V

Discussion

5.1. Discussion complémentaire au chapitre II

La première étude de cette thèse a permis d'identifier de nombreux gènes dont l'expression est différente selon le sexe dans le poumon fœtal murin pendant une période de maturation pulmonaire qui précède et chevauche la montée de la production du surfactant. Parmi les gènes identifiés, plusieurs sont des candidats intéressants pour leur(s) rôle(s) potentiel(s) dans les processus de maturation ainsi que dans la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire. Tel qu'attendu, plusieurs résultats obtenus des analyses de micropuces d'ADN ont constitué des points de départ pour des études menées dans notre laboratoire. En effet, une expression différente en fonction du sexe et de l'âge gestationnel des gènes *Cyp21a1* et *Hsd3b1* alimenta la caractérisation de l'expression de gènes associés à la production *de novo* de glucocorticoïdes dans le poumon, étude qui suggéra une voie de synthèse locale complète, du cholestérol jusqu'à la corticostérone, selon un profil spécifique au JG 15.5 [274]. Cette étude a été décrite à la fin du chapitre I et constitua une base importante de celle présentée au chapitre IV. De plus, l'observation de différences sexuelles dans l'expression de gènes encodant pour des apolipoprotéines mena à des études approfondies dans le poumon fœtal chez la souris et l'humain. Les faits saillants de ces études seront brièvement abordés ci-dessous.

Les niveaux d'expression génique des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II, E et H ainsi que de la lipoprotéine lipase ont été quantifiés par PCR en temps réel dans des poumons fœtaux de souris mâles et femelles aux JG 15.8 à 18.5 [373]. Les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H ont un profil d'expression temporel similaire et présentent une différence sexuelle en faveur des femelles dans plusieurs des portées étudiées. Les niveaux d'expression de ces quatre gènes d'apolipoprotéines augmentent entre les JG 16.5 et 17.5, alors qu'une augmentation d'expression de l'apoE et de la lipoprotéine lipase est observée entre les JG 17.5 et 18.5. Ces augmentations corrélerent avec la montée de l'expression d'éléments du surfactant. Au JG 17.5, l'apoC-II a été localisée principalement au niveau de l'épithélium distal apparemment dans des granules sécrétoires. Les résultats de cette étude suggèrent une implication de ces gènes dans le métabolisme et le transport des lipides dans le poumon en développement, dans le contexte d'une différence sexuelle concernant la fraction lipidique du surfactant. Faisant suite à cette étude, les sites d'expression génique et d'accumulation

protéique de l'apoC-II et de la lipoprotéine lipase ont été précisément déterminés dans le poumon murin entre le JG 15.5 et le jour post-natal 10 [374]. L'expression de ces deux gènes a été localisée principalement dans l'épithélium distal en fin de gestation, alors que ce n'est pas le cas après la naissance. L'apoC-II a été détectée dans l'épithélium distal, principalement dans celui de conduits sans espace luminal ou qui en présentent un très faible, en fin de gestation et tôt après la naissance. La période temporelle pendant laquelle l'apoC-II est détectée dans des structures granulaires (possiblement des granules sécrétoires) corrèle avec une montée importante de la quantité de phospholipides dans le poumon. La lipoprotéine lipase a été localisée notamment au niveau des capillaires et ce, à tous les âges étudiés. Ces données suggèrent que le recrutement d'acides gras de la circulation par la lipoprotéine lipase, activée par l'apoC-II, serait régulé spatialement par la sécrétion d'apoC-II. L'expression des gènes d'apolipoprotéines et de la lipoprotéine lipase a aussi été étudiée dans le poumon fœtal humain entre les semaines 19 et 40 de grossesse, où une expression élevée des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H a été observée en fin de grossesse par rapport à la période de mi-grossesse [375]. L'expression de la lipoprotéine lipase a été détectée à des niveaux relativement constants pendant la période étudiée. Une co-localisation de la lipoprotéine lipase et de son cofacteur essentiel, l'apoC-II, a été observée par immunohistochimie au niveau des capillaires pulmonaires tard en grossesse, période où le niveau d'expression du gène de l'apoC-II atteint approximativement celui de la lipoprotéine lipase. Donc, le niveau d'expression et la distribution spatiale de l'expression de ces gènes sont régulés en fonction du temps dans le poumon fœtal humain, situation similaire à celle observée chez la souris et compatible avec une fonction pour ces gènes dans la sécrétion des lipides du surfactant en période périnatale.

Par ailleurs, chez la souris les gènes des apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et H partagent leur profil d'expression avec ceux encodant les 17 β HSDs de type 2 et de type 5, qui sont impliquées dans le métabolisme des androgènes [141, 373]. Dans le poumon fœtal humain, l'expression des gènes des 17 β HSDs de type 2 et 5 augmente en fonction du temps alors que des profils de localisations protéiques distincts ont été établis, impliquant principalement l'épithélium des conduits aériens et respiratoires (voir chapitre III). Un lien de fonction entre les enzymes stéroïdogéniques et les apolipoprotéines est suggéré par les

données accumulées chez la souris et l'humain. En effet, il est intéressant de spéculer que les androgènes, régulés par les 17 β HSDs de type 2 et 5, auraient un effet sur l'expression d'apolipoprotéines qui, quant à elles, seraient impliquées dans le métabolisme de la fraction lipidique du surfactant.

Étant donné la nature de l'étude présentée au chapitre II, les objectifs majeurs de la discussion étaient d'analyser et de sélectionner, parmi la liste de gènes identifiés comme étant exprimés différemment selon le sexe, les gènes et les catégories fonctionnelles les plus pertinents dans le contexte de la maturation pulmonaire et d'approfondir l'intégration des connaissances sur ces éléments choisis, en plus de proposer des pistes d'études. Des informations complémentaires seront présentées ici pour attirer l'attention sur quelques gènes montrant une différence sexuelle en expression dans le poumon fœtal murin qui sont jugés particulièrement intéressants. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes encodant pour la CCSP, la rénine 1 et l'Akr1b7. En ce qui concerne CCSP, qui est une protéine importante dans la fonction des granules sécrétoires des cellules de Clara, il est intéressant de constater que l'expression d'une protéine reconnue pour être un marqueur de maturité pulmonaire est influencée par le sexe. Notamment, les glucocorticoïdes sont impliqués dans la régulation de l'expression de CCSP. Beaucoup d'études qui ont contribué à la caractérisation de CCSP n'ont pas considéré le sexe fœtal, alors qu'il semble que ce facteur fasse effectivement partie de l'équation. Deuxièmement, l'expression de la rénine 1, dont l'implication est reconnue dans le système rénine-angiotensine, supporte l'existence d'un tel système dans le poumon fœtal et suggère qu'il soit sujet à une différence sexuelle. Plusieurs observations suggèrent la présence d'un système rénine-angiotensine dans le poumon fœtal et adulte [376], qui a entre autres été étudié dans le contexte de l'hypertension pulmonaire. Ce système pourrait, comme c'est le cas dans d'autres tissus périphériques, participer à la régulation des fluides, qui est une fonction capitale dans le développement pulmonaire normal. Cela pourrait aussi impliquer une régulation locale des minéralocorticoïdes et/ou de leurs effets, aspect de la stéroïdogenèse qui a été peu étudié dans le poumon fœtal. Troisièmement, l'Akr1b7, de par ses capacités de détoxification de l'isocaproaldéhyde généré par la conversion du cholestérol en prégnénolone, est aussi un candidat intéressant puisque sa présence peut suggérer celle de son substrat ainsi qu'une

activité de détoxification en réponse à l'activité de l'enzyme P450sc. Les analyses de micropuces ont révélé que l'Akr1b7 a le même profil d'expression que les enzymes de la cascade de synthèse des glucocorticoïdes, ce qui est compatible avec un rôle pour Akr1b7 dans la réponse à une activité stéroïdogénique accrue. Il serait intéressant d'investiguer l'expression pulmonaire fœtale de ces enzymes qui sont impliquées dans des voies de la stéroïdogénèse qu'on pourrait qualifier de secondaires, car cela pourrait révéler des informations pertinentes sur les types de réactions stéroïdogéniques en présence.

D'autres études portant sur l'expression génique globale dans le poumon en développement ont été publiées postérieurement à celle présentée au chapitre II [279, 377-379]. Une étude menée chez la souris à partir de données d'expression génique de poumons fœtaux obtenus aux JG 12, 14, 16, 18 et aux jours post-natals 1, 4, 7, 10, 14, 21, 28 et 30, dont l'analyse a été orientée sur l'identification de signatures transcriptomiques, a identifié des groupes de gènes dont les profils d'expression permettent d'établir un programme de développement pulmonaire, bref de déterminer une signature moléculaire en association avec la distance, en âge, de la naissance [377]. Des patrons d'expression en association avec l'initiation de l'alvéolisation ont aussi été déterminés. Fait intéressant, le gène *Scgbl1a1* qui encode la protéine CCSP dont il a été question précédemment a été identifié dans cette étude comme étant le plus grand contributeur au fait que l'âge soit déterminé comme le facteur ayant le plus d'influence sur l'expression globale. Une étude semblable a été réalisée par le même groupe en utilisant cette fois des échantillons de poumons fœtaux humains. La période comprenant les semaines de grossesse 7 à 22 a été analysée avec 38 individus répartis sur 29 points de temps [379]. Plusieurs catégories fonctionnelles ont été identifiées, incluant certaines dont la présence dans le poumon fœtal humain était jusqu'alors insoupçonnée ou méconnue, dont des fonctions immunologiques. Par ailleurs, des gènes associés à ces processus ont été identifiés dans notre étude de micropuces d'ADN [285]. Aussi, des fonctions associées au surfactant ont été détectées plus tôt qu'anticipées. En plus de récapituler les stades histologiques du développement pulmonaire, les données obtenues suggèrent notamment l'existence de nouveaux sous-stades moléculaires dans le développement. Ces analyses ont mené à des approches de modélisation permettant de prédire l'état de développement de l'organe par sa signature moléculaire. Il va sans dire que

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. Bien que l'apport scientifique de ces études soit considérable, une lacune doit être soulignée. En effet, considérant le nombre important de gènes dont l'expression est influencée par le sexe, il est pertinent de mentionner que des profils d'expression artéfactuels sont possibles si ce facteur n'est pas considéré dans les analyses. Cet aspect a d'ailleurs été soulevé dans un commentaire publié par F Kauffmann [380] portant sur l'importance de considérer le sexe dans les études portant sur le développement pulmonaire.

L'étude présentée au chapitre II a en quelque sorte été revisitée dans notre laboratoire afin de déterminer, en plus de l'impact du sexe, l'effet d'un inhibiteur du récepteur des androgènes, la flutamide, sur l'expression génique pulmonaire pendant la période de maturation aux JG 17.0 et 18.0 [354]. Au JG 17.0, 1844 gènes sont exprimés différenciellement entre les sexes et 1597 sont modulés par la flutamide, alors qu'au JG 18.0, 833 et 1775 gènes sont exprimés différenciellement en fonction du sexe et de la flutamide, respectivement. Il a été déterminé que les mâles manifestent une activité transcriptionnelle élevée pour des gènes associés à la prolifération cellulaire entre les JG 17.0 et 18.0. Parmi les gènes dont l'expression est modulée en fonction du sexe ou de la flutamide, plusieurs sont associés à la signalisation par le récepteur des androgènes, au surfactant et à la synthèse de phospholipides, ainsi qu'à des mécanismes du développement pulmonaire. Dans l'ensemble, ces résultats supportent le concept de délai dans la maturation entre les mâles et les femelles. Une contribution majeure de cette étude réside toutefois dans l'identification d'une liste substantielle de gènes modulés par la flutamide. Un nombre important de gènes, appartenant à diverses catégories fonctionnelles, semblent donc sous le contrôle des androgènes dans le poumon fœtal pendant la période de maturation. Une importante observation entre l'étude présentée au chapitre II et celle de [354] concerne le nombre de gènes dont l'expression est différente selon le sexe. En effet, seulement 88 transcrits ont été identifiés dans la première étude. Cette différence pourrait s'expliquer par les périodes d'accouplement utilisées : plage d'accouplement couvrant toute la nuit dans la première étude, plage d'accouplement d'une heure dans la deuxième. De

plus, des différences dans le design expérimental, comme par exemple le nombre de réplicats biologiques, le type de micropuce utilisée ainsi que des différences au niveau du traitement des données pourraient expliquer les divergences observées entre les deux études de micropuces. Par ailleurs, ces études ont été discutées, dans le contexte de l'influence des hormones sexuelles sur la maturation pulmonaire fœtale, dans l'article de synthèse présenté en annexe 1.

Une étude récente aborda l'influence des androgènes sur le profil d'expression génique pulmonaire chez la souris adulte ainsi que dans la lignée pulmonaire épithéliale A549 et révéla que, dans le poumon adulte, les androgènes influencent l'expression de plusieurs centaines de gènes [381]. Les analyses dans cette étude ont été orientées sur l'implication potentielle des androgènes dans l'établissement et la progression de certains cancers pulmonaires. Les gènes modulés par les androgènes dans le poumon adulte identifiés dans cette étude seraient intéressants à mettre en perspective avec ceux modulés par la flutamide dans le poumon fœtal identifiés dans l'étude de Bresson, Seaborn, *et al.* [354] pour identifier des gènes potentiellement sous l'influence des androgènes spécifiquement pendant le développement, malgré le fait que les approches expérimentales soient différentes (i.e. administration de testostérone dans un cas et de flutamide dans l'autre). En effet, l'administration de testostérone pourrait provoquer des réponses géniques qui ne sont pas reliées aux androgènes, mais bien aux estrogènes, puisque la testostérone peut être convertie en estradiol par l'activité de l'aromatase.

5.2. Discussion complémentaire au chapitre III

La deuxième étude de cette thèse consista en la caractérisation de l'expression de la 17 β HSD de type 2, de la 17 β HSD de type 5 et de AR dans le poumon fœtal humain en fonction du temps de gestation et du sexe. Les résultats obtenus supportent la présence d'un métabolisme local des androgènes, impliquant différents types cellulaires, et variable en fonction du temps. Cependant, aucune différence sexuelle claire n'a pu être établie. Cette étude dans le poumon fœtal humain a été menée en parallèle de deux autres dans le laboratoire où une caractérisation d'un système local du métabolisme des androgènes a été

réalisée dans le poumon murin en développement pendant les périodes anténatale et postnatale [355, 382]. Ces deux études complètent donc aussi celle publiée en 2004 par notre laboratoire [141] et seront brièvement discutées.

Dans l'étude de Plante *et al.* [355], à laquelle j'ai activement participé à plusieurs niveaux, nous avons montré que la 17 β HSD de type 2 et le AR sont localisés principalement au niveau des cellules épithéliales aux JG 15.5, 16.5 et 17.5. Les résultats de localisation obtenus chez la souris sont en accord avec ce qui a été observé dans les poumons humains [326]. Aucune différence sexuelle n'a pu être observée dans le niveau d'expression ou dans le profil de localisation, malgré un nombre important de portées étudiées. Cependant, une certaine variabilité dans les niveaux d'expression a été observée, mais n'a pu être reliée au sexe ou au temps de gestation. De subtiles différences sexuelles avaient été observées dans le poumon de souris en ce qui concerne l'expression génique de la 17 β HSD2 et de la 17 β HSD5 [141], cependant il est possible que les approches par hybridation *in situ* et immunohistochimie qui ont été utilisées ne permettent pas de détecter ces différences.

L'étude de Boucher *et al.* aborda le métabolisme local des androgènes pendant la période périnatale du développement pulmonaire murin, durant les stades sacculaire et alvéolaire [382]. En effet, les niveaux d'ARNm de AR ainsi que de plusieurs enzymes stéroïdogéniques ont été quantifiés dans des poumons mâles et femelles sur plusieurs points de temps entre le JG 19.5 et le jour post-natal 30. Alors que l'expression de AR augmente durant le stade alvéolaire, celle de la 17 β HSD2 diminue à la fin du stade sacculaire et demeure faible pendant l'alvéolisation. Ce profil n'a pas été observé pour la 17 β HSD1, la 17 β HSD5, la 5 α -réductase de type 1 et la 3 α HSD. Au niveau protéique, AR a été détecté principalement dans le compartiment nucléaire des cellules épithéliales des voies conductrices et de certaines cellules épithéliales des portions respiratoires. L'ARNm de la 17 β HSD2 a été localisé dans les mêmes structures que AR durant le stade sacculaire, mais n'a cependant pas été détecté dans l'épithélium des portions conductrices pendant l'alvéolisation. Une régulation temporelle et spatiale est donc observée pour la 17 β HSD2 et AR durant les stades sacculaire et alvéolaire, ce qui suggère une modulation des actions androgéniques dans le poumon lors des derniers stades de développement.

Dans le but de confirmer les résultats de localisation par immunohistochimie de la 17 β HSD2 sur des coupes de poumons fœtaux, nous avons généré et caractérisé plusieurs préparations d'anticorps polyclonaux dirigées contre les formes murine et humaine de la 17 β HSD2. En effet, bien qu'un anticorps polyclonal dirigé contre la forme humaine ait été développé précédemment dans notre laboratoire [149] et que des préparations commerciales d'anti-17 β HSD2 humaine soient disponibles, aucun anticorps commercial n'était disponible pour la forme murine. De plus, la spécificité de l'anti-17 β HSD2 humaine sur l'isoforme murine n'avait pu être clairement établie. De courts peptides spécifiques aux protéines cibles ont été synthétisés suite à une analyse des séquences en acides aminés correspondantes et ont servi à des immunisations chez le lapin. Par ailleurs, fruit d'une collaboration avec l'équipe du Dr Matti Poutanen de l'université de Turku en Finlande, nous avons pu tester avec succès la spécificité des préparations d'anticorps sur des coupes de poumons de souris 17 β HSD2-KO [153, 355]. L'utilisation de plusieurs préparations d'anticorps nous a permis de valider nos résultats préliminaires autant dans les études chez l'humain que chez la souris. Les détails concernant les anticorps polyclonaux anti-17 β HSD2 sont présentés dans l'article de [355].

Deux aspects en ce qui a trait à la minimisation des biais dans le processus de génération des résultats de QPCR ont été considérés plus attentivement. Le premier aspect en est un technique concernant le protocole de préparation des courbes standards qui sont utilisées dans les expériences de QPCR. Nous avons publié un article sous forme de note technique, dont je suis co-premier auteur, qui propose une modification mineure aux protocoles classiques de QPCR qui utilisent une approche de quantification par courbes standards externes [332]. Brièvement, une différence dans l'efficacité d'amplification des réactions de QPCR entre les échantillons standards et les échantillons cibles peut insérer un biais dans la normalisation des données. Nous avons testé l'effet de différents gabarits d'ADN (court amplicon double brin linéaire et plasmide circulaire) et de la présence de tampon de réaction de synthèse d'ADNc sur l'efficacité d'amplification de réactions de QPCR. L'ajout aux échantillons standards d'amplicons de ce tampon à une concentration équivalente à celle retrouvée dans un échantillon d'ADNc a un effet significatif sur l'efficacité

d'amplification de l'échantillon standard et la rapproche de celle d'un échantillon d'ADNc. Cette méthode a été appliquée aux protocoles de quantification d'expression génique qui font partie des études présentées aux chapitres III et IV. Le deuxième aspect en est un plutôt théorique et concerne l'approche de normalisation des données d'expression à utiliser, plus précisément la détermination d'un groupe de gènes de référence en fonction de leur stabilité d'expression dans les échantillons étudiés. Le besoin d'aborder ce point a été alimenté par la présence d'une certaine hétérogénéité au niveau des échantillons de poumons fœtaux humains et par le fait qu'un tissu en développement est à l'étude (changement dans l'expression de nombreux gènes selon l'évolution du tissu). Bref, l'utilisation d'un seul gène de référence choisi arbitrairement ne convenait pas au contexte. Suite à une recherche dans la littérature scientifique, l'approche proposée par Vandesompele *et al.* [333] a été retenue et appliquée avec modifications mineures. Notamment, elle comprend un outil informatique d'analyse de la stabilité d'expression génique qui permet de sélectionner, parmi un groupe de gènes de référence candidats, ceux dont les niveaux d'expression mesurés dans les échantillons à l'étude montrent la plus grande stabilité. Ensuite, un facteur de normalisation est généré à partir des niveaux d'expression de ces gènes. Le niveau d'expression d'un gène cible est donc normalisé par ce facteur qui est spécifique à chaque échantillon. Finalement, ces approches d'optimisation ajoutent un certain degré de confiance aux résultats de QPCR, et ce même lorsque des différences de faibles amplitudes sont observées.

La banque d'échantillons de poumons fœtaux qui a été constituée suite à plusieurs années de collecte représente une ressource des plus pertinentes pour étudier le poumon en développement. En effet, certains de ces échantillons ont été inclus dans une étude portant sur les apolipoprotéines qui a été réalisée dans notre laboratoire [375], alors qu'ils seront aussi utilisés dans le cadre de projets concernant la régulation et le métabolisme des glucocorticoïdes. Notamment, cette banque offre la possibilité d'investiguer dans le poumon fœtal humain certains aspects préalablement caractérisés dans le modèle murin.

Certains aspects rétrospectifs ou complémentaires à des résultats présentés au chapitre III qui sont jugés dignes d'un intérêt particulier dans le contexte des mécanismes de développement pulmonaire fœtal seront discutés ci-dessous.

Premièrement, il a été montré que les niveaux protéiques de AR varient entre les individus étudiés dans une période gestationnelle qui correspond à la période de haut risque de RDS (chapitre III). Bien que ces variations n'aient pas été reliées au sexe ou à l'âge gestationnel, peut-être parce qu'un nombre insuffisamment élevé d'individus ont été étudiés, elles suggèrent que le poumon fœtal possède une capacité variable de réponse aux androgènes durant une période relativement courte de développement. De plus, ces variations protéiques ne se reflètent pas dans les niveaux d'ARNm correspondants. Des régulations différentielles des niveaux d'ARNm et de protéine ont été rapportées pour AR [383] et nos résultats suggèrent de telles régulations dans le poumon fœtal humain. Il serait donc intéressant de pousser plus loin l'analyse et de déterminer de quelle manière ces niveaux protéiques varient pendant le développement et/ou en fonction du sexe et s'ils influencent les processus de maturation. Cela pourrait contribuer à expliquer pourquoi certains fœtus sont moins avancés dans leur maturation par rapport à d'autres du même âge, étant donné les effets retardant des androgènes sur la maturation pulmonaire. De plus, il serait pertinent de vérifier si les individus présentant des niveaux faibles de AR ont une réponse aux glucocorticoïdes plus importante. En effet, dans la zone très critique concernant la viabilité lors d'une naissance extrêmement prématurée, des différences importantes sont observées entre les fœtus quant à leur état de maturation et aux conséquences associées, ce qui contribue à complexifier l'établissement d'un diagnostic précis pour ces enfants. D'autre part, il semble que l'expression de AR montre certaines différences entre l'humain et la souris. En effet, des niveaux d'ARNm plus élevés en période postnatale et chez l'adulte par rapport aux niveaux fœtaux sont observés chez la souris, alors que ce n'est pas le cas chez l'humain où les niveaux baissent légèrement, mais significativement, pendant la grossesse et semblent demeurer à ce niveau chez l'adulte. La prudence est cependant de mise lors des comparaisons des niveaux d'expression entre les deux espèces puisque ce ne sont pas exactement les mêmes périodes du développement pulmonaire qui ont été étudiées. Par exemple, la période d'alvéolisation a pu être étudiée en détail seulement chez la souris.

Deuxièmement, la présence de la 17 β HSD2 et de AR dans les mêmes structures, notamment dans les cellules épithéliales, suggère que les niveaux d'androgènes ayant accès au récepteur sont finement régulés dans ces cellules. Bien qu'il ait été montré que l'effet des androgènes sur la maturation s'exerce sur la capacité des fibroblastes pulmonaires à promouvoir la production de surfactant par les cellules épithéliales de type II [384], nos résultats suggèrent une action directe, potentiellement modulée, des androgènes sur les cellules épithéliales des conduits des zones distales et proximales à mi-gestation. Cela pourrait avoir une implication dans la communication complexe qui s'établit entre le mésenchyme et l'épithélium pendant le développement pulmonaire. En outre, l'expression épithéliale des 17 β HSDs de type 2 et de type 5 pourrait aussi impliquer une modulation des niveaux d'androgènes se retrouvant dans le fluide intrapulmonaire. Ces androgènes circulant potentiellement dans l'espace luminal de l'arbre pulmonaire pourraient influencer la maturation des différents types de cellules épithéliales.

Troisièmement, en ce qui concerne les profils d'expression des 17 β HSD2 et 17 β HSD5, autant chez l'humain que la souris, il serait intéressant d'étudier l'origine des coréglations observées, par exemple au niveau des facteurs de transcription potentiellement impliqués. Cependant, chez l'humain, ce point doit être nuancé par les différences marquées de sites d'expression entre les deux enzymes. Les banques de données de micropuces d'ADN sur l'expression génique pulmonaire pourraient être exploitées en ce sens. En ce qui concerne la 17 β HSD2, les différences dans l'intensité de marquage entre les cellules épithéliales des régions distales et celles des régions proximales qui montrent un profil inversé en hybridation *in situ* par rapport à ce qui est observé en immunohistochimie suggèrent une régulation différentielle de l'ARNm et de la protéine en fonction du type cellulaire. Bien que certains aspects techniques puissent être en cause, il serait pertinent de clarifier ce résultat. De plus, la détermination précise du(des) type(s) cellulaire(s) qui exprime(nt) la 17 β HSD de type 5, qui pourrait être abordée par l'utilisation de marqueurs cellulaires spécifiques en immunohistochimie ou par une technique de cytométrie en flux, ainsi qu'une investigation plus serrée de la fonction probablement très spécifique d'une production spatialement restreinte d'androgènes seraient aussi des suites pertinentes de l'étude.

Finalement, tel que mentionné dans la discussion de l'article, les activités autres que sur le métabolisme des androgènes des 17 β HSD2 et 17 β HSD5 sont à considérer dans l'interprétation des résultats. Cet aspect est d'ailleurs soutenu par l'étude du modèle de souris 17 β HSD2-KO [153], où plusieurs effets sur le phénotype semblent indépendants de l'action des hormones sexuelles.

Une discussion plus approfondie concernant les implications des hormones sexuelles et des enzymes stéroïdogéniques dans le développement pulmonaire fœtal est présentée dans l'article de synthèse qui est inséré en annexe 1.

5.3. Discussion complémentaire au chapitre IV

La troisième étude de cette thèse consista principalement en une caractérisation dans le poumon fœtal murin de l'expression de gènes associés à l'axe HPA. En effet, une des hypothèses avancées concernait la présence dans le poumon fœtal d'un système de régulation du métabolisme des glucocorticoïdes analogue à celui retrouvé au niveau de l'axe HPA, comme c'est le cas dans certains tissus périphériques telle la peau. Ces éléments ont été abordés à la fin du chapitre I, ainsi qu'au chapitre IV. Cette étude fut la première à donner suite à celle de [274], qui amorça à proprement dit dans notre laboratoire une thématique de recherche sur le métabolisme des glucocorticoïdes dans le poumon fœtal. Parmi les nouveaux questionnements qui ont été soulevés et discutés suite à l'analyse des résultats présentés au chapitre IV, ceux qui offrent les perspectives les plus intéressantes seront brièvement approfondis dans cette section. Toutefois, il importe ici d'être bref puisque la section de discussion du chapitre IV couvre de manière relativement exhaustive les concepts associés à l'étude.

Un premier aspect concerne les expériences d'incubation d'explants de poumons fœtaux en présence d'ACTH ou de CRH. En effet, une stimulation significative par CRH de l'expression de *Cyp21a1* a été observée dans les explants prélevés au JG 17.5, toutefois les résultats des quantifications d'expression génique et de synthèse de désoxycorticostérone

suggèrent que les conditions et/ou les approches expérimentales n'aient pas été optimales pour observer de fortes réponses (voir la section de résultats du chapitre IV). Plusieurs paramètres expérimentaux, comme par exemple la concentration des hormones, le temps d'incubation, la composition des milieux de culture et l'âge gestationnel des explants, pourraient être modulés pour approfondir cet aspect. Il est à noter que la concentration utilisée a été basée sur ce qui a été retrouvé dans la littérature pour des expériences semblables. L'efficacité des nutriments et des substances testées à pénétrer le tissu et à atteindre les zones cibles n'a pas été évaluée. Aussi, la concentration d'oxygène à laquelle les tissus ont été exposés lors de ces expériences diffère de celle retrouvée *in vivo* et a pu avoir un impact sur les résultats. Le groupe de gènes cibles qui a été mesuré pourrait aussi être étendu, alors qu'une étude par micropuces d'ADN pour déterminer l'effet de CRH et ACTH sur le transcriptome pulmonaire serait assurément informative. De plus, il serait envisageable d'utiliser des antagonistes des récepteurs de CRH et du récepteur d'ACTH (MC2R) dans les expériences d'incubation d'explants dans le but de décortiquer la voie de régulation et de déterminer l'implication de chacun des membres. En outre, il importe de considérer certaines limitations que comporte l'utilisation d'explants pulmonaires en tant que modèle du poumon en développement, entre autre dues à l'absence des forces de distension pulmonaire normales et de circulation sanguine (facteurs sériques).

Le deuxième point concerne, au niveau des explants pulmonaires fœtaux, l'expression des enzymes de synthèse de glucocorticoïdes et les activités stéroïdogéniques correspondantes. L'expression de *Cyp21a1*, mais pas celle de *Cyp11b1*, a été détectée dans les explants et les poumons totaux aux JG 15.5 et 17.5. De plus, la synthèse de désoxycorticostérone à partir de progestérone par l'activité 21-hydroxylase a été démontrée dans les explants au JG 17.5, mais aucune accumulation de corticostérone n'a été observée. Les profils d'expression de *Cyp21a1* et *Cyp11b1* observés dans cette étude et celle de [274], où une co-expression transitoire élevée des gènes de la voie surrénalienne de synthèse de glucocorticoïdes a été rapportée, suggèrent que les enzymes 21-hydroxylase et 11 β -hydroxylase ne soient pas soumises aux mêmes mécanismes de régulation pendant le développement. Suivant cela, un rôle physiologique pour la désoxycorticostérone localement produite reste à déterminer. Plusieurs questions demeurent sans réponse en ce qui concerne un système de régulation

qui s'annonce complexe. Par ailleurs, divers aspects du métabolisme local des glucocorticoïdes dans le poumon fœtal sont actuellement sous investigation dans le laboratoire du Dr Tremblay.

En troisième lieu, rappelons que les expériences réalisées sur les cultures primaires enrichies en cellules mésenchymateuses et épithéliales ont mené à certains résultats inattendus. En effet, les quantifications d'ARNm ont révélé que les niveaux d'expression de *Crh*, *Cyp21a1* et *Cyp11b1*, notamment, montrent des différences importantes entre les cultures de cellules primaires enrichies et les poumons totaux. La régulation de leur expression génique est manifestement perturbée lors de la mise en culture des cellules et il est intrigant de constater que les niveaux d'expression de *Crh* varient inversement à ceux des gènes de la voie de synthèse de glucocorticoïdes. Une investigation plus approfondie sur cet aspect pourrait fournir des informations pertinentes quant à la régulation de l'expression de ces gènes dans le poumon fœtal. Ces résultats soulèvent toutefois l'importance d'être prudent dans l'interprétation des résultats lorsque les expérimentations sont menées sur des cultures de cellules pulmonaires enrichies. De plus, l'impact du facteur sexe n'a pas été évalué dans ces expériences, car le nombre de cellules récupérées, surtout au JG 15.5, était relativement faible. Le protocole devra être adapté afin de permettre cette analyse dans de futures expériences, d'autant plus que les résultats obtenus suggèrent des différences entre les poumons complets et les cultures de cellules enrichies.

Finalement, pendant la période de maturation pulmonaire, les cellules épithéliales des conduits respiratoires semblent être le lieu d'une active expression de gènes associés à la stéroïdogenèse et à sa régulation. En effet, une expression préférentiellement épithéliale au JG 17.5 du groupe de gènes associés à l'axe HPA a été détectée par hybridation *in situ*. Les résultats de quantification dans les cultures de cellules pulmonaires suggèrent une expression épithéliale de *Cyp21a1*, alors qu'un métabolisme des androgènes a été suggéré par l'expression de la 17 β HSD2, de la 17 β HSD5 et de AR au niveau de cellules épithéliales dans le poumon. Ces aspects offrent de nouvelles perspectives et avenues de recherche quant aux rôles et aux interactions de ces gènes dans les processus de maturation

pulmonaire fœtale, considérant que les cellules épithéliales sont intimement impliquées dans ces événements et que les androgènes et les glucocorticoïdes exercent des actions parfois antagonistes sur les processus de maturation pulmonaire.

CHAPITRE VI

Conclusion

6.1. Rétrospective des principaux résultats en fonction des hypothèses et objectifs du projet

Notre hypothèse concernant l'existence de différences sexuelles dans l'expression génique pulmonaire globale pendant une période qui précède et chevauche la montée de la production de surfactant chez la souris a été confirmée par nos résultats de micropuces d'ADN (chapitre II). Bien qu'en nombre moins élevé qu'attendu, plusieurs gènes potentiellement très intéressants dans le contexte de la maturation pulmonaire fœtale ont été identifiés et associés à différents processus biologiques, notamment l'apoptose, la transduction de signal, la régulation transcriptionnelle, les fonctions immunes et les métabolismes hormonal et lipidique. Plus précisément, des gènes d'enzymes de synthèse stéroïdienne et des gènes d'apolipoprotéines ont montré des différences sexuelles dans leur expression. L'intérêt pour ces gènes relève de l'effet des glucocorticoïdes sur la maturation pulmonaire et du métabolisme lipidique lié à la production des lipides du surfactant qui s'amorce pendant la période gestationnelle étudiée. D'ailleurs, tel que décrit au chapitre V, certains des gènes identifiés furent l'objet d'études plus poussées dans le laboratoire du Dr Tremblay. En effet, la banque de gènes dont l'expression est fonction du sexe qui a été obtenue constitue une ressource substantielle de candidats à étudier pour approfondir nos connaissances des différences sexuelles du poumon fœtal, alors que les analyses réalisées sur cette banque ont permis de cibler les gènes et les groupes fonctionnels qui sont les plus pertinents à caractériser dans le cadre d'études futures.

La deuxième hypothèse principale de ce projet, qui proposait la présence d'un métabolisme local des androgènes dans le poumon fœtal humain pendant une période du développement pulmonaire qui comprend l'initiation de la production de surfactant, a été confirmée par les caractérisations d'expression aux niveaux génique et protéique de la 17 β HSD2, de la 17 β HSD5 et de AR. En effet, les profils observés en ce qui concerne les niveaux et les sites d'expression des enzymes et du récepteur supportent la présence d'un tel métabolisme et ce, chez les mâles et les femelles. Plus précisément, la co-localisation de la 17 β HSD2 et du AR suggèrent une régulation fine de l'occupation du AR dans les cellules épithéliales principalement, mais aussi dans les fibroblastes, alors que la localisation de la 17 β HSD5

dans une sous-population épithéliale des conduits respiratoires suggère une production très localisée d'androgènes. Aussi, les niveaux d'ARNm varient significativement en fonction de l'âge gestationnel : ceux concernant les 17 β HSDs de type 2 et de type 5 augmentent alors que ceux de AR diminuent pendant la deuxième moitié de la grossesse. Les niveaux mesurés dans le poumon adulte sont plus élevés que ceux mesurés pendant la période fœtale pour les 17 β HSDs de type 2 et de type 5, alors que celui de AR est similaire à celui retrouvé en fin de grossesse. De subtiles différences sexuelles ont été observées au niveau des corrélations calculées entre le niveau d'expression génique et l'âge gestationnel (gène vs âge), ainsi qu'entre les niveaux d'expression des gènes (gène vs gène). De plus, la variation interindividuelle importante qui a été observée relativement au niveau protéique de AR suggère une capacité de réponse aux androgènes variable entre les individus dans une fenêtre temporelle relativement courte à mi-gestation. Par ailleurs, le métabolisme des androgènes et son implication dans le développement pulmonaire ont été mis en perspective et discutés dans l'article de synthèse qui est présenté à l'annexe 1.

L'hypothèse principale de la troisième étude de ce projet stipulait la présence dans le poumon fœtal d'un système de régulation des glucocorticoïdes analogue à celui retrouvé le long de l'axe HPA. Cette hypothèse n'a pu être confirmée, bien qu'elle n'ait pas été infirmée. En effet, nous avons montré que le poumon fœtal exprime, selon différents profils, plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'axe HPA, soit *Crh*, *Crhr1* et *Crhr2 β* , *Crhbp*, *Pomc*, *Mc2r* et *Nr3c1*. Particulièrement, *Mc2r* est exprimé à de relativement hauts niveaux dans certains échantillons qui montrent aussi des niveaux élevés d'expression des gènes de la voie de synthèse surrénalienne de glucocorticoïdes. Ce résultat est très intéressant puisqu'il suggère qu'ACTH soit impliqué dans la stimulation de l'expression de ces gènes. Aussi, une co-localisation de *Crhr1* et de *Pomc* a été observée aux JG 15.5 et 16.5 dans les zones péri-épithéliales, ce qui suggère que la liaison de CRH à son récepteur mène à la production d'ACTH par ces cellules. D'ailleurs, la prohormone POMC a été détectée dans les mêmes structures. Un autre résultat digne de mention concerne l'expression de *Crh* qui augmente parallèlement à celle de *Nr3c1* pendant la période gestationnelle étudiée. Il s'agit en effet des deux seuls gènes parmi ceux étudiés dont l'expression augmente avec le temps. D'autre part, le seul gène ayant montré une

différence sexuelle dans son expression est *Crhbp*. Nous avons aussi établi que les gènes étudiés montrent une expression préférentiellement épithéliale au JG 17.5. Un des objectifs de l'étude était d'investiguer sur la capacité de CRH et d'ACTH à stimuler l'expression pulmonaire de gènes de la voie de synthèse des glucocorticoïdes et de déterminer si la co-expression de ces gènes à de hauts niveaux, observée précédemment au JG 15.5, pouvait être reproduite *in vitro*. Bien que l'expression des gènes de la voie de synthèse surrénalienne de glucocorticoïdes n'ait pas été stimulée par CRH ou ACTH dans les expériences d'explants pulmonaires fœtaux prélevés au JG 15.5, nous avons observé une capacité de CRH à stimuler significativement l'expression de la 21-hydroxylase dans des explants prélevés au JG 17.5. De plus, une synthèse de désoxycorticostérone à partir de la progestérone, impliquant l'activité 21-hydroxylase, a été détectée dans les explants pulmonaires. Ces résultats, bien qu'ils le suggèrent, ne nous permettent pas de conclure qu'un système de régulation analogue à celui de l'axe HPA est présent dans le poumon fœtal. Toutefois, plusieurs observations supportent des rôles pour les protéines encodées par ces gènes dans la maturation pulmonaire.

6.2. Perspectives

Abordons d'abord quelques perspectives de recherche concernant l'étude présentée au chapitre II. Un certain nombre de gènes parmi ceux identifiés ont fait l'objet d'études plus poussées dans notre laboratoire (voir chapitre V), toutefois la caractérisation de plusieurs candidats reste à faire. Les plus pertinents d'entre eux ont été discutés ci-dessus et font partie des avenues potentielles de recherche issues de l'analyse des différences sexuelles observées, ce qui s'insère directement dans les objectifs de l'étude. S'ajoutant à ces aspects, il serait intéressant de revisiter la banque de données de micropuces d'ADN et de la comparer avec les autres banques d'expression pulmonaires disponibles pour la souris et l'humain. En effet, la comparaison et la mise en commun de ces banques de données permettront de dresser un portrait de plus en plus précis de l'expression génique pulmonaire. Notamment, les travaux de notre laboratoire, par l'étude présentée au chapitre II et celle de [354], ont grandement contribué à mettre en lumière les différences sexuelles dans cette expression. D'ailleurs, l'étude de l'expression génique globale en fonction du sexe dans les poumons fœtaux humains reste à faire et serait indubitablement informative

concernant le dimorphisme sexuel observé dans le développement pulmonaire, en plus de permettre des comparaisons avec les banques d'expression disponibles ainsi que des analyses intégratives. L'utilisation de technologies émergentes pour des caractérisations d'expression à haut débit au niveau transcriptomique et protéomique, comme le séquençage en profondeur (*deep sequencing*) et l'utilisation de la spectrométrie de masse, respectivement, seraient des avenues à considérer [171]. De plus, l'évolution constante des bases de données d'annotations de gènes permettra l'identification de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions. Les données d'expression qui s'accumulent à un rythme accéléré ne demandent qu'à être analysées et ce, sous toutes leurs facettes, ce qui ne sera pas une mince tâche.

Concernant le chapitre III, plusieurs avenues sont à développer alors que la présence d'une machinerie moléculaire présumant un métabolisme local des androgènes est confirmée dans le poumon humain en développement. Par exemple, la génération de modèles de souris dont les gènes des 17 β HSDs de type 2 et de type 5 sont invalidés spécifiquement dans le poumon ou dans un type cellulaire pulmonaire particulier permettrait de caractériser plus précisément leurs fonctions dans le poumon fœtal. Cela pourrait aussi être abordé de manière plus complexe par la génération de modèles doubles ou triples KO, conditionnels et spécifiques, selon différentes combinaisons pour les gènes de la 17 β HSD2, de la 17 β HSD5 et de AR. S'ajoutant à ces perspectives qui concernent directement les enzymes étudiées, une étude plus large de la stéroïdogénèse pulmonaire est à considérer. En effet, un portrait plus défini du métabolisme stéroïdien dans le poumon fœtal pourra être dressé suite à l'avancement des connaissances concernant les profils d'expression d'enzymes reliées au métabolisme des androgènes et des autres classes de stéroïdes, les activités stéroïdogéniques en présence et les types cellulaires impliqués en fonction de l'âge gestationnel, de certains aspects du développement pulmonaire, comme la production de surfactant, et de pathologies pulmonaires. Cela dans le but de déterminer les fonctions biologiques précises de ces enzymes et leurs implications dans des états physiopathologiques. Un exemple en ce sens étant que, dans le cancer du sein, des ratios obtenus des mesures de plusieurs enzymes permettent une meilleure prédiction sur l'efficacité d'un traitement que des mesures individuelles [385]. Pour de plus amples détails

à propos de l'état des connaissances sur le métabolisme des hormones sexuelles dans le poumon en développement, voir l'article de synthèse en annexe 1. Par ailleurs, une banque de tissus de poumons humains de nouveau-nés décédés de détresse respiratoire permettrait d'approfondir les caractérisations et d'identifier les profils d'expression associés directement à cette situation pathologique. En effet, les tissus qui ont été obtenus pour mener l'étude présentée au chapitre III présentent une certaine hétérogénéité biologique puisqu'ils proviennent d'enfants nés prématurément dû à des causes d'origine maternelle ou fœtale diverses. Cependant, il est important de noter que dans les cas graves de détresse respiratoire l'enfant décède des complications de la maladie auxquelles on compte les effets des traitements (ex. : ventilation mécanique agressive). Il devient donc difficile de départager les causes des conséquences. Un autre point intéressant est qu'une approche thérapeutique éventuelle ciblant les effets androgéniques dans le développement pulmonaire pourra bénéficier des avancées dans le domaine des inhibiteurs spécifiques des enzymes stéroïdogéniques ainsi que de l'étude des coactivateurs des récepteurs nucléaires. Cela pour, d'une part, moduler les niveaux d'hormones qui ont accès aux récepteurs et, d'autre part, moduler les effets des récepteurs nucléaires sur la transcription de gènes.

En ce qui concerne l'étude présentée au chapitre IV, certaines questions demeurent alors que d'autres sont soulevées, par exemple: Comment la co-expression à des niveaux élevés des gènes de la voie de synthèse surrénalienne de glucocorticoïdes qui a été observée au JG 15.5 est-elle régulée et quel est son rôle? Quel serait le rôle physiologique de la désoxycorticostérone produite par le poumon fœtal, au-delà du fait qu'elle soit un substrat de la 11 β -hydroxylase pour la formation de corticostérone? D'autres travaux sont nécessaires pour déterminer si un système de régulation analogue à celui de l'axe HPA est présent dans le poumon fœtal. Nonobstant la présence d'un tel système, une implication de ces gènes dans la maturation pulmonaire est fortement suggérée par les résultats obtenus. Donc, plusieurs aspects méritent d'être décortiqués ou approfondis en s'orientant sur les balises placées par l'étude présentée au chapitre IV. Par exemple, une suite appropriée bien que complexe serait d'investiguer sur un potentiel lien fonctionnel dans le poumon fœtal au JG 15.5 entre la co-expression forte de *Mc2r* avec les gènes de la voie surrénalienne de synthèse de glucocorticoïdes et la co-localisation de l'expression de *Crhr1* et de *Pomc* au

niveau périépithélial aux JG 15.5 et 16.5. En effet, dans ce cas tous les effecteurs de l'axe HPA seraient présents, de CRH jusqu'à la 11 β -hydroxylase. De plus, il est envisageable que CRH et ACTH soient impliqués dans la régulation de la synthèse des glucocorticoïdes par le poumon fœtal selon des mécanismes qui diffèrent de ceux retrouvés au niveau l'axe HPA. En outre, ces deux hormones pourraient exercer des rôles distincts et/ou variables dans le développement. D'un point vue technique, les cultures primaires enrichies en cellules mésenchymateuses et épithéliales sont des outils qui pourraient se révéler très utiles dans le cadre d'études subséquentes sur le métabolisme des stéroïdes et sa régulation. En ce sens, la possibilité d'améliorer la spécificité et la pureté des enrichissements cellulaires par l'utilisation, par exemple, d'une approche de cytométrie en flux serait à envisager. En plus d'expériences d'incubation par exemple en présence d'hormones, d'inhibiteurs ou d'ARN interférants, les cultures primaires pourraient être préparées à partir de poumons fœtaux qui ont été exposés à une substance d'intérêt, par exemple un inhibiteur, par l'administration d'un traitement aux souris gestantes, directement aux fœtus, ou encore dans le liquide amniotique. Finalement, suite à ce qui a et aura été observé en utilisant le modèle de souris, il sera intéressant d'investiguer le métabolisme des glucocorticoïdes et sa régulation dans le poumon fœtal humain, qui est évidemment notre principal intéressé.

MS

CHAPITRE VII

Bibliographie et annexe

7.1. Bibliographie

1. Engle, W.A., *Age terminology during the perinatal period*. Pediatrics, 2004. **114**(5): p. 1362-4.
2. Canada, P.H.A.o., *Canadian Perinatal Health Report, 2008 Edition*. Ottawa, <http://www.publichealth.gc.ca/cphr/>, 2008.
3. Barber, M. and C.J. Blaisdell, *Respiratory causes of infant mortality: progress and challenges*. Am J Perinatol, 2010. **27**(7): p. 549-58.
4. Joseph, K.S., M.S. Kramer, S. Marcoux, A. Ohlsson, S.W. Wen, A. Allen, and R. Platt, *Determinants of preterm birth rates in Canada from 1981 through 1983 and from 1992 through 1994*. N Engl J Med, 1998. **339**(20): p. 1434-9.
5. Martin, J.A., B.E. Hamilton, P.D. Sutton, S.J. Ventura, F. Menacker, and S. Kirmeyer, *Births: final data for 2004*. Natl Vital Stat Rep, 2006. **55**(1): p. 1-101.
6. Mathews, T.J., A.M. Minino, M.J. Osterman, D.M. Strobino, and B. Guyer, *Annual summary of vital statistics: 2008*. Pediatrics, 2011. **127**(1): p. 146-57.
7. Kelly, M.M., *The basics of prematurity*. J Pediatr Health Care, 2006. **20**(4): p. 238-44.
8. Jobe, A.H., *Lung maturation: the survival miracle of very low birth weight infants*. Pediatr Neonatol, 2010. **51**(1): p. 7-13.
9. Jobe, A.H., *"Miracle" extremely low birth weight neonates: examples of developmental plasticity*. Obstet Gynecol, 2010. **116**(5): p. 1184-90.
10. Hanley, K., U. Rassner, Y. Jiang, D. Vansomphone, D. Crumrine, L. Komuves, P.M. Elias, K.R. Feingold, and M.L. Williams, *Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. Acceleration by estrogen and delay by testosterone*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2576-84.
11. Pieh, C., H. Agostini, C. Buschbeck, M. Kruger, J. Schulte-Monting, U. Zirrgiebel, J. Dreves, and W.A. Lagreze, *VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Tie2 levels in plasma of premature infants: relationship to retinopathy of prematurity*. Br J Ophthalmol, 2008. **92**(5): p. 689-93.
12. Van Overmeire, B. and S. Chemtob, *The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus*. Semin Fetal Neonatal Med, 2005. **10**(2): p. 177-84.
13. Ohlsson, A., R. Walia, and S.S. Shah, *Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(4): p. CD003481.
14. Vieux, R., J.M. Hascoet, D. Merdarius, J. Fresson, and F. Guillemin, *Glomerular filtration rate reference values in very preterm infants*. Pediatrics, 2010. **125**(5): p. e1186-92.
15. Hunter, C.J., J.S. Upperman, H.R. Ford, and V. Camerini, *Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC)*. Pediatr Res, 2008. **63**(2): p. 117-23.
16. Vassilyadi, M., Z. Tataryn, M.F. Shamji, and E.C. Ventureyra, *Functional outcomes among premature infants with intraventricular hemorrhage*. Pediatr Neurosurg, 2009. **45**(4): p. 247-55.
17. Finer, N.N., R. Higgins, J. Kattwinkel, and R.J. Martin, *Summary proceedings from the apnea-of-prematurity group*. Pediatrics, 2006. **117**(3 Pt 2): p. S47-51.

18. Copland, I. and M. Post, *Lung development and fetal lung growth*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. S259-64.
19. Stevenson, D.K., L.L. Wright, J.A. Lemons, W. Oh, S.B. Korones, L.A. Papile, C.R. Bauer, B.J. Stoll, J.E. Tyson, S. Shankaran, A.A. Fanaroff, E.F. Donovan, R.A. Ehrenkranz, and J. Verter, *Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **179**(6 Pt 1): p. 1632-9.
20. Farrell, P.M. and M.E. Avery, *Hyaline membrane disease*. Am Rev Respir Dis, 1975. **111**(5): p. 657-88.
21. Robert, M.F., R.K. Neff, J.P. Hubbell, H.W. Taeusch, and M.E. Avery, *Association between maternal diabetes and the respiratory-distress syndrome in the newborn*. N Engl J Med, 1976. **294**(7): p. 357-60.
22. Dani, C., M.F. Reali, G. Bertini, L. Wiechmann, A. Spagnolo, M. Tangucci, and F.F. Rubaltelli, *Risk factors for the development of respiratory distress syndrome and transient tachypnoea in newborn infants*. Italian Group of Neonatal Pneumology. Eur Respir J, 1999. **14**(1): p. 155-9.
23. Rodriguez, R.J., *Management of respiratory distress syndrome: an update*. Respir Care, 2003. **48**(3): p. 279-86; discussion 286-7.
24. Lankenau, H.M., *A genetic and statistical study of the respiratory distress syndrome*. Eur J Pediatr, 1976. **123**(3): p. 167-77.
25. Floros, J., S.V. Veletza, P. Kotikalapudi, L. Krizkova, A.M. Karinch, C. Friedman, S. Buchter, and K. Marks, *Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory-distress syndrome*. Biochem J, 1995. **305** (Pt 2): p. 583-90.
26. Kala, P., T. Ten Have, H. Nielsen, M. Dunn, and J. Floros, *Association of pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene and respiratory distress syndrome: interaction with SP-B*. Pediatr Res, 1998. **43**(2): p. 169-77.
27. Hamvas, A., F.S. Cole, D.E. deMello, M. Moxley, J.A. Whitsett, H.R. Colten, and L.M. Nogee, *Surfactant protein B deficiency: antenatal diagnosis and prospective treatment with surfactant replacement*. J Pediatr, 1994. **125**(3): p. 356-61.
28. Karcher, R., E. Sykes, D. Batton, Z. Uddin, G. Ross, E. Hockman, and G.H. Shade, Jr., *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.
29. Bahasadri, S. and N. Changizi, *Association between lamellar body count and respiratory distress in neonates*. Saudi Med J, 2005. **26**(9): p. 1414-6.
30. Hunter, L.A., D.S. McKenna, and M.A. Baptista, *Comparison of lamellar body counts using light microscopy with standard coulter counter techniques to assess fetal lung maturity*. Gynecol Obstet Invest, 2006. **61**(1): p. 29-33.
31. Bazowska, G., A. Jendryczko, and J. Dudkiewicz, *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 Genet Med Gemellol (Roma), 1994. **43**(3-4): p. 185-92.
32. Gluck, L., E.K. Motoyama, H.L. Smits, and M.V. Kulovich, *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*. Pediatr Res, 1967. **1**(4): p. 237-46.

33. Gluck, L., M. Sribney, and M.V. Kulovich, *The biochemical development of surface activity in mammalian lung. II. The biosynthesis of phospholipids in the lung of the developing rabbit fetus and newborn*. *Pediatr Res*, 1967. **1**(4): p. 247-65.
34. Liu, K.Z., T.C. Dembinski, and H.H. Mantsch, *Prediction of RDS from amniotic fluid analysis: a comparison of the prognostic value of TLC and infra-red spectroscopy*. *Prenat Diagn*, 1998. **18**(12): p. 1267-75.
35. Hagen, E., J.C. Link, and F. Arias, *A comparison of the accuracy of the TDx-FLM assay, lecithin-sphingomyelin ratio, and phosphatidylglycerol in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome*. *Obstet Gynecol*, 1993. **82**(6): p. 1004-8.
36. Herbert, W.N., J.F. Chapman, and M.M. Schnoor, *Role of the TDx FLM assay in fetal lung maturity*. *Am J Obstet Gynecol*, 1993. **168**(3 Pt 1): p. 808-12.
37. Haymond, S., V.I. Luzzi, C.A. Parvin, and A.M. Gronowski, *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.
38. Poggi, S.H., C.Y. Spong, J.C. Pezzullo, P.Z. Bannon, K.M. Goodwin, J. Vink, and A. Ghidini, *Lecithin/sphingomyelin ratio and lamellar body count. What values predict the presence of phosphatidylglycerol?* *J Reprod Med*, 2003. **48**(5): p. 330-4.
39. Liggins, G.C. and R.N. Howie, *A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants*. *Pediatrics*, 1972. **50**(4): p. 515-25.
40. Sweet, D., G. Bevilacqua, V. Carnielli, G. Greisen, R. Plavka, O.D. Saugstad, U. Simeoni, C.P. Speer, I.S.A. Valls, and H. Halliday, *European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome*. *J Perinat Med*, 2007. **35**(3): p. 175-86.
41. Wapner, R., *Antenatal corticosteroids: we continue to learn*. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. **190**(4): p. 875.
42. Jobe, A.H. and M. Ikegami, *Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era*. *Annu Rev Physiol*, 2000. **62**: p. 825-46.
43. Sinha, S., F. Moya, and S.M. Donn, *Surfactant for respiratory distress syndrome: are there important clinical differences among preparations?* *Curr Opin Pediatr*, 2007. **19**(2): p. 150-4.
44. Ghodrati, M., *Lung surfactants*. *Am J Health Syst Pharm*, 2006. **63**(16): p. 1504-21.
45. Suresh, G.K. and R.F. Soll, *Overview of surfactant replacement trials*. *J Perinatol*, 2005. **25 Suppl 2**: p. S40-4.
46. Soll, R.F. and C.J. Morley, *Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2001(2): p. CD000510.
47. Askie, L.M., D.J. Henderson-Smart, L. Irwig, and J.M. Simpson, *Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(10): p. 959-67.
48. Saugstad, O.D., *Oxygen for newborns: how much is too much?* *J Perinatol*, 2005. **25 Suppl 2**: p. S45-9; discussion S50.
49. Darlow, B.A. and P.J. Graham, *Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(4): p. CD000501.
50. Van Marter, L.J., *Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia*. *Curr Opin Pediatr*, 2005. **17**(2): p. 174-80.

51. Tambunting, F., K.D. Beharry, J. Hartleroad, J. Waltzman, Y. Stavitsky, and H.D. Modanlou, *Increased lung matrix metalloproteinase-9 levels in extremely premature baboons with bronchopulmonary dysplasia*. *Pediatr Pulmonol*, 2005. **39**(1): p. 5-14.
52. Costa, R.H., V.V. Kalinichenko, and L. Lim, *Transcription factors in mouse lung development and function*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **280**(5): p. L823-38.
53. Hislop, A., *Developmental biology of the pulmonary circulation*. *Paediatr Respir Rev*, 2005. **6**(1): p. 35-43.
54. Kitaoka, H., P.H. Burri, and E.R. Weibel, *Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips*. *Anat Rec*, 1996. **244**(2): p. 207-13.
55. Warburton, D., M. Schwarz, D. Tefft, G. Flores-Delgado, K.D. Anderson, and W.V. Cardoso, *The molecular basis of lung morphogenesis*. *Mech Dev*, 2000. **92**(1): p. 55-81.
56. Delacourt, C., P.H. Jarreau, and J. Bourbon, [*Normal and abnormal alveolar development*]. *Rev Mal Respir*, 2003. **20**(3 Pt 1): p. 373-83.
57. Rannels, S.R., R.N. Grove, and D.E. Rannels, *Matrix-derived soluble components influence type II pneumocytes in primary culture*. *Am J Physiol*, 1989. **256**(3 Pt 1): p. C621-9.
58. Cardoso, W.V., *Molecular regulation of lung development*. *Annu Rev Physiol*, 2001. **63**: p. 471-94.
59. Lin, S., M. Ikegami, Y. Xu, A.K. Bosserhoff, A.M. Malkinson, and J.M. Shannon, *Misexpression of MIA disrupts lung morphogenesis and causes neonatal death*. *Dev Biol*, 2008. **316**(2): p. 441-55.
60. Zemke, A.C., J.C. Snyder, B.L. Brockway, J.A. Drake, S.D. Reynolds, N. Kaminski, and B.R. Stripp, *Molecular staging of epithelial maturation using secretory cell-specific genes as markers*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **40**(3): p. 340-8.
61. Dammann, C.E., H.C. Nielsen, and K.L. Carraway, 3rd, *Role of neuregulin-1 beta in the developing lung*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(12): p. 1711-6.
62. Leslie, K.O., J.J. Mitchell, J.L. Woodcock-Mitchell, and R.B. Low, *Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung*. *Differentiation*, 1990. **44**(2): p. 143-9.
63. Mitchell, J.J., S.E. Reynolds, K.O. Leslie, R.B. Low, and J. Woodcock-Mitchell, *Smooth muscle cell markers in developing rat lung*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1990. **3**(6): p. 515-23.
64. Leslie, K.O., J. Mitchell, and R. Low, *Lung myofibroblasts*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1992. **22**(2): p. 92-8.
65. Derin, B.G., D. Erdogan, G. Take, and N. Lortlar, *Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in developing lung tissues*. *Saudi Med J*, 2007. **28**(3): p. 334-8.
66. Coraux, C., A. Delplanque, J. Hinrasky, B. Peault, E. Puchelle, and D. Gaillard, *Distribution of integrins during human fetal lung development*. *J Histochem Cytochem*, 1998. **46**(7): p. 803-10.

67. Coraux, C., G. Meneguzzi, P. Rousselle, E. Puchelle, and D. Gaillard, *Distribution of laminin 5, integrin receptors, and branching morphogenesis during human fetal lung development*. Dev Dyn, 2002. **225**(2): p. 176-85.
68. Rolland, G., J. Xu, J.M. Dupret, and M. Post, *Expression and characterization of type IV collagenases in rat lung cells during development*. Exp Cell Res, 1995. **218**(1): p. 346-50.
69. Fukuda, Y., M. Ishizaki, Y. Okada, M. Seiki, and N. Yamanaka, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in fetal rabbit lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L555-61.
70. Miller, T.L., S.M. Touch, C.J. Singhaus, P.B. Ramesh Babu, A. Chidekel, and T.H. Shaffer, *Expression of matrix metalloproteinases 2, 7 and 9, and their tissue inhibitors 1 and 2, in developing rabbit tracheae*. Biol Neonate, 2006. **89**(4): p. 236-43.
71. Reponen, P., C. Sahlberg, P. Huhtala, T. Hurskainen, I. Thesleff, and K. Tryggvason, *Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7856-62.
72. Gill, S.E., M.C. Pape, R. Khokha, A.J. Watson, and K.J. Leco, *A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis*. Dev Biol, 2003. **261**(2): p. 313-23.
73. Masumoto, K., J.D. de Rooij, S. Suita, R. Rottier, D. Tibboel, and R.R. de Krijger, *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during normal human pulmonary development*. Histopathology, 2005. **47**(4): p. 410-9.
74. O'Connor, C.M. and M.X. FitzGerald, *Matrix metalloproteases and lung disease*. Thorax, 1994. **49**(6): p. 602-9.
75. Cederqvist, K., T. Sorsa, T. Tervahartiala, P. Maisi, K. Reunanen, P. Lassus, and S. Andersson, *Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress*. Pediatrics, 2001. **108**(3): p. 686-92.
76. Winkler, M.K., J.K. Foldes, R.C. Bunn, and J.L. Fowlkes, *Implications for matrix metalloproteinases as modulators of pediatric lung disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(4): p. L557-65.
77. Masumoto, K., J.D. de Rooij, S. Suita, R. Rottier, D. Tibboel, and R.R. de Krijger, *The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the lungs of congenital diaphragmatic hernia patients and age-matched controls*. Histopathology, 2006. **48**(5): p. 588-95.
78. Curley, A.E., D.G. Sweet, C.M. Thornton, M.D. O'Hara, E. Chesshyre, J. Pizzotti, M.S. Wilbourn, H.L. Halliday, and J.A. Warner, *Chorioamnionitis and increased neonatal lung lavage fluid matrix metalloproteinase-9 levels: implications for antenatal origins of chronic lung disease*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(4): p. 871-5.
79. Schock, B.C., D.G. Sweet, M. Ennis, J.A. Warner, I.S. Young, and H.L. Halliday, *Oxidative stress and increased type-IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies*. Pediatr Res, 2001. **50**(1): p. 29-33.
80. Sweet, D.G. and H.L. Halliday, *Modeling and remodeling of the lung in neonatal chronic lung disease: implications for therapy*. Treat Respir Med, 2005. **4**(5): p. 347-59.

81. Ekekezie, II, D.W. Thibeault, S.D. Simon, M. Norberg, J.D. Merrill, R.A. Ballard, P.L. Ballard, and W.E. Truog, *Low levels of tissue inhibitors of metalloproteinases with a high matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio are present in tracheal aspirate fluids of infants who develop chronic lung disease.* Pediatrics, 2004. **113**(6): p. 1709-14.
82. Bland, R.D. and D.W. Nielson, *Developmental changes in lung epithelial ion transport and liquid movement.* Annu Rev Physiol, 1992. **54**: p. 373-94.
83. Kitano, Y., E.Y. Yang, D. von Allmen, T.M. Quinn, N.S. Adzick, and A.W. Flake, *Tracheal occlusion in the fetal rat: a new experimental model for the study of accelerated lung growth.* J Pediatr Surg, 1998. **33**(12): p. 1741-4.
84. Maltais, F., T. Seaborn, S. Guay, and B. Piedboeuf, *In vivo tracheal occlusion in fetal mice induces rapid lung development without affecting surfactant protein C expression.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(4): p. L622-32.
85. Mesas-Burgos, C., A.C. Eklof, B. Linderholm, B. Robertson, and B. Frenckner, *Lung morphology after late fetal tracheal ligation in rats.* Eur J Pediatr Surg, 2006. **16**(3): p. 160-5.
86. Seaborn, T., P.A. Khan, M. Cloutier, F. Maltais, and B. Piedboeuf, *Short-term response to tracheal occlusion during perinatal lung development in mice.* Exp Lung Res, 2007. **33**(8-9): p. 441-57.
87. Seaborn, T., J. St-Amand, M. Cloutier, M.G. Tremblay, F. Maltais, S. Dinel, V. Moulin, P.A. Khan, and B. Piedboeuf, *Identification of cellular processes that are rapidly modulated in response to tracheal occlusion within mice lungs.* Pediatr Res, 2008. **63**(2): p. 124-30.
88. Alcorn, D., T.M. Adamson, T.F. Lambert, J.E. Maloney, B.C. Ritchie, and P.M. Robinson, *Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung.* J Anat, 1977. **123**(Pt 3): p. 649-60.
89. Moessinger, A.C., R. Harding, T.M. Adamson, M. Singh, and G.T. Kiu, *Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung.* J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1270-7.
90. Khan, P.A., M. Cloutier, and B. Piedboeuf, *Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature.* Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007. **145C**(2): p. 125-38.
91. Strang, L.B., *Fetal lung liquid: secretion and reabsorption.* Physiol Rev, 1991. **71**(4): p. 991-1016.
92. Deprest, J., K. Nicolaides, E. Done, P. Lewi, G. Barki, E. Largen, P. DeKoninck, I. Sandaite, Y. Ville, A. Benachi, J. Jani, I. Amat-Roldan, and E. Gratacos, *Technical aspects of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia.* J Pediatr Surg, 2011. **46**(1): p. 22-32.
93. O'Brodovich, H.M., *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. 345-55.
94. Johnson, M.D., J.H. Widdicombe, L. Allen, P. Barbry, and L.G. Dobbs, *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. 1966-71.

95. Yue, G., W.J. Russell, D.J. Benos, R.M. Jackson, M.A. Olman, and S. Matalon, *Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8418-22.
96. Farman, N., C.R. Talbot, R. Boucher, M. Fay, C. Canessa, B. Rossier, and J.P. Bonvalet, *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. C131-41.
97. Talbot, C.L., D.G. Bosworth, E.L. Briley, D.A. Fenstermacher, R.C. Boucher, S.E. Gabriel, and P.M. Barker, *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.
98. Xu, B., X. Qu, S. Gu, Y.Q. Doughman, M. Watanabe, S.L. Dunwoodie, and Y.C. Yang, *Cited2 is required for fetal lung maturation*. Dev Biol, 2008. **317**(1): p. 95-105.
99. Tremblay, L.O., E. Nagy Kovacs, E. Daniels, N.K. Wong, M. Sutton-Smith, H.R. Morris, A. Dell, E. Marcinkiewicz, N.G. Seidah, C. McKerlie, and A. Herscovics, *Respiratory distress and neonatal lethality in mice lacking Golgi alpha1,2-mannosidase IB involved in N-glycan maturation*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2558-66.
100. Simon, D.M., M.C. Arikian, S. Srisuma, S. Bhattacharya, L.W. Tsai, E.P. Ingenito, F. Gonzalez, S.D. Shapiro, and T.J. Mariani, *Epithelial cell PPAR[gamma] contributes to normal lung maturation*. Faseb J, 2006. **20**(9): p. 1507-9.
101. Rooney, S.A., S.L. Young, and C.R. Mendelson, *Molecular and cellular processing of lung surfactant*. Faseb J, 1994. **8**(12): p. 957-67.
102. Serrano, A.G. and J. Perez-Gil, *Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system*. Chem Phys Lipids, 2006. **141**(1-2): p. 105-18.
103. Parmigiani, S., E. Solari, and G. Bevilacqua, *Current concepts on the pulmonary surfactant in infants*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2005. **18**(6): p. 369-80.
104. Korfhagen, T.R., M.D. Bruno, G.F. Ross, K.M. Huelsman, M. Ikegami, A.H. Jobe, S.E. Wert, B.R. Stripp, R.E. Morris, S.W. Glasser, C.J. Bachurski, H.S. Iwamoto, and J.A. Whitsett, *Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9594-9.
105. Klein, J.M., M.W. Thompson, J.M. Snyder, T.N. George, J.A. Whitsett, E.F. Bell, P.B. McCray, Jr., and L.M. Noguee, *Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure*. J Pediatr, 1998. **132**(2): p. 244-8.
106. Mazela, J., T.A. Merritt, J. Gadzinowski, and S. Sinha, *Evolution of pulmonary surfactants for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome and paediatric lung diseases*. Acta Paediatr, 2006. **95**(9): p. 1036-48.
107. Payne, A.H. and D.B. Hales, *Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 947-70.
108. Penning, T.M., Y. Jin, S. Steckelbroeck, T. Lanisnik Rizner, and M. Lewis, *Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **215**(1-2): p. 63-72.
109. Simard, J., M.L. Ricketts, S. Gingras, P. Soucy, F.A. Feltus, and M.H. Melner, *Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family*. Endocr Rev, 2005. **26**(4): p. 525-82.
110. Miller, W.L., *Steroidogenic enzymes*. Endocr Dev, 2008. **13**: p. 1-18.

111. Moeller, G. and J. Adamski, *Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **301**(1-2): p. 7-19.
112. Peltoketo, H., V. Luu-The, J. Simard, and J. Adamski, *17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes*. J Mol Endocrinol, 1999. **23**(1): p. 1-11.
113. Lukacik, P., K.L. Kavanagh, and U. Oppermann, *Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 61-71.
114. Luu-The, V., *Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **76**(1-5): p. 143-51.
115. Peltoketo, H., P. Vihko, and R. Vihko, *Regulation of estrogen action: role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Vitam Horm, 1999. **55**: p. 353-98.
116. Penning, T.M., Y. Jin, T.L. Rizner, and D.R. Bauman, *Pre-receptor regulation of the androgen receptor*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **281**(1-2): p. 1-8.
117. Penning, T.M. and J.W. Ricigliano, *Mechanism based inhibition of hydroxysteroid dehydrogenases*. J Enzyme Inhib, 1991. **5**(3): p. 165-98.
118. Baker, M.E., *Evolution of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **171**(1-2): p. 211-5.
119. Mustonen, M.V., M.H. Poutanen, V.V. Isomaa, P.T. Vihko, and R.K. Vihko, *Cloning of mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and analysing expression of the mRNAs for types 1, 2, 3, 4 and 5 in mouse embryos and adult tissues*. Biochem J, 1997. **325 (Pt 1)**: p. 199-205.
120. Poirier, D., *Advances in development of inhibitors of 17beta hydroxysteroid dehydrogenases*. Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(6): p. 642-60.
121. Tuncbag, N., A. Gursoy, E. Guney, R. Nussinov, and O. Keskin, *Architectures and functional coverage of protein-protein interfaces*. J Mol Biol, 2008. **381**(3): p. 785-802.
122. Adamski, J., T. Normand, F. Leenders, D. Monte, A. Begue, D. Stehelin, P.W. Jungblut, and Y. de Launoit, *Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV*. Biochem J, 1995. **311 (Pt 2)**: p. 437-43.
123. Nokelainen, P., H. Peltoketo, R. Vihko, and P. Vihko, *Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(7): p. 1048-59.
124. Torn, S., P. Nokelainen, R. Kurkela, A. Pulkka, M. Menjivar, S. Ghosh, M. Coca-Prados, H. Peltoketo, V. Isomaa, and P. Vihko, *Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(1): p. 37-45.
125. Pletnev, V.Z. and W.L. Duax, *Rational proteomics IV: modeling the primary function of the mammalian 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **94**(4): p. 327-35.

126. He, X.Y. and S.Y. Yang, *Roles of type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in intracrinology and metabolism of isoleucine and fatty acids*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006. **6**(1): p. 95-102.
127. Shafqat, N., H.U. Marschall, C. Filling, E. Nordling, X.Q. Wu, L. Bjork, J. Thyberg, E. Martensson, S. Salim, H. Jornvall, and U. Oppermann, *Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3alpha/7alpha/7beta/17beta/20beta/21-HSD*. *Biochem J*, 2003. **376**(Pt 1): p. 49-60.
128. Yan, S.D., J. Fu, C. Soto, X. Chen, H. Zhu, F. Al-Mohanna, K. Collison, A. Zhu, E. Stern, T. Saido, M. Tohyama, S. Ogawa, A. Roher, and D. Stern, *An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease*. *Nature*, 1997. **389**(6652): p. 689-95.
129. Chai, Z., P. Brereton, T. Suzuki, H. Sasano, V. Obeyesekere, G. Escher, R. Saffery, P. Fuller, C. Enriquez, and Z. Krozowski, *17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells*. *Endocrinology*, 2003. **144**(5): p. 2084-91.
130. Blanchard, P.G. and V. Luu-The, *Differential androgen and estrogen substrates specificity in the mouse and primates type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. *J Endocrinol*, 2007. **194**(2): p. 449-55.
131. Geissler, W.M., D.L. Davis, L. Wu, K.D. Bradshaw, S. Patel, B.B. Mendonca, K.O. Elliston, J.D. Wilson, D.W. Russell, and S. Andersson, *Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3*. *Nat Genet*, 1994. **7**(1): p. 34-9.
132. Aziz, N., M.M. Maxwell, B. St Jacques, and B.M. Brenner, *Downregulation of Ke 6, a novel gene encoded within the major histocompatibility complex, in murine polycystic kidney disease*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(3): p. 1847-53.
133. Yang, S.Y., X.Y. He, and H. Schulz, *Multiple functions of type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(4): p. 167-75.
134. Jansson, A.K., C. Gunnarsson, M. Cohen, T. Sivik, and O. Stal, *17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 affects estradiol levels in breast cancer cells and is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(23): p. 11471-7.
135. Meier, M., G. Moller, and J. Adamski, *Perspectives in understanding the role of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in health and disease*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1155**: p. 15-24.
136. Jansson, A., C. Gunnarsson, and O. Stal, *Proliferative responses to altered 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD) type 2 expression in human breast cancer cells are dependent on endogenous expression of 17HSD type 1 and the oestradiol receptors*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(3): p. 875-84.
137. Sasano, H., T. Suzuki, Y. Miki, and T. Moriya, *Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008. **108**(3-5): p. 181-5.
138. Day, J.M., H.J. Tutill, A. Purohit, and M.J. Reed, *Design and validation of specific inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(3): p. 665-92.

139. Poirier, D., *17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2010. **20**(9): p. 1123-45.
140. Wu, L., M. Einstein, W.M. Geissler, H.K. Chan, K.O. Elliston, and S. Andersson, *Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12964-9.
141. Provost, P.R., M. Simard, and Y. Tremblay, *A link between lung androgen metabolism and the emergence of mature epithelial type II cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(3): p. 296-305.
142. Bonenfant, M., C.H. Blomquist, P.R. Provost, R. Drolet, P. D'Ascoli, and Y. Tremblay, *Tissue- and site-specific gene expression of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: in situ hybridization and specific enzymatic activity studies in human placental endothelial cells of the arterial system*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4841-50.
143. Akinola, L.A., M. Poutanen, and R. Vihko, *Cloning of rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and characterization of tissue distribution and catalytic activity of rat type 1 and type 2 enzymes*. Endocrinology, 1996. **137**(5): p. 1572-9.
144. Labrie, F., V. Luu-The, S.X. Lin, J. Simard, C. Labrie, M. El-Alfy, G. Pelletier, and A. Belanger, *Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(1): p. 1-16.
145. Stoffel, W., Weiss, B. , *EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide Sequence Databases X95685*. 1996.
146. Casey, M.L., P.C. MacDonald, and S. Andersson, *17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progesterin regulation of gene expression in human endometrium*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 2135-41.
147. Sasano, H., T. Suzuki, J. Takeyama, H. Utsunomiya, K. Ito, N. Ariga, and T. Moriya, *17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human breast and endometrial carcinoma. A new development in intracrinology*. Oncology, 2000. **59 Suppl 1**: p. 5-12.
148. Takeyama, J., H. Sasano, T. Suzuki, K. Iinuma, H. Nagura, and S. Andersson, *17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta: an immunohistochemical study with correlation to placental development*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(10): p. 3710-5.
149. Drolet, R., M. Simard, J. Plante, P. Laberge, and Y. Tremblay, *Human type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein distribution in placental villi at mid and term pregnancy*. Reprod Biol Endocrinol, 2007. **5**: p. 30.
150. Provost, P.R., C.H. Blomquist, R. Drolet, N. Flamand, and Y. Tremblay, *Androgen inactivation in human lung fibroblasts: variations in levels of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 5 alpha-reductase activity compatible with androgen inactivation*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3883-92.
151. Nielsen, H.C., H.M. Zinman, and J.S. Torday, *Dihydrotestosterone inhibits fetal rabbit pulmonary surfactant production*. J Clin Invest, 1982. **69**(3): p. 611-6.
152. Zhongyi, S., P. Rantakari, T. Lamminen, J. Toppari, and M. Poutanen, *Transgenic male mice expressing human hydroxysteroid dehydrogenase 2 indicate a role for the enzyme independent of its action on sex steroids*. Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 3827-36.

153. Rantakari, P., L. Strauss, R. Kiviranta, H. Lagerbohm, J. Paviola, I. Holopainen, S. Vainio, P. Pakarinen, and M. Poutanen, *Placenta defects and embryonic lethality resulting from disruption of mouse hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 gene*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(3): p. 665-75.
154. Shen, Z., T. Saloniemi, A. Ronnblad, P. Jarvensivu, P. Pakarinen, and M. Poutanen, *Sex steroid-dependent and -independent action of hydroxysteroid (17beta) Dehydrogenase 2: evidence from transgenic female mice*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 4941-9.
155. Penning, T.M., M.E. Burczynski, J.M. Jez, C.F. Hung, H.K. Lin, H. Ma, M. Moore, N. Palackal, and K. Ratnam, *Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 67-77.
156. Komoto, J., T. Yamada, K. Watanabe, and F. Takusagawa, *Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3)*. Biochemistry, 2004. **43**(8): p. 2188-98.
157. Penning, T.M., M.E. Burczynski, J.M. Jez, H.K. Lin, H. Ma, M. Moore, K. Ratnam, and N. Palackal, *Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3)*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **171**(1-2): p. 137-49.
158. Sharma, K.K., A. Lindqvist, X.J. Zhou, R.J. Auchus, T.M. Penning, and S. Andersson, *Deoxycorticosterone inactivation by AKR1C3 in human mineralocorticoid target tissues*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 79-86.
159. Khanna, M., K.N. Qin, R.W. Wang, and K.C. Cheng, *Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases*. J Biol Chem, 1995. **270**(34): p. 20162-8.
160. Deyashiki, Y., K. Ohshima, M. Nakanishi, K. Sato, K. Matsuura, and A. Hara, *Molecular cloning and characterization of mouse estradiol 17 beta-dehydrogenase (A-specific), a member of the aldoketoreductase family*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10461-7.
161. Biswas, M.G. and D.W. Russell, *Expression cloning and characterization of oxidative 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15959-66.
162. Qin, K.N., M.I. New, and K.C. Cheng, *Molecular cloning of multiple cDNAs encoding human enzymes structurally related to 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **46**(6): p. 673-9.
163. Pelletier, G., V. Luu-The, S. Li, and F. Labrie, *Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in mouse tissues as studied by in situ hybridization*. Cell Tissue Res, 2005. **320**(3): p. 393-8.
164. Velica, P., N.J. Davies, P.P. Rocha, H. Schrewe, J.P. Ride, and C.M. Bunce, *Lack of functional and expression homology between human and mouse aldo-keto reductase 1C enzymes: implications for modelling human cancers*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 121.
165. Provost, P.R., C.H. Blomquist, C. Godin, X.F. Huang, N. Flamand, V. Luu-The, D. Nadeau, and Y. Tremblay, *Androgen formation and metabolism in the pulmonary epithelial cell line A549: expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 3*. Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2786-94.

166. Evans, R.M., *The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(6): p. 1429-38.
167. McEwan, I.J., *Nuclear receptors: one big family*. Methods Mol Biol, 2009. **505**: p. 3-18.
168. Aranda, A. and A. Pascual, *Nuclear hormone receptors and gene expression*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1269-304.
169. Faus, H. and B. Haendler, *Post-translational modifications of steroid receptors*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(9): p. 520-8.
170. Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak, and C.K. Glass, *Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response*. Genes Dev, 2006. **20**(11): p. 1405-28.
171. Cheung, E. and W.L. Kraus, *Genomic analyses of hormone signaling and gene regulation*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 191-218.
172. O'Malley, B.W., J. Qin, and R.B. Lanz, *Cracking the coregulator codes*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 310-5.
173. Wilson, C.M. and M.J. McPhaul, *A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1234-8.
174. Wilson, C.M. and M.J. McPhaul, *A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues*. Mol Cell Endocrinol, 1996. **120**(1): p. 51-7.
175. Zoppi, S., C.M. Wilson, M.D. Harbison, J.E. Griffin, J.D. Wilson, M.J. McPhaul, and M. Marcelli, *Complete testicular feminization caused by an amino-terminal truncation of the androgen receptor with downstream initiation*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 1105-12.
176. Gao, T. and M.J. McPhaul, *Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(5): p. 654-63.
177. Pelletier, G., *Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues*. Histol Histopathol, 2000. **15**(4): p. 1261-70.
178. Sajjad, Y., S. Quenby, P. Nickson, D.I. Lewis-Jones, and G. Vince, *Immunohistochemical localization of androgen receptors in the urogenital tracts of human embryos*. Reproduction, 2004. **128**(3): p. 331-9.
179. Sajjad, Y., S. Quenby, P. Nickson, D.I. Lewis-Jones, and G. Vince, *Androgen receptors are expressed in a variety of human fetal extragenital tissues: an immunohistochemical study*. Asian J Androl, 2007. **9**(6): p. 751-9.
180. Matsumoto, T., K. Takeyama, T. Sato, and S. Kato, *Study of androgen receptor functions by genetic models*. J Biochem (Tokyo), 2005. **138**(2): p. 105-10.
181. Bennett, N.C., R.A. Gardiner, J.D. Hooper, D.W. Johnson, and G.C. Gobe, *Molecular cell biology of androgen receptor signalling*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(6): p. 813-27.
182. Claessens, F., S. Denayer, N. Van Tilborgh, S. Kerkhofs, C. Helsen, and A. Haelens, *Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling*. Nucl Recept Signal, 2008. **6**: p. e008.
183. Bebermeier, J.H., J.D. Brooks, S.E. DePrimo, R. Werner, U. Deppe, J. Demeter, O. Hiort, and P.M. Holterhus, *Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription*. J Mol Med, 2006. **84**(11): p. 919-31.

184. Rahman, F. and H.C. Christian, *Non-classical actions of testosterone: an update*. Trends Endocrinol Metab, 2007. **18**(10): p. 371-8.
185. Foradori, C.D., M.J. Weiser, and R.J. Handa, *Non-genomic actions of androgens*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 169-81.
186. Michels, G. and U.C. Hoppe, *Rapid actions of androgens*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 182-98.
187. Huang, P., V. Chandra, and F. Rastinejad, *Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 247-72.
188. Sauer, B., *Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system*. Methods, 1998. **14**(4): p. 381-92.
189. Kerkhofs, S., S. Denayer, A. Haelens, and F. Claessens, *Androgen receptor knockout and knock-in mouse models*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(1): p. 11-7.
190. Zhou, X., *Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice*. J Androl, 2010. **31**(3): p. 235-43.
191. Shanklin, D.R., *The sex of premature infants with hyaline membrane disease*. South Med J, 1963. **56**: p. 1018-22.
192. Papageorgiou, A.N., E. Colle, E. Farri-Kostopoulos, and M.M. Gelfand, *Incidence of respiratory distress syndrome following antenatal betamethasone: role of sex, type of delivery, and prolonged rupture of membranes*. Pediatrics, 1981. **67**(5): p. 614-7.
193. Perelman, R.H., M.J. Engle, M. Palta, J.W. Kemnitz, and P.M. Farrell, *Fetal lung development in male and female nonhuman primates*. Pediatr Res, 1986. **20**(10): p. 987-91.
194. Torday, J.S., *Androgens delay human fetal lung maturation in vitro*. Endocrinology, 1990. **126**(6): p. 3240-4.
195. Rodriguez, A., R.M. Viscardi, and J.S. Torday, *Fetal androgen exposure inhibits fetal rat lung fibroblast lipid uptake and release*. Exp Lung Res, 2001. **27**(1): p. 13-24.
196. Nielsen, H.C., *Androgen receptors influence the production of pulmonary surfactant in the testicular feminization mouse fetus*. J Clin Invest, 1985. **76**(1): p. 177-81.
197. Floros, J., H.C. Nielsen, and J.S. Torday, *Dihydrotestosterone blocks fetal lung fibroblast-pneumonocyte factor at a pretranslational level*. J Biol Chem, 1987. **262**(28): p. 13592-8.
198. McMillan, E.M., G.M. King, and I.Y. Adamson, *Sex hormones influence growth and surfactant production in fetal lung explants*. Exp Lung Res, 1989. **15**(2): p. 167-79.
199. Nielsen, H.C., *Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development*. Proc Soc Exp Biol Med, 1992. **199**(4): p. 446-52.
200. Rosenblum, D.A., M.V. Volpe, C.E. Dammann, Y.S. Lo, J.F. Thompson, and H.C. Nielsen, *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.
201. Klein, J.M. and H.C. Nielsen, *Androgen regulation of epidermal growth factor receptor binding activity during fetal rabbit lung development*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 425-31.

202. Pereira, S., C.E. Dammann, D. McCants, and H.C. Nielsen, *Transforming growth factor beta 1 binding and receptor kinetics in fetal mouse lung fibroblasts*. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **218**(1): p. 51-61.
203. Nielsen, H.C., W.O. Kirk, N. Swezey, and J.S. Torday, *Coordination of growth and differentiation in the fetal lung*. Exp Cell Res, 1990. **188**(1): p. 89-96.
204. Pasqualini, J.R., *Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **97**(5): p. 401-15.
205. Wong, L., J.L. Spearow, V.D. Castracane, and M. Barkley, *Genetic variation in plasma androgens and ovarian aromatase activity during mouse pregnancy*. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **208**(3): p. 277-82.
206. Mendelson, C.R., B. Jiang, J.M. Shelton, J.A. Richardson, and M.M. Hinshelwood, *Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **95**(1-5): p. 25-33.
207. Abramovich, D.R., *Human sexual differentiation--in utero influences*. J Obstet Gynaecol Br Commonw, 1974. **81**(6): p. 448-53.
208. Grumbach, M.M., et al., in *Williams textbook of endocrinology, 10th edition*, P.R. Larsen, Kronenberg, H.M., Melmed, S., and Polonsky, K.S., Editor. 2003, Saunders: Philadelphia. p. pp. 842-969.
209. Boucher, E., P.R. Provost, A. Devillers, and Y. Tremblay, *Levels of dihydrotestosterone, testosterone, androstenedione, and estradiol in canalicular, saccular, and alveolar mouse lungs*. Lung, 2010. **188**(3): p. 229-33.
210. Seaborn, T., M. Simard, P.R. Provost, B. Piedboeuf, and Y. Tremblay, *Sex hormone metabolism in lung development and maturation*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(12): p. 729-38.
211. Milewich, L., P.C. MacDonald, and B.R. Carr, *Activity of 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase in tissues of the human fetus*. J Endocrinol, 1989. **123**(3): p. 509-18.
212. Milewich, L., P.C. MacDonald, and B.R. Carr, *Estrogen 16 alpha-hydroxylase activity in human fetal tissues*. J Clin Endocrinol Metab, 1986. **63**(2): p. 404-6.
213. Milewich, L., V. Kaimal, C.B. Shaw, and A.R. Johnson, *Androstenedione metabolism in human lung fibroblasts*. J Steroid Biochem, 1986. **24**(4): p. 893-7.
214. Milewich, L. and D.A. Cain, *Metabolism of dehydroisoandrosterone and androstenedione by human A-549 alveolar type II epithelial-like cells*. J Steroid Biochem, 1986. **25**(2): p. 249-54.
215. Milewich, L., A. Bagheri, C.B. Shaw, and A.R. Johnson, *Metabolism of androsterone and 5 alpha-androstane-3 alpha,17 beta-diol in human lung tissue and in pulmonary endothelial cells in culture*. J Clin Endocrinol Metab, 1985. **60**(2): p. 244-50.
216. Milewich, L., R.L. Garcia, and L.W. Gerrity, *Steroid sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase activities in mouse tissues*. J Steroid Biochem, 1984. **21**(5): p. 529-38.
217. Milewich, L., R.L. Garcia, and A.R. Johnson, *Steroid sulfatase activity in human lung tissue and in endothelial pulmonary cells in culture*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(1): p. 8-14.
218. Milewich, L., V. Kaimal, and G.B. Toews, *Androstenedione metabolism in human alveolar macrophages*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **56**(5): p. 920-4.

219. Milewich, L., T.S. Hendricks, and A.R. Johnson, *Metabolism of dehydroisoandrosterone and androstenedione in human pulmonary endothelial cells in culture*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **56**(5): p. 930-5.
220. Milewich, L., T.S. Hendricks, and L.H. Romero, *Interconversion of estrone and estradiol-17 beta in lung slices of the adult human*. J Steroid Biochem, 1982. **17**(6): p. 669-74.
221. Milewich, L., S.L. Smith, and P.C. MacDonald, *Nonrespiratory functions of the human lung: in vitro metabolism of tritium-labeled progesterone and pregnenolone*. J Clin Endocrinol Metab, 1980. **50**(3): p. 507-15.
222. Milewich, L., P.S. Parker, and P.C. MacDonald, *Testosterone metabolism by human lung tissue*. J Steroid Biochem, 1978. **9**(1): p. 29-32.
223. Milewich, L., A.J. Winters, P. Stephens, and P.C. MacDonald, *Metabolism of dehydroisoandrosterone and androstenedione by the human lung in vitro*. J Steroid Biochem, 1977. **8**(4): p. 277-84.
224. Papadimitriou, A. and K.N. Priftis, *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Neuroimmunomodulation, 2009. **16**(5): p. 265-71.
225. Lin, H.Y., Y.A. Muller, and G.L. Hammond, *Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(1): p. 3-12.
226. Kageyama, K. and T. Suda, *Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus*. Endocr J, 2009. **56**(3): p. 335-44.
227. Raffin-Sanson, M.L., Y. de Keyser, and X. Bertagna, *Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions*. Eur J Endocrinol, 2003. **149**(2): p. 79-90.
228. Nicolaidis, N.C., Z. Galata, T. Kino, G.P. Chrousos, and E. Charmandari, *The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function*. Steroids, 2010. **75**(1): p. 1-12.
229. Stahn, C. and F. Buttgerit, *Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. **4**(10): p. 525-33.
230. Zhou, J. and J.A. Cidlowski, *The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses*. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 407-17.
231. Duma, D., C.M. Jewell, and J.A. Cidlowski, *Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. **102**(1-5): p. 11-21.
232. Lu, N.Z. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(6): p. 301-7.
233. Kino, T., Y.A. Su, and G.P. Chrousos, *Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(21): p. 3435-48.
234. Kino, T., I. Manoli, S. Kelkar, Y. Wang, Y.A. Su, and G.P. Chrousos, *Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(4): p. 671-5.
235. Hinds, T.D., Jr., S. Ramakrishnan, H.A. Cash, L.A. Stechschulte, G. Heinrich, S.M. Najjar, and E.R. Sanchez, *Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(9): p. 1715-27.

236. Beato, M., G. Chalepakis, M. Schauer, and E.P. Slater, *DNA regulatory elements for steroid hormones*. J Steroid Biochem, 1989. **32**(5): p. 737-47.
237. Taniguchi-Yanai, K., Y. Koike, T. Hasegawa, Y. Furuta, M. Serizawa, N. Ohshima, N. Kato, and K. Yanai, *Identification and characterization of glucocorticoid receptor-binding sites in the human genome*. J Recept Signal Transduct Res, 2010. **30**(2): p. 88-105.
238. Dostert, A. and T. Heinzl, *Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(23): p. 2807-16.
239. Lu, N.Z., S.E. Wardell, K.L. Burnstein, D. Defranco, P.J. Fuller, V. Giguere, R.B. Hochberg, L. McKay, J.M. Renoir, N.L. Weigel, E.M. Wilson, D.P. McDonnell, and J.A. Cidlowski, *International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(4): p. 782-97.
240. Reichardt, H.M. and G. Schutz, *Feedback control of glucocorticoid production is established during fetal development*. Mol Med, 1996. **2**(6): p. 735-44.
241. Bolt, R.J., M.M. van Weissenbruch, H.N. Lafeber, and H.A. Delemarre-van de Waal, *Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fetus and preterm infant*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2002. **15**(6): p. 759-69.
242. Mastorakos, G. and I. Ilias, *Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **997**: p. 136-49.
243. Tegethoff, M., C. Pryce, and G. Meinschmidt, *Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in humans: a systematic review*. Endocr Rev, 2009. **30**(7): p. 753-89.
244. Liggins, G.C., *The role of cortisol in preparing the fetus for birth*. Reprod Fertil Dev, 1994. **6**(2): p. 141-50.
245. Murphy, V.E., R. Smith, W.B. Giles, and V.L. Clifton, *Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus*. Endocr Rev, 2006. **27**(2): p. 141-69.
246. Bolt, R.J., M.M. van Weissenbruch, H.N. Lafeber, and H.A. Delemarre-van de Waal, *Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant*. Pediatr Pulmonol, 2001. **32**(1): p. 76-91.
247. Grier, D.G. and H.L. Halliday, *Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development*. Treat Respir Med, 2004. **3**(5): p. 295-306.
248. Garbrecht, M.R., J.M. Klein, T.J. Schmidt, and J.M. Snyder, *Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system*. Biol Neonate, 2006. **89**(2): p. 109-19.
249. McDevitt, T.M., L.W. Gonzales, R.C. Savani, and P.L. Ballard, *Role of endogenous TGF-beta in glucocorticoid-induced lung type II cell differentiation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(1): p. L249-57.
250. Postle, A.D., L.W. Gonzales, W. Bernhard, G.T. Clark, M.H. Godinez, R.I. Godinez, and P.L. Ballard, *Lipidomics of cellular and secreted phospholipids from differentiated human fetal type II alveolar epithelial cells*. J Lipid Res, 2006. **47**(6): p. 1322-31.

251. Muglia, L.J., L. Jacobson, S.C. Weninger, K.P. Karalis, K. Jeong, and J.A. Majzoub, *The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice*. *Peptides*, 2001. **22**(5): p. 725-31.
252. Cole, T.J., J.A. Blendy, A.P. Monaghan, W. Schmid, A. Aguzzi, and G. Schutz, *Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development*. *Steroids*, 1995. **60**(1): p. 93-6.
253. Cole, T.J., J.A. Blendy, A.P. Monaghan, K. Krieglstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker, and G. Schutz, *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. *Genes Dev*, 1995. **9**(13): p. 1608-21.
254. Brewer, J.A., S.K. Vogt, B.P. Sleckman, W. Swat, O. Kanagawa, and L.J. Muglia, *Knock-ins and conditional knockouts: in vivo analysis of glucocorticoid receptor regulation and function*. *Endocr Res*, 2002. **28**(4): p. 545-50.
255. Cole, T.J., N.M. Solomon, R. Van Driel, J.A. Monk, D. Bird, S.J. Richardson, R.J. Dilley, and S.B. Hooper, *Altered epithelial cell proportions in the fetal lung of glucocorticoid receptor null mice*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **30**(5): p. 613-9.
256. Liggins, G.C., *Adrenocortical-related maturational events in the fetus*. *Am J Obstet Gynecol*, 1976. **126**(7): p. 931-41.
257. Kaplan, F., J. Comber, R. Sladek, T.J. Hudson, L.J. Muglia, T. Macrae, S. Gagnon, M. Asada, J.A. Brewer, and N.B. Swezey, *The growth factor midkine is modulated by both glucocorticoid and retinoid in fetal lung development*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **28**(1): p. 33-41.
258. Bird, A.D., K.H. Tan, P.F. Olsson, M. Zieba, S.J. Flecknoe, D.R. Liddicoat, R. Mollard, S.B. Hooper, and T.J. Cole, *Identification of glucocorticoid-regulated genes that control cell proliferation during murine respiratory development*. *J Physiol*, 2007. **585**(Pt 1): p. 187-201.
259. Nemati, B., W. Atmodjo, S. Gagnon, D. Humes, C. McKerlie, F. Kaplan, and N.B. Swezey, *Glucocorticoid receptor disruption delays structural maturation in the lungs of newborn mice*. *Pediatr Pulmonol*, 2008. **43**(2): p. 125-33.
260. Gagnon, S., W. Atmodjo, D. Humes, C. McKerlie, F. Kaplan, and N.B. Swezey, *Transgenic glucocorticoid receptor expression driven by the SP-C promoter reduces neonatal lung cellularity and midkine expression in GRhypo mice*. *Biol Neonate*, 2006. **90**(1): p. 46-57.
261. Manwani, N., S. Gagnon, M. Post, S. Joza, L. Muglia, S. Cornejo, F. Kaplan, and N.B. Swezey, *Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **43**(5): p. 599-606.
262. Reichardt, H.M., K.H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, and G. Schutz, *DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival*. *Cell*, 1998. **93**(4): p. 531-41.
263. Garbrecht, M.R., J.M. Klein, T.A. McCarthy, T.J. Schmidt, Z.S. Krozowski, and J.M. Snyder, *11-Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human adult and fetal lung and its regulation by sex steroids*. *Pediatr Res*, 2007. **62**(1): p. 26-31.
264. Yang, Z., P. Zhu, C. Guo, X. Zhu, and K. Sun, *Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fetal lung and regulation of its expression by interleukin-1beta and cortisol*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(1): p. 306-13.

265. Thompson, A., V.K. Han, and K. Yang, *Differential expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 mRNA and glucocorticoid receptor protein during mouse embryonic development*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **88**(4-5): p. 367-75.
266. Hundertmark, S., A. Dill, H. Buhler, P. Stevens, K. Looman, V. Ragosch, J.R. Seckl, and C. Lipka, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a new regulator of fetal lung maturation*. Horm Metab Res, 2002. **34**(10): p. 537-44.
267. Hundertmark, S., A. Dill, A. Ebert, B. Zimmermann, Y.V. Kotelevtsev, J.J. Mullins, and J.R. Seckl, *Foetal lung maturation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice*. Horm Metab Res, 2002. **34**(10): p. 545-9.
268. Davies, E. and S.M. MacKenzie, *Extra-adrenal production of corticosteroids*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(7): p. 437-45.
269. Pazirandeh, A., Y. Xue, I. Rafter, J. Sjovall, M. Jondal, and S. Okret, *Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells*. Faseb J, 1999. **13**(8): p. 893-901.
270. Chen, Y., S. Qiao, J. Tuckermann, S. Okret, and M. Jondal, *Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis*. Faseb J, 2010. **24**(12): p. 5043-51.
271. Noti, M., D. Sidler, and T. Brunner, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean?* Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 237-48.
272. Zmijewski, M.A., R.K. Sharma, and A.T. Slominski, *Expression of molecular equivalent of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult retinal pigment epithelium*. J Endocrinol, 2007. **193**(1): p. 157-69.
273. Slominski, A., J. Wortsman, R.C. Tuckey, and R. Paus, *Differential expression of HPA axis homolog in the skin*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 143-9.
274. Provost, P.R. and Y. Tremblay, *Genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis are transiently expressed in the developing lung*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2239-45.
275. MacKenzie, S.M., R. Fraser, J.M. Connell, and E. Davies, *Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2002. **3**(4): p. 214-21.
276. Mariani, T.J., J.J. Reed, and S.D. Shapiro, *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. 541-8.
277. Bonner, A.E., W.J. Lemon, and M. You, *Gene expression signatures identify novel regulatory pathways during murine lung development: implications for lung tumorigenesis*. J Med Genet, 2003. **40**(6): p. 408-17.
278. Bonner, A.E., W.J. Lemon, T.R. Devereux, R.A. Lubet, and M. You, *Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas*. Oncogene, 2004. **23**(5): p. 1166-76.
279. Wade, K.C., S.H. Guttentag, L.W. Gonzales, K.L. Maschhoff, J. Gonzales, V. Kolla, S. Singhal, and P.L. Ballard, *Gene induction during differentiation of human pulmonary type II cells in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(6): p. 727-37.
280. Kobayashi, S., A. Isotani, N. Mise, M. Yamamoto, Y. Fujihara, K. Kaseda, T. Nakanishi, M. Ikawa, H. Hamada, K. Abe, and M. Okabe, *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. 166-72.
281. Dewing, P., T. Shi, S. Horvath, and E. Vilain, *Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation.* *Brain Res Mol Brain Res*, 2003. **118**(1-2): p. 82-90.
282. Nef, S., O. Schaad, N.R. Stallings, C.R. Cederroth, J.L. Pitetti, G. Schaer, S. Malki, M. Dubois-Dauphin, B. Boizet-Bonhoure, P. Descombes, K.L. Parker, and J.D. Vassalli, *Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development.* *Dev Biol*, 2005. **287**(2): p. 361-77.
283. Rinn, J.L., J.S. Rozowsky, I.J. Laurenzi, P.H. Petersen, K. Zou, W. Zhong, M. Gerstein, and M. Snyder, *Major molecular differences between mammalian sexes are involved in drug metabolism and renal function.* *Dev Cell*, 2004. **6**(6): p. 791-800.
284. Yang, X., E.E. Schadt, S. Wang, H. Wang, A.P. Arnold, L. Ingram-Drake, T.A. Drake, and A.J. Lusis, *Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice.* *Genome Res*, 2006. **16**(8): p. 995-1004.
285. 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.
286. Ballard, P.L., *Hormonal regulation of pulmonary surfactant.* *Endocr Rev*, 1989. **10**(2): p. 165-81.
287. NIH, *Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes.* *Jama*, 1995. **273**(5): p. 413-8.
288. Nielsen, H.C., A. Martin, M.V. Volpe, D. Hatzis, and R.J. Vosatka, *Growth factor control of growth and epithelial differentiation in embryonic lungs.* *Biochem Mol Med*, 1997. **60**(1): p. 38-48.
289. Whitsett, J.A., T.E. Weaver, M.A. Lieberman, J.C. Clark, and C. Daugherty, *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. 7908-13.
290. Chelly, N., A. Henrion, C. Pinteur, B. Chailley-Heu, and J.R. Bourbon, *Role of keratinocyte growth factor in the control of surfactant synthesis by fetal lung mesenchyme.* *Endocrinology*, 2001. **142**(5): p. 1814-9.
291. Torday, J.S. and S. Kourembanas, *Fetal rat lung fibroblasts produce a TGF beta homolog that blocks alveolar type II cell maturation.* *Dev Biol*, 1990. **139**(1): p. 35-41.
292. Whitsett, J.A., A. Budden, W.M. Hull, J.C. Clark, and M.A. O'Reilly, *Transforming growth factor-beta inhibits surfactant protein A expression in vitro.* *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1123**(3): p. 257-62.
293. Nielsen, H.C., C.K. Kellogg, and C.A. Doyle, *Development of fibroblast-type-II cell communications in fetal rabbit lung organ culture.* *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1175**(1): p. 95-9.
294. Bry, K., U. Lappalainen, and M. Hallman, *Cytokines and production of surfactant components.* *Semin Perinatol*, 1996. **20**(3): p. 194-205.

295. Torday, J.S., *Dihydrotestosterone inhibits fibroblast-pneumonocyte factor-mediated synthesis of saturated phosphatidylcholine by fetal rat lung cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **835**(1): p. 23-8.
296. Sultan, C., B.R. Migeon, S.W. Rothwell, M. Maes, N. Zerhouni, and C.J. Migeon, *Androgen receptors and metabolism in cultured human fetal fibroblasts*. *Pediatr Res*, 1980. **14**(1): p. 67-9.
297. Beaudoin, C., C.H. Blomquist, and Y. Tremblay, *Gene expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isozyme in primary cultures of human trophoblasts predicts different mechanisms regulating type 1 and type 2 enzymes*. *Endocrinology*, 1995. **136**(9): p. 3807-14.
298. Tremblay, Y., I. Tretjakoff, A. Peterson, T. Antakly, C.X. Zhang, and J. Drouin, *Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of a proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(23): p. 8890-4.
299. *Affymetrix* [cited; Available from: <http://www.affymetrix.com/support/>].
300. Mutch, D.M., A. Berger, R. Mansourian, A. Rytz, and M.A. Roberts, *The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data*. *BMC Bioinformatics*, 2002. **3**(1): p. 17.
301. Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski, *Genesis: cluster analysis of microarray data*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(1): p. 207-8.
302. Bartram, U. and C.P. Speer, *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease*. *Chest*, 2004. **125**(2): p. 754-65.
303. Wiley, L.M., E.D. Adamson, and E.C. Tsark, *Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development*. *Bioessays*, 1995. **17**(10): p. 839-46.
304. Schuller, A.G., J.W. van Neck, R.W. Beukenholdt, E.C. Zwarthoff, and S.L. Drop, *IGF, type I IGF receptor and IGF-binding protein mRNA expression in the developing mouse lung*. *J Mol Endocrinol*, 1995. **14**(3): p. 349-55.
305. Ballard, P.L., *The glucocorticoid domain in the lung and mechanisms of action*. In: *Contemporary Endocrinology: Endocrinology of the lung: Development and Surfactant Synthesis*, edited by Mendelson C. Totowa, NJ: Humana, 2000: p. 1-44.
306. *Gene Ontology Consortium*. [cited; Available from: <http://www.geneontology.org>]
307. Baron, S., M. Manin, C. Aigueperse, M. Berger, C. Jean, G. Veysiere, and L. Morel, *Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose reductase-like gene akr1b7 expression in Leydig cells*. *J Mol Endocrinol*, 2003. **31**(1): p. 71-81.
308. Stripp, B.R., S.D. Reynolds, I.M. Boe, J. Lund, J.H. Power, J.T. Coppens, V. Wong, P.R. Reynolds, and C.G. Plopper, *Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. **27**(2): p. 170-8.
309. Chang, A., P. Ramsay, B. Zhao, M. Park, S. Magdaleno, M.J. Reardon, S. Welty, and F.J. DeMayo, *Physiological regulation of uteroglobin/CCSP expression*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **923**: p. 181-92.
310. Hung, C.H., L.C. Chen, Z. Zhang, B. Chowdhury, W.L. Lee, B. Plunkett, C.H. Chen, A.C. Myers, and S.K. Huang, *Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(3): p. 664-70.

311. Singh, G., S.L. Katyal, W.E. Brown, and A.L. Kennedy, *Mouse Clara cell 10-kDa (CC10) protein: cDNA nucleotide sequence and molecular basis for the variation in progesterone binding of CC10 from different species*. *Exp Lung Res*, 1993. **19**(1): p. 67-75.
312. Episkopou, V., S. Maeda, S. Nishiguchi, K. Shimada, G.A. Gaitanaris, M.E. Gottesman, and E.J. Robertson, *Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(6): p. 2375-9.
313. Ross, S.A., P.J. McCaffery, U.C. Drager, and L.M. De Luca, *Retinoids in embryonal development*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(3): p. 1021-54.
314. Oshika, E., S. Liu, G. Singh, G.K. Michalopoulos, H. Shinozuka, and S.L. Katyal, *Antagonistic effects of dexamethasone and retinoic acid on rat lung morphogenesis*. *Pediatr Res*, 1998. **43**(3): p. 315-24.
315. Marshall, R.P., R.J. McAnulty, and G.J. Laurent, *Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type I receptor*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(6): p. 1999-2004.
316. LaRosa, J.C., R.I. Levy, P. Herbert, S.E. Lux, and D.S. Fredrickson, *A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970. **41**(1): p. 57-62.
317. Havel, R.J., C.J. Fielding, T. Olivecrona, V.G. Shore, P.E. Fielding, and T. Egelrud, *Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources*. *Biochemistry*, 1973. **12**(9): p. 1828-33.
318. Takada, D., Y. Ezura, S. Ono, Y. Iino, Y. Katayama, Y. Xin, L.L. Wu, S. Larringa-Shum, S.H. Stephenson, S.C. Hunt, P.N. Hopkins, and M. Emi, *Apolipoprotein H variant modifies plasma triglyceride phenotype in familial hypercholesterolemia: a molecular study in an eight-generation hyperlipidemic family*. *J Atheroscler Thromb*, 2003. **10**(2): p. 79-84.
319. Hamosh, M., M. Yeager, Jr., Y. Shechter, and P. Hamosh, *Lipoprotein lipase in rat lung. Effect of dexamethasone*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **431**(3): p. 519-25.
320. Marcel, Y.L. and R.S. Kiss, *Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations*. *Curr Opin Lipidol*, 2003. **14**(2): p. 151-7.
321. Martin-Campos, J.M., J.C. Escola-Gil, V. Ribas, and F. Blanco-Vaca, *Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility*. *Curr Opin Lipidol*, 2004. **15**(3): p. 247-53.
322. Moats-Staats, B.M., W.A. Price, L. Xu, H.W. Jarvis, and A.D. Stiles, *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.
323. Maitre, B., A. Clement, M.C. Williams, and J.S. Brody, *Expression of insulin-like growth factor receptors 1 and 2 in the developing lung and their relation to epithelial cell differentiation*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. **13**(3): p. 262-70.
324. Leu, J.I., M.A. Crissey, and R. Taub, *Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(1): p. 129-39.

325. Whitsett, J.A., *Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair*. J Clin Invest, 2002. **109**(5): p. 565-9.
326. Simard, M., J. Plante, M. Boucher, P.R. Provost, and Y. Tremblay, *Type 2 and 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and androgen receptor in human fetal lungs*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **319**(1-2): p. 79-87.
327. Roberts, D. and S. Dalziel, *Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth*. Cochrane Database Syst Rev, 2006. **3**: p. CD004454.
328. Adamson, I.Y., J. Bakowska, E. McMillan, and G.M. King, *Accelerated fetal lung maturation by estrogen is associated with an epithelial-fibroblast interaction*. In Vitro Cell Dev Biol, 1990. **26**(8): p. 784-90.
329. Levesque, B.M., R.J. Vosatka, and H.C. Nielsen, *Dihydrotestosterone stimulates branching morphogenesis, cell proliferation, and programmed cell death in mouse embryonic lung explants*. Pediatr Res, 2000. **47**(4 Pt 1): p. 481-91.
330. Kimura, Y., T. Suzuki, C. Kaneko, A.D. Darnel, J. Akahira, M. Ebina, T. Nukiwa, and H. Sasano, *Expression of androgen receptor and 5alpha-reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible correlation with branching morphogenesis*. Clin Sci (Lond), 2003. **105**(6): p. 709-13.
331. Giannopoulos, G. and S.K. Smith, *Androgen receptors in fetal rabbit lung and the effect of fetal sex on the levels of circulating hormones and pulmonary hormone receptors*. J Steroid Biochem, 1982. **17**(5): p. 461-5.
332. Simard, M., E. Boucher, P.R. Provost, and Y. Tremblay, *Minimization of PCR efficiency differences between standards and samples through dilution of PCR amplicons in reverse transcription buffer*. Anal Biochem, 2007. **362**(1): p. 142-4.
333. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
334. Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, and J. Vandesompele, *qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data*. Genome Biol, 2007. **8**(2): p. R19.
335. Schlichenmaier, H., M. Steffl, F. Sinowatz, and W.M. Amselgruber, *Expression of cytokeratin 18 during pre- and post-natal porcine lung development*. Anat Histol Embryol, 2002. **31**(5): p. 273-7.
336. Kumar, V.H., S. Lakshminrusimha, M.T. El Abiad, P.R. Chess, and R.M. Ryan, *Growth factors in lung development*. Adv Clin Chem, 2005. **40**: p. 261-316.
337. Torday, J.S., *The sex difference in type II cell surfactant synthesis originates in the fibroblast in vitro*. Exp Lung Res, 1984. **7**(3-4): p. 187-94.
338. Minoo, P., L. Hu, Y. Xing, N.L. Zhu, H. Chen, M. Li, Z. Borok, and C. Li, *Physical and functional interactions between homeodomain NKX2.1 and winged helix/forkhead FOXA1 in lung epithelial cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2155-65.
339. Simard, M., M. Cote, P.R. Provost, and Y. Tremblay, *Expression of genes related to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in murine fetal lungs in late gestation*. Reprod Biol Endocrinol, 2010. **8**: p. 134.

340. Majzoub, J., *Corticotropin-releasing hormone physiology*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**: p. S71-S76.
341. Bicknell, A.B., *The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(6): p. 692-9.
342. Fowden, A.L. and A.J. Forhead, *Endocrine regulation of feto-placental growth*. Horm Res, 2009. **72**(5): p. 257-65.
343. Keegan, C.E., J.P. Herman, I.J. Karolyi, K.S. O'Shea, S.A. Camper, and A.F. Seasholtz, *Differential expression of corticotropin-releasing hormone in developing mouse embryos and adult brain*. Endocrinology, 1994. **134**(6): p. 2547-55.
344. Dotzler, S.A., R.J. Digeronimo, B.A. Yoder, and T.M. Siler-Khodr, *Distribution of corticotropin releasing hormone in the fetus, newborn, juvenile, and adult baboon*. Pediatr Res, 2004. **55**(1): p. 120-5.
345. Wood, C.E., D. Barkoe, A. The, H. Newman, T.A. Cudd, S. Purinton, and M.I. Castro, *Fetal pulmonary immunoreactive adrenocorticotropin: molecular weight and cellular localization*. Regul Pept, 1998. **73**(3): p. 191-6.
346. Emanuel, R.L., J.S. Torday, N. Asokanathan, and M.E. Sunday, *Direct effects of corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone on fetal lung explants*. Peptides, 2000. **21**(12): p. 1819-29.
347. Nimura, M., J. Udagawa, T. Hatta, R. Hashimoto, and H. Otani, *Spatial and temporal patterns of expression of melanocortin type 2 and 5 receptors in the fetal mouse tissues and organs*. Anat Embryol (Berl), 2006. **211**(2): p. 109-17.
348. Boorse, G.C. and R.J. Denver, *Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides*. Gen Comp Endocrinol, 2006. **146**(1): p. 9-18.
349. Batanero, E., F.E. de Leeuw, G.H. Jansen, D.F. van Wichen, J. Huber, and H.J. Schuurman, *The neural and neuro-endocrine component of the human thymus. II. Hormone immunoreactivity*. Brain Behav Immun, 1992. **6**(3): p. 249-64.
350. Aird, F., C.V. Clevenger, M.B. Prystowsky, and E. Redei, *Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7104-8.
351. Buckingham, S. and M.E. Avery, *Time of appearance of lung surfactant in the foetal mouse*. Nature, 1962. **193**: p. 688-9.
352. Oldenborg, V. and L.M. Van Golde, *The enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis in the fetal mouse lung. Effects of dexamethasone*. Biochim Biophys Acta, 1977. **489**(3): p. 454-65.
353. Brehier, A. and S.A. Rooney, *Phosphatidylcholine synthesis and glycogen depletion in fetal mouse lung: developmental changes and the effects of dexamethasone*. Exp Lung Res, 1981. **2**(4): p. 273-87.
354. Bresson, E., T. Seaborn, M. Cote, G. Cormier, P.R. Provost, B. Piedboeuf, and Y. Tremblay, *Gene expression profile of androgen modulated genes in the murine fetal developing lung*. Reprod Biol Endocrinol, 2010. **8**: p. 2.
355. Plante, J., M. Simard, P. Rantakari, M. Cote, P.R. Provost, M. Poutanen, and Y. Tremblay, *Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **117**(4-5): p. 139-45.

356. Pelletier, G., R. Leclerc, F. Labrie, J. Cote, M. Chretien, and M. Lis, *Immunohistochemical localization of beta-lipotropic hormone in the pituitary gland*. *Endocrinology*, 1977. **100**(3): p. 770-6.
357. Westphal, N.J. and A.F. Seasholtz, *CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 1878-91.
358. Hinkle, P.M. and J.A. Sebag, *Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP)*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **300**(1-2): p. 25-31.
359. Drouin, J., M. Nemer, J. Charron, J.P. Gagner, L. Jeannotte, Y.L. Sun, M. Therrien, and Y. Tremblay, *Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids*. *Genome*, 1989. **31**(2): p. 510-9.
360. Miller, W.L., *Molecular biology of steroid hormone synthesis*. *Endocr Rev*, 1988. **9**(3): p. 295-318.
361. Stocco, D.M. and B.J. Clark, *Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells*. *Endocr Rev*, 1996. **17**(3): p. 221-44.
362. Torday, J.S., B.T. Smith, and C.J. Giroud, *The rabbit fetal lung as a glucocorticoid target tissue*. *Endocrinology*, 1975. **96**(6): p. 1462-7.
363. Torday, J.S., E.B. Olson, Jr., and N.L. First, *Production of cortisol from cortisone by the isolated, perfused fetal rabbit lung*. *Steroids*, 1976. **27**(6): p. 869-80.
364. Torday, J.S., M. Post, and B.T. Smith, *Compartmentalization of 11-oxidoreductase within fetal lung alveolus*. *Am J Physiol*, 1985. **249**(1 Pt 1): p. C173-6.
365. O'Shaughnessy, P.J., L.M. Fleming, G. Jackson, U. Hochgeschwender, P. Reed, and P.J. Baker, *Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis*. *Endocrinology*, 2003. **144**(8): p. 3279-84.
366. Hellal-Levy, C., B. Couette, J. Fagart, A. Souque, C. Gomez-Sanchez, and M. Rafestin-Oblin, *Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors*. *FEBS Lett*, 1999. **464**(1-2): p. 9-13.
367. Boucher, E., A. Devillers, P.R. Provost, and Y. Tremblay, *Glucocorticoid synthesis pathways in pre- and post-natal lungs [abstract]* *Endocr Rev*, 2010. **31**(3 (Supplement 1)): p. S1732.
368. Quinkler, M., B. Meyer, C. Bumke-Vogt, C. Grossmann, U. Gruber, W. Oelkers, S. Diederich, and V. Bahr, *Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor*. *Eur J Endocrinol*, 2002. **146**(6): p. 789-99.
369. Swezey, N.B., F. Ghibu, S. Gagnon, E. Schotman, and Q. Hamid, *Glucocorticoid receptor mRNA and protein in fetal rat lung in vivo: modulation by glucocorticoid and androgen*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(1 Pt 1): p. L103-9.
370. Speert, D.B., M.C. SJ, and A.F. Seasholtz, *Sexually dimorphic expression of corticotropin-releasing hormone-binding protein in the mouse pituitary*. *Endocrinology*, 2002. **143**(12): p. 4730-41.
371. Nillni, E.A., *Regulation of prohormone convertases in hypothalamic neurons: implications for prothyrotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin*. *Endocrinology*, 2007. **148**(9): p. 4191-200.
372. Seidah, N.G., S. Benjannet, J. Hamelin, A.M. Mamarbachi, A. Basak, J. Marcinkiewicz, M. Mbikay, M. Chretien, and M. Marcinkiewicz, *The*

- subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1.* Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 57-74.
373. Provost, P.R., E. Boucher, and Y. Tremblay, *Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids.* J Endocrinol, 2009. **200**(3): p. 321-30.
374. Cote, M., P.R. Provost, M.C. Gerard-Hudon, and Y. Tremblay, *Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase show a temporal and geographic correlation with surfactant lipid synthesis in preparation for birth.* BMC Dev Biol, 2010. **10**: p. 111.
375. Provost, P.R. and Y. Tremblay, *Elevated expression of four apolipoprotein genes during the 32-35 week gestation window in the human developing lung.* Early Hum Dev, 2010. **86**(9): p. 529-34.
376. Goyal, R., A. Leitzke, D. Goyal, C.P. Gheorghe, and L.D. Longo, *Antenatal maternal hypoxic stress: adaptations in fetal lung Renin-Angiotensin system.* Reprod Sci, 2011. **18**(2): p. 180-9.
377. Kho, A.T., S. Bhattacharya, B.H. Mecham, J. Hong, I.S. Kohane, and T.J. Mariani, *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.
378. Du, R., K. Tantisira, V. Carey, S. Bhattacharya, S. Metje, A.T. Kho, B.J. Klanderman, R. Gaedigk, R. Lazarus, T.J. Mariani, J.S. Leeder, and S.T. Weiss, *Platform dependence of inference on gene-wise and gene-set involvement in human lung development.* BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 189.
379. Kho, A.T., S. Bhattacharya, K.G. Tantisira, V.J. Carey, R. Gaedigk, J.S. Leeder, I.S. Kohane, S.T. Weiss, and T.J. Mariani, *Transcriptomic analysis of human lung development.* Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(1): p. 54-63.
380. Kauffmann, F., *Sex differences in human lung development.* Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(5): p. 523.
381. Mikkonen, L., P. Pihlajamaa, B. Sahu, F.P. Zhang, and O.A. Janne, *Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **317**(1-2): p. 14-24.
382. Boucher, E., P.R. Provost, J. Plante, and Y. Tremblay, *Androgen receptor and 17beta-HSD type 2 regulation in neonatal mouse lung development.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **311**(1-2): p. 109-19.
383. Burnstein, K.L., C.A. Maiorino, J.L. Dai, and D.J. Cameron, *Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression.* Mol Cell Endocrinol, 1995. **115**(2): p. 177-86.
384. Dammann, C.E., S.M. Ramadurai, D.D. McCants, L.D. Pham, and H.C. Nielsen, *Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development.* Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2923-9.
385. Jansson, A., L. Delander, C. Gunnarsson, T. Fornander, L. Skoog, B. Nordenskjold, and O. Stal, *Ratio of 17HSD1 to 17HSD2 protein expression predicts the outcome of tamoxifen treatment in postmenopausal breast cancer patients.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(10): p. 3610-6.

7.2. Annexe 1

Cette annexe présente un article de synthèse intitulé « **Sex hormone metabolism in lung development and maturation** » qui a été publié dans le journal *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2010 Dec;21(12):729-38.

Je suis co-premier auteur de cet article qui présente un état des connaissances et une discussion sur le métabolisme des hormones sexuelles dans le poumon fœtal. Il a été inséré en annexe puisque certains résultats qui y sont présentés font partie de la présente thèse, dont il en représente toutefois un complément plus que pertinent.

Sex hormone metabolism in lung development and maturation

Tommy Seaborn^{1,3,*}, Marc Simard^{1,3,*}, Pierre R. Provost^{1,2,3}, Bruno Piedboeuf⁴ and Yves Tremblay^{1,2,3}

¹ Laboratory of Ontogeny and Reproduction

² Department of Obstetrics and Gynaecology

³ Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR)

⁴ Pediatric Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ), Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Québec, Canada

**Those authors contributed equally to this review and should both be considered as first authors.*

Abstract

Sex hormones are increasingly recognized as regulators of lung development. Respiratory distress syndrome (RDS) is the leading cause of morbidity in preterm neonates and occurs with a higher incidence in males. The mechanisms underlying the effects of androgens on lung development and the occurrence of RDS are only partially deciphered, and positive roles of estrogens on surfactant production and alveologenesis are relevant to our understanding of pulmonary diseases. This manuscript reviews current knowledge on androgen and estrogen metabolism and on relevant hormone targets in the fetal lung. Further investigations are needed to elucidate mechanisms orchestrating sex hormone effects on lung development. These studies aim to decrease mortality and morbidity associated with RDS and other pathologies related to lung immaturity at birth.

Prematurity and sex hormone effects on fetal lung development

Preterm birth is defined as a birth occurring at less than 37 weeks of gestation [1]. In the United States, approximately 10% of pregnancies end prematurely [2]. Among conditions affecting preterm infants, respiratory distress syndrome (RDS) is the most acute medical concern and is the leading cause of morbidity [1] that can include bronchopulmonary dysplasia (BPD) [3] and long-term neurological and developmental disabilities [4]. RDS mainly results from surfactant production deficiency related to incomplete fetal lung maturation at birth [5]. Indeed, the degree of prematurity is the greatest risk factor for RDS [1]. RDS could also arise from defective lung fluid clearance as a result of immature expression of epithelial sodium channel (ENaC) [6].

A higher incidence of RDS was reported in male versus female preterm neonates (1.7:1) more than thirty years ago [7]. Although surfactant therapy has been successful in decreasing the mortality rate of RDS in both sexes, male neonates affected by RDS continue to show a higher incidence of morbidity [2]. This makes sense because androgens play a crucial role in lung development. Indeed, the use of exogenous androgen and/or anti-androgen with human lung explants and animal models reveals that androgens delay the surge of surfactant lipid production (Box 1). In addition, the amniotic fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin ratio, an indicator of lung maturity, is increased in fetal males of the androgen receptor (AR)-defective (Tfm) mouse, suggesting that the effects of androgens on lung maturation take place through an AR-dependent mechanism [8].

Estrogen receptors (ER) are expressed in the fetal lung of several species, and estrogens have stimulatory effects on lung maturation as opposed to the inhibitory effects of androgens (for review, see [9] and references therein) (Box 1). Estrogens modulate alveologenesis by signaling through ER α and ER β [10], [11] and [12], whereas estradiol and progesterone together enhance expression of VEGF (Glossary) and surfactant proteins (SP)-B and -C in primary cultures of fetal lung cells [13]. Indeed, the male developing piglet lung shows lower VEGF and SP-B mRNA levels compared to female, and deprivation of both estradiol and progesterone abolishes this sex difference and is associated with diminished alveolarization, especially in males [14] and [15]. Interestingly,

a clinical trial of estradiol and progesterone replacement therapy in 83 extremely preterm infants (<29 weeks of gestation and <1000 g birth weight) showed a trend toward prevention of BPD or death; however, a larger better-powered study is needed to reliably determine the effect of this hormone replacement therapy [16].

The aforementioned clinical and experimental demonstrations of the important regulatory effects of sex hormones on fetal lung maturation and development raise questions of whether local metabolism of sex hormones takes place, how this is regulated, and how it influences lung development. Another question concerns how sex hormones regulate lung development. The importance of sex hormones in the fetal lung is increasingly recognized [17], and this review aims to synthesize and integrate biomedical evidence regarding *in situ* sex hormone metabolism (synthesis and inactivation) and targets in the developing fetal lung. Notably, several of the enzymes reviewed below can use both androgens and estrogens as substrates. Furthermore, some potential clinical implications of sex hormone metabolism and action on lung pathologies associated with prematurity are discussed.

Sex hormone metabolism and targets in the fetal lung

Steroid hormone metabolism occurs in several adult and fetal non-endocrine peripheral tissues including brain, endometrium, adipose tissue and skin. In these tissues sex steroid hormone receptor occupancy can be regulated by conversion of circulating steroid precursors into biologically active steroids and by conversion of estrogens and androgens into less active or inactive steroids – the fetal lung is also exposed to circulating sex hormones (Box 2 and Figure 1).

Pioneering studies have demonstrated the presence of steroidogenic activities in fetal and adult lung tissues as well as in pulmonary cell lines [18]; more recent studies revealed the existence of complex steroid dehydrogenase enzymology within the lung [19] and [20]. The fetal lung is unlikely to be able to catalyze *de novo* synthesis of androgens and estrogens from cholesterol because human fetal lung at 15–19 weeks of gestation [21] does not express CYP17 which encodes the enzyme that catalyzes the formation of C19 steroids from pregnenolone and progesterone; Cyp17 expression is detectable in fetal mouse lung

but at extremely low levels [22]. Instead, there is a growing body of evidence for the involvement of other steroidogenic enzymes modulating the level of estrogenic and androgenic influence in the fetal lung. A summary of the reported data is presented in Table 1 and the corresponding enzymatic pathways are illustrated in Figure 2.

Synthesis of biologically active steroid hormones in the fetal lung

Several enzymes, including 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) [23] and [24], 5 α -reductases [25], and 3 β -HSDs [26] and [27], act on the immediate precursors of testosterone (androstenediol and androstenedione) and/or 5 α -DHT (5 α -androstenedione and testosterone), the biologically active androgens (Figure 2).

Expression of 17 β -HSD type 5 and its enzymatic activity in the type II pneumonocyte (PTII)-like cell line A549 [28], and expression of the mouse [29] and human [30] enzymes in fetal lungs, suggest that biologically active androgens are produced locally. Interestingly, a peak of 17 β -HSD type 5 expression is detected on gestational day (GD) 17.5 in fetal mouse lungs of both sexes [29], coinciding with the surge of surfactant synthesis in mature PTII cells. It was suggested that androgens could be produced from 17 β -HSD type 5 after the emergence of mature PTII cells to downregulate the process of cell maturation. In human fetal lung tissues at mid-gestation 17 β -HSD type 5 is localized in a small subset of epithelial cells in proximal airways, but in only a few cells of the distal epithelium where PTII cells develop [30]. The spatiotemporal expression pattern of 17 β -HSD type 5 in late gestation, however, remains to be defined.

Other 17 β -HSDs involved in androgen synthesis have been investigated in the developing lung. In contrast to the human isoform, the murine isoform of 17 β -HSD type 1 catalyzes not only the formation of estradiol but also that of testosterone. This isoform is detected in fetal mouse lung in late gestation and follows the expression pattern of AR during alveolarization [31]. In mice, the relative concentrations of substrates available to 17 β -HSD type 1-expressing cells would influence the nature of the active sex hormone produced in lung and are likely to vary according to cell type and/or gestational period. In human, 17 β -HSD type 1 could be involved in local estradiol production, in addition to aromatase and 17 β -HSD type 7. 17 β -HSD type 3, which is considered to be testis-specific, is barely

detectable in fetal mouse lung [29] suggesting that the role of this enzyme in fetal lung development is restricted to testosterone production by the testis.

In the steroidogenic pathways leading to androgen production, type 1 and 2 5 α -reductases catalyze conversion of testosterone into 5 α -DHT, the most biologically potent androgen, which exerts intracrine effects (i.e. the effects take place in the 5 α -DHT-producing cells). Type 1 5 α -reductase mRNA is present in A549 cells, in several human lung fibroblast cell lines [32], in human fetal lung early in pregnancy (13–16 weeks) [33], and in mouse fetal lung [31] and [34]. Type 2 5 α -reductase mRNA is detected neither in A549 nor in lung fibroblasts cell lines [32] and, despite the fact that the mRNA is present in human fetal lung, the protein is undetectable [33]. Although 5 α -reductase activity has not been investigated yet *in vivo*, its presence has been demonstrated in A549 [28] and lung fibroblast [32] cell lines. Further, the steroidogenic activities determined in A549 cells (Table 1) suggest a paracrine androgenic action principally through testosterone secretion and an intracrine androgenic action of testosterone and 5 α -DHT, the latter being mostly inactivated through 3 α -HSD activity before secretion [28]. However, 5 α -reductase activity in pulmonary fibroblast cell lines shows a marked substrate preference for androstenedione, with no formation of 5 α -DHT [28], and therefore participates in androgen inactivation rather than activation. Whether these results reflect the *in vivo* physiological situations remains to be demonstrated. The 5 α -reductase type 1 protein is localized in epithelial cells of the human fetal lung [33], and there is a stimulating effect of exogenous 5 α -DHT on branching morphogenesis during early mouse gestation [35]. Nevertheless, the direct implication of 5 α -reductase in branching morphogenesis remains to be demonstrated.

Steroidogenic reactions leading to androgen synthesis also include 3 β -HSDs. Reactions catalyzed by 3 β -HSDs include conversion of androstenediol into testosterone and 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol into 5 α -DHT. In human, type 1 3 β -HSD mRNA is detected at low levels in fetal lung, whereas type 2 3 β -HSD mRNA is undetectable [21]. In mouse, six 3 β -HSD isoforms are known. A sex difference in the temporal occurrence of a narrow peak of type 1 3 β -HSD mRNA expression is suggested in fetal lung on GD15 [22]. This possible delayed expression between sexes remains to be precisely characterized. However,

considering the absence of dehydroepiandrosterone (DHEA) and androstenediol in the mouse circulation [36] and [37], the murine type 1 3β -HSD could be involved in glucocorticoid rather than androgen synthesis, thus underlining a potential difference between species in fetal lung androgen steroidogenesis.

Androgen activation via oxidative 3α -HSD activity was also demonstrated in human prostate (i.e. conversion of 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol into 5α -DHT). Several enzymes have been proposed to catalyze this reaction based on in vitro enzymatic assays [38]. In the fetal lung, the genes encoding for two of these enzymes, namely, retinol dehydrogenase RoDH-like 3α -HSD (RL- 3α -HSD) and 11-cis-retinol dehydrogenase (RoDH5), are expressed [39]. However, to date, no information links these enzymes to fetal lung maturation.

In contrast to androgens, estrogens are not involved in the sex difference in the surge of surfactant synthesis, and therefore have been less studied during the fetal period of lung development. However, estrogens have effects on lung development in both sexes (Box 1). Estrogens are synthesized from C19 steroid precursors by the cytochrome P450 aromatase. More precisely, aromatase catalyzes estrone and estradiol formation from androstenedione and testosterone, respectively, potentially affecting the balance between testosterone and estradiol levels. Its transcript is detected in low abundance in human fetal lung [21]. Potentiation of the estrogenic activity of estrone can be achieved through its conversion to estradiol by some 17β -HSDs and, of these, type 1 and 7 17β -HSDs are expressed in the fetal lung. In summary, there is expression in the developing lung of several enzymes that convert circulating steroid precursors into biologically active sex hormones, suggesting a local contribution to intrapulmonary levels of active hormones and an involvement in the modulation of androgenic and estrogenic effects in the developing lung.

Sex hormone inactivation in the fetal lung

The inactivation of testosterone and/or 5α -DHT can occur through several enzymes, including 17β -HSDs and 3α -HSDs [38], [40] and [41] (Figure 2). Type 2 17β -HSD has the ability to transform testosterone into androstenedione, 5α -DHT into 5α -androstenedione, and estradiol into estrone. Its mRNA is detected in fetal lung of both mouse [29] and

human [30] and [42]. Furthermore, type 2 17 β -HSD protein and mRNA colocalize with AR in epithelial cells and to a lesser extent in mesenchymal cells of mouse [43] and human [30] fetal lungs. This expression pattern is compatible with this enzyme's role in controlling active androgen levels. In addition, type 2 17 β -HSD mRNA levels correlate with type 2 17 β -HSD enzymatic activity in almost all human fibroblast cell lines tested [32]. Another potentially important enzyme in androgen inactivation is type 7 17 β -HSD which can transform 5 α -DHT into 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol or 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol. This enzyme is expressed in human adult and fetal lungs [44] and [45]. Another enzyme, type 4 17 β -HSD, can convert androstenediol into DHEA, and estradiol into estrone, and its mRNA is present in A549 cells [28]. An *in vivo* role for type 4 17 β -HSD in lung development needs to be determined, but this enzyme could be involved in the negative regulation of estradiol levels, as well as in fatty acid metabolism, and is expressed in the bronchial epithelium of human adult lung [46].

Conversion of 5 α -DHT into 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol takes place through 3 α -HSD activity. Type 1 is considered to be liver-specific, whereas type 3 is expressed in several adult tissues, including lung, prostate, brain, and adipose tissue. Two 3 α -HSD isoforms are reported in human but only one 3 α -HSD has been identified in mouse; 3 α -HSD activity from the type 3 is detected in A549 cells [28]. Interestingly, the fetal mouse lung shows a strong increase in m3 α -HSD mRNA levels from GD16.5 to GD18.5 in both sexes and m3 α -HSD mRNA levels were therefore proposed as a marker of lung maturity [34]. This last result suggests a more stringent control of androgenic pressure within the lung during this period.

Inactivation of androgens can also take place through conjugating activities such as glucuronidation, and this was postulated to play an important role in the modulation of active steroid levels in human androgen-sensitive tissues [47]. Moreover, sulfation could be involved in sex hormone inactivation in the fetal lung because hydroxysteroid sulfotransferase is present in this tissue [48]. Such conjugating activities potentially represent supplemental and yet unexplored control mechanisms of sex hormone levels within fetal lung.

Sex hormone targets in the fetal lung

One possible cause of RDS is functional immaturity of the epithelial sodium channel (ENaC) at birth [49] and [50]. As fetal lung development progresses, sodium absorption increases whereas epithelial chloride secretion diminishes – changes that are involved in near-term lung fluid clearance in preparation for gas exchange. The activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (a chloride channel in the lung) is increased by androgen and decreased by estrogen [51]. Therefore, intra-pulmonary fluid regulation is also regulated to some extent by sex hormones.

In mouse [43] and human [30] and [33] fetal lungs AR is expressed in epithelial cells and, to a lesser extent, in fibroblasts. Androgen-target genes in the lung include those contributing to the delay in the surge of surfactant production in males compared to females, some such genes have already been identified. Antenatal administration of 5 α -DHT reduces pulmonary levels of glucocorticoid receptor mRNA and protein, consistent with the androgen-induced delay of antenatal lung maturation, a process that is positively regulated by glucocorticoids [52]. Chronic exposure of pregnant mice to 5 α -DHT decreases surfactant protein B and C mRNAs in male and female fetal lungs [53]. As noted in Box 1, signaling by the epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor (TGF)- β receptors is involved in the control of lung maturation, and both are affected by exposure to 5 α -DHT in mouse fetal lung. A gene expression profiling study on fetal mouse lung revealed that 1597 genes at GD17, and 1775 genes at GD18, are modulated by the antiandrogen flutamide in male fetal lung [54]. Several genes related to hormones, pulmonary development, surfactant synthesis including lipid processing, and AR signaling are modulated by sex and/or by antiandrogen treatment. These microarray results suggest that males present a delay in the activation of pathways promoting late lung development when compared to females which are more advanced in their lung maturation. Interestingly, androgen treatment of adult mice also significantly affects lung gene expression profiles [55], further demonstrating the regulatory roles of androgens in the lung.

Several genes potentially controlled by the AR present a sex difference in fetal mouse lung expression during a period overlapping the surge of surfactant production [54] and [56]. These include genes involved in hormone metabolism and regulation, apoptosis, signal transduction, transcriptional regulation, and lipid metabolism. Interestingly, the genes encoding apolipoprotein A-I (ApoA-I), ApoA-II, ApoC-II, and ApoH are coregulated between GD15.5 and GD18.5 along with type 2 and 5 17 β -HSD genes [57], but by as yet unknown factor(s). This is significant because the surge of surfactant production occurs on GD17.5. Furthermore, apoC-II protein, the essential co-factor of lipoprotein lipase, is detectable on GD17.5 in secretory granule-like structures near the basal membrane of epithelial cells of the distal epithelium [57].

Potential non-genomic effects of sex hormones [58] have not yet been studied in the developing lung but could also be part of the mechanisms governing lung development and maturation. For instance, among the steroid-binding globulins and their associated receptors inducing rapid steroid effects [59], the androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin is expressed in fetal rat lung. This aspect represents an interesting avenue of research in the study of androgen and estrogen signaling and interactions within the developing lung.

Involvement of sex hormones in fetal lung development – an integrative view

This review focuses on sex hormone metabolism and the latest findings related to the impact of androgens and estrogens on lung development. Indeed, the link between androgens and the higher prevalence of mortality and morbidity associated with fetal lung immaturity in the preterm male neonate urges further investigation of the mechanisms involved in the regulation of sex hormone levels and action in the fetal lung. Moreover, elucidation of the precise mechanisms by which estrogens exert their stimulatory effects on lung maturation could provide valuable insights for the development of pharmacological tools potentially helpful for the treatment of pathologies linked to lung immaturity.

Recent work has shed new light on sex hormone metabolism in the fetal lung. A significant advance emerging from these studies concerns the demonstration that sex hormone synthesis and inactivation take place in the developing lungs of both males and females. Thus, the fetal lung is not exclusively and passively exposed to circulating sex hormones but also has the capability to synthesize and inactivate them, and hence to modulate their action. Consequently, the prevailing explanations for the androgen-induced delay in lung maturation observed in males have to be improved by including this crucial concept.

An intuitive way of integrating this knowledge in the context of the sex difference in lung maturation is to hypothesize that the activity of the enzymes involved in the metabolism of active androgens in fetal lung is sexually dimorphic. However, none of the studies reviewed here has provided any evidence of such dimorphism. Nonetheless, the temporal expression patterns of some steroidogenic enzyme genes were suggested to be sex-specific [22] and [29], but this hypothesis remains to be confirmed.

The expression and activity of androgen-metabolizing enzymes in fetal lung of both sexes suggest a physiological role for androgens in lung development in addition to their deleterious effects on lung maturation in cases of preterm birth. Integration of the growing knowledge implies a dual role for androgens in lung development: first, as positive regulators in early branching morphogenesis [35] and late lung maturation [29] in both sexes, involving circulating and/or locally metabolized androgens, and second, as negative regulators responsible for the observed delay in male lung maturation. In addition, androgen regulation could be coupled with direct and/or indirect effects of estrogens and/or glucocorticoids to modulate the regulation of multiple regulatory proteins such as EGF and/or TGF- β and their regulatory pathways.

The diverse roles of estrogens in lung development are highlighted by reported positive effects of these hormones on surfactant production during fetal development [9] and by implication in alveologenesis during the neonatal and pubertal periods [11] and [12]. Effects on alveologenesis involve complex signaling as demonstrated by the different phenotypes observed in ER α - and ER β -null mutant mice [11] and [12]. These latter models

established that the sex dimorphism observed in rodent alveologenesis (smaller alveoli and, per body mass, more alveoli and alveolar surface area in females than in males) is estrogen-related. Estrogen receptors have a smaller effect on lung volume and alveolar dimensions in male than in female mice. Both ER α and ER β are required for the developmental formation of a full complement of alveoli in female mice and they regulate alveolar size and number in a nonredundant manner. For instance, the absence of ER β leads to a greater decrease in the number of alveoli than the absence of ER α and also diminishes lung elastic tissue recoil in female mice [12]. Furthermore, ER β is necessary for the maintenance of the extracellular matrix composition and its loss leads to abnormal lung structure and systemic hypoxia in both male and female mice later in adulthood [10]. During the fetal period, estrogenic effects could be perceived as antagonistic to those of androgens. Also, because both sex hormones are involved in the determination of lung architecture, a balance in their levels must probably be maintained to ensure proper lung maturation and development.

As suggested in the literature, androgens could act as epigenetic regulators of male fetal lung maturation [35]. Indeed, DNA methylation profiles of upregulated or downregulated genes in human fetal lung compared to adult lung suggest their epigenetic regulation [60]. Interestingly, one of these genes, fibrillin 2, which is expressed at higher levels in fetal than adult lung, showed a hypermethylation profile in the latter and is modulated by flutamide treatment in the male fetal lung [54]. Mechanistically, gonadal differentiation occurring earlier than lung maturation results in masculinization of the male fetus and secretion of testosterone in the fetal circulation. In human, a peak in plasma testosterone level occurs several weeks before lung maturation. This peak could induce epigenetic regulation, which in turn could modulate gene expression in the developing male lung. This interesting question remains to be explored.

Some aspects of lung development need further investigation to incorporate knowledge of sex hormone metabolism and action. Potential roles of sex hormones in global and structural pulmonary developmental events, such as parenchymal thinning and alveolar septation, need to be explored because these developmental processes are crucial in cases of extreme prematurity and are influenced by glucocorticoids [61]. Indeed, elucidating the

mechanisms of sex hormone action on glucocorticoid metabolism, signaling, and function will be useful to potentiate maternal corticosteroid antenatal therapy and/or in utero activity of endogenous glucocorticoids. Moreover, the existence of cases of fetal unresponsiveness to antenatal glucocorticoids [61] stresses the need to further document these avenues. In addition, future development of lung cell-specific and inducible knock-out mice for sex steroid receptors would help to elucidate sex hormone effects and interactions during lung development. Growing knowledge arising from global gene expression profiling in the developing lung will also be of great interest in understanding the effects of sex hormones [62] and [63]. Moreover, tissue- and cell-specific expression of steroid receptor coregulators adds to the complexity of sex hormone responsiveness [64] and could contribute to the observed sex differences in lung development.

Such knowledge is expected to result in complementary and/or novel clinical avenues for treatment of pathologies associated with premature birth (Box 3). More specifically, abolishing the difference in the prognosis between preterm males and females is of great interest and turns out to be more intricate than initially expected. Studying the involvement of sex hormones in lung development will ultimately help to reduce the higher mortality and morbidity rates associated with RDS in males and improve the prognosis for both sexes. Ultimately, such research will provide valuable insights for the prevention and treatment of short- and long-term consequences resulting from a wider range of pathologies associated with lung immaturity.

Acknowledgments

This work and studies performed in the laboratory of Y.T. were supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Institute of Gender and Health (CIHR-IGH), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) – Réseau en Santé Respiratoire, FRSQ – Réseau de recherche sur le développement, la santé et le bien-être de l'enfant, and the Jeanne and Jean-Louis Lévesque Chair in Perinatology to Y.T. T.S. was supported by the Wyeth Pharmaceuticals & CIHR/R&D Research Fellowship Program during his training in the laboratory of Y.T. (2005–2007). We gratefully thank Mr Eric

Boucher for helpful comments and histological photographs. We apologize to the many researchers who contributed importantly to the field of research and whose works were not cited due to space restriction.

References

1. Kelly, M.M. (2006) The basics of prematurity. *J Pediatr Health Care* 20, 238-244
2. Martin, J.A., et al. (2006) Births: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 55, 1-101
3. Bhandari, A., and Bhandari, V. (2009) Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 123, 1562-1573
4. Marlow, N., et al. (2005) Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med* 352, 9-19
5. Grenache, D.G., and Gronowski, A.M. (2006) Fetal lung maturity. *Clin Biochem* 39, 1-10
6. Helve, O., et al. (2009) Pulmonary fluid balance in the human newborn infant. *Neonatology* 95, 347-352
7. Farrell, P.M., and Avery, M.E. (1975) Hyaline membrane disease. *Am Rev Respir Dis* 111, 657-688
8. Nielsen, H.C. (1985) Androgen receptors influence the production of pulmonary surfactant in the testicular feminization mouse fetus. *J Clin Invest* 76, 177-181
9. Carey, M.A., et al. (2007) It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol Metab* 18, 308-313
10. Patrone, C., et al. (2003) Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol* 23, 8542-8552
11. Morani, A., et al. (2006) Lung dysfunction causes systemic hypoxia in estrogen receptor beta knockout (ERbeta^{-/-}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7165-7169
12. Massaro, D., et al. (2007) Estrogen receptor-alpha regulates pulmonary alveolar loss and regeneration in female mice: morphometric and gene expression studies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L222-228
13. Trotter, A., et al. (2009) Combined application of 17beta-estradiol and progesterone enhance vascular endothelial growth factor and surfactant protein expression in cultured embryonic lung cells of mice. *Int J Pediatr* 2009, 170491
14. Trotter, A., et al. (2009) Gender-related effects of prenatal administration of estrogen and progesterone receptor antagonists on VEGF and surfactant-proteins and on alveolarisation in the developing piglet lung. *Early Hum Dev* 85, 353-359

15. Trotter, A., et al. (2006) Prenatal estrogen and progesterone deprivation impairs alveolar formation and fluid clearance in newborn piglets. *Pediatr Res* 60, 60-64
16. Trotter, A., et al. (2007) Effect of oestradiol and progesterone replacement on bronchopulmonary dysplasia in extremely preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92, F94-98
17. Kauffmann, F. (2010) Sex differences in human lung development. *Am J Respir Crit Care Med* 181, 523
18. Milewich, L., et al. (1986) Androstenedione metabolism in human lung fibroblasts. *J Steroid Biochem* 24, 893-897
19. Brereton, P., et al. (2001) Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol* 171, 111-117
20. Blomquist, C.H., et al. (2005) Inhibition of 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (3alpha-HSD) activity of human lung microsomes by genistein, daidzein, coumestrol and C(18)-, C(19)- and C(21)-hydroxysteroids and ketosteroids. *Steroids* 70, 507-514
21. Pezzi, V., et al. (2003) Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87, 181-189
22. Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2005) Genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis are transiently expressed in the developing lung. *Endocrinology* 146, 2239-2245
23. Moeller, G., and Adamski, J. (2009) Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 301, 7-19
24. Lukacik, P., et al. (2006) Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 248, 61-71
25. Zhu, Y.S., and Imperato-McGinley, J.L. (2009) 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 1155, 43-56
26. Payne, A.H., and Hales, D.B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25, 947-970
27. Simard, J., et al. (2005) Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26, 525-582

28. Provost, P.R., et al. (2000) Androgen formation and metabolism in the pulmonary epithelial cell line A549: expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 3. *Endocrinology* 141, 2786-2794
29. Provost, P.R., et al. (2004) A link between lung androgen metabolism and the emergence of mature epithelial type II cells. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 296-305
30. Simard, M., et al. (2009) Type 2 and 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and androgen receptor in human fetal lungs. *Mol Cell Endocrinol* 319, 79-87
31. Boucher, E., et al. (2009) Androgen receptor and 17beta-HSD type 2 regulation in neonatal mouse lung development. *Mol Cell Endocrinol* 311, 109-119
32. Provost, P.R., et al. (2002) Androgen inactivation in human lung fibroblasts: variations in levels of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 5 alpha-reductase activity compatible with androgen inactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3883-3892
33. Kimura, Y., et al. (2003) Expression of androgen receptor and 5alpha-reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible correlation with branching morphogenesis. *Clin Sci (Lond)* 105, 709-713
34. Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2007) Mouse 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA: a marker of lung maturity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 61-64
35. Levesque, B.M., et al. (2000) Dihydrotestosterone stimulates branching morphogenesis, cell proliferation, and programmed cell death in mouse embryonic lung explants. *Pediatr Res* 47, 481-491
36. van Weerden, W.M., et al. (1992) Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50, 857-861
37. Wong, L., et al. (1995) Genetic variation in plasma androgens and ovarian aromatase activity during mouse pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 208, 277-282
38. Penning, T.M., et al. (2007) Identification of the molecular switch that regulates access of 5alpha-DHT to the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 77-82
39. Chetyrkin, S.V., et al. (2001) Further characterization of human microsomal 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 386, 1-10
40. Penning, T.M., et al. (2004) Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Mol Cell Endocrinol* 215, 63-72

41. Bellemare, V., et al. (2006) Isolation and characterization of a cDNA encoding mouse 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: an androgen-inactivating enzyme selectively expressed in female tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 98, 18-24
42. Takeyama, J., et al. (2000) 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 expression in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 410-416
43. Plante, J., et al. (2009) Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant. *J Steroid Biochem Mol Biol* 117, 139-145
44. Torn, S., et al. (2003) Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 37-45
45. Liu, H., et al. (2005) Cloning and characterization of human form 2 type 7 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, a primarily 3 β -keto reductase and estrogen activating and androgen inactivating enzyme. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 173-179
46. Moller, G., et al. (1999) Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17 β -hydroxysteroid dehydrogenase IV. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 441-446
47. Chouinard, S., et al. (2008) Inactivation by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: the end of androgen signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 247-253
48. Pacifici, G.M. (2005) Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev* 81, 573-581
49. O'Brodovich, H., et al. (2008) Amiloride-insensitive Na⁺ and fluid absorption in the mammalian distal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L401-408
50. Wilson, S.M., et al. (2007) Developmental regulation of luminal lung fluid and electrolyte transport. *Respir Physiol Neurobiol* 159, 247-255
51. Sweezey, N.B., et al. (1997) Sex hormones regulate CFTR in developing fetal rat lung epithelial cells. *Am J Physiol* 272, L844-851
52. Sweezey, N.B., et al. (1998) Glucocorticoid receptor mRNA and protein in fetal rat lung in vivo: modulation by glucocorticoid and androgen. *Am J Physiol* 275, L103-109
53. Dammann, C.E., et al. (2000) Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development. *Endocrinology* 141, 2923-2929

54. Bresson, E., et al. (2009) Gene expression profile of androgen modulated genes in the murine fetal developing lung. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 2
55. Mikkonen, L., et al. (2010) Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Mol Cell Endocrinol* 317, 14-24
56. Simard, M., et al. (2006) Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumonocytes in fetal mouse lungs. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 25
57. Provost, P.R., et al. (2009) Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids. *J Endocrinol* 200, 321-330
58. Boonyaratanakornkit, V., and Edwards, D.P. (2007) Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* 25, 139-153
59. Caldwell, J.D., et al. (2006) Emerging roles of steroid-binding globulins. *Horm Metab Res* 38, 206-218
60. Cortese, R., et al. (2008) Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1494-1508
61. Roberts, D., and Dalziel, S. (2006) Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD004454
62. Kho, A.T., et al. (2010) Transcriptomic analysis of human lung development. *Am J Respir Crit Care Med* 181, 54-63
63. Kho, A.T., et al. (2009) Expression profiles of the mouse lung identify a molecular signature of time-to-birth. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 47-57
64. Bebermeier, J.H., et al. (2006) Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med* 84, 919-931
65. Boucher, E., et al. (2009) Levels of dihydrotestosterone, testosterone, androstenedione, and estradiol in canalicular, saccular, and alveolar mouse lungs. *Lung* 188, 229-233
66. Price, T., et al. (1992) Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 879-883

67. Hanley, K., et al. (1996) Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. Acceleration by estrogen and delay by testosterone. *J Clin Invest* 97, 2576-2584
68. Dammann, C.E., et al. (2003) Role of neuregulin-1 beta in the developing lung. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1711-1716
69. Beyer, C., et al. (2003) Ontogenetic expression of estrogen and progesterone receptors in the mouse lung. *Biol Neonate* 84, 59-63
70. Pasqualini, J.R. (2005) Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 401-415
71. Mendelson, C.R., et al. (2005) Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95, 25-33
72. Abramovich, D.R. (1974) Human sexual differentiation--in utero influences. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 81, 448-453
73. Grumbach, M.M., et al. (2003) Williams textbook of endocrinology. In Williams textbook of endocrinology (10th ed. edn) (Larsen P, K.H., Melmed S, Polonsky K, editors, ed), 842-969, Saunders

Figure legends

Figure 1.

(a) Human (blue background) and (b) mouse (orange background) lung developmental stages in relation to testosterone and estradiol levels in fetal circulation and in fetal lung. Hormone levels in human fetal lung and estradiol levels in the mouse fetal circulation are not available, and human fetal circulating estradiol levels are not available individually for each sex. Surfactant production is also indicated for both female and male by the pink and blue triangles, respectively, underneath each graph. Histologic photographs and schematic illustrations show mouse lung tissues at the corresponding developmental stages (center panel). Fetal levels of circulating testosterone are represented by colored strips (blue for human and red for mouse) in which the gradient indicates the intensity level (the darker color represents higher levels).

Figure 2.

Schematic representation of androgen and estrogen metabolism pathways as revealed by the results obtained from mouse and human developing lungs and from human pulmonary cell lines. Each isoform (type) of the enzymes is encoded by a different gene. The reactions reported here do not occur simultaneously within a given cell type. The genes encoding for these enzymes present or are likely to present cell-specific expression and are also subjected to regulation over time. Reactions involving the active androgens (testosterone and 5α -DHT, square frames), the most potent estrogen (estradiol, solid oval frame) and their immediate precursors are presented. Estrone is also considered to have weak estrogenic effects (dotted oval frame). Only the enzymes for which experimental evidence of their expression and/or activity in the fetal lung have been published are included (Table 1 for more details). Because 17β -HSD type 3 is only barely detectable in the fetal mouse lung it is not included in the figure. Reactions synthesizing biologically active sex hormones are colored in blue; red coloration indicates sex hormone inactivating reactions. The dotted arrow represents a reaction for which data are not available in the fetal lung. Thicker arrows represent the only reactions for which the enzymatic activities were demonstrated in cell-line models. The dotted square highlights reactions that do not take

place in rodents because corresponding substrates are not available. DHEA, dehydroepiandrosterone; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase; Testo, testosterone; 5 α -DHT, 5 α -dihydrotestosterone; RoDH, retinol dehydrogenase. Reactions and isoforms that are species-specific are indicated by h, (human), or m, (mouse).

Figures

Figure 1

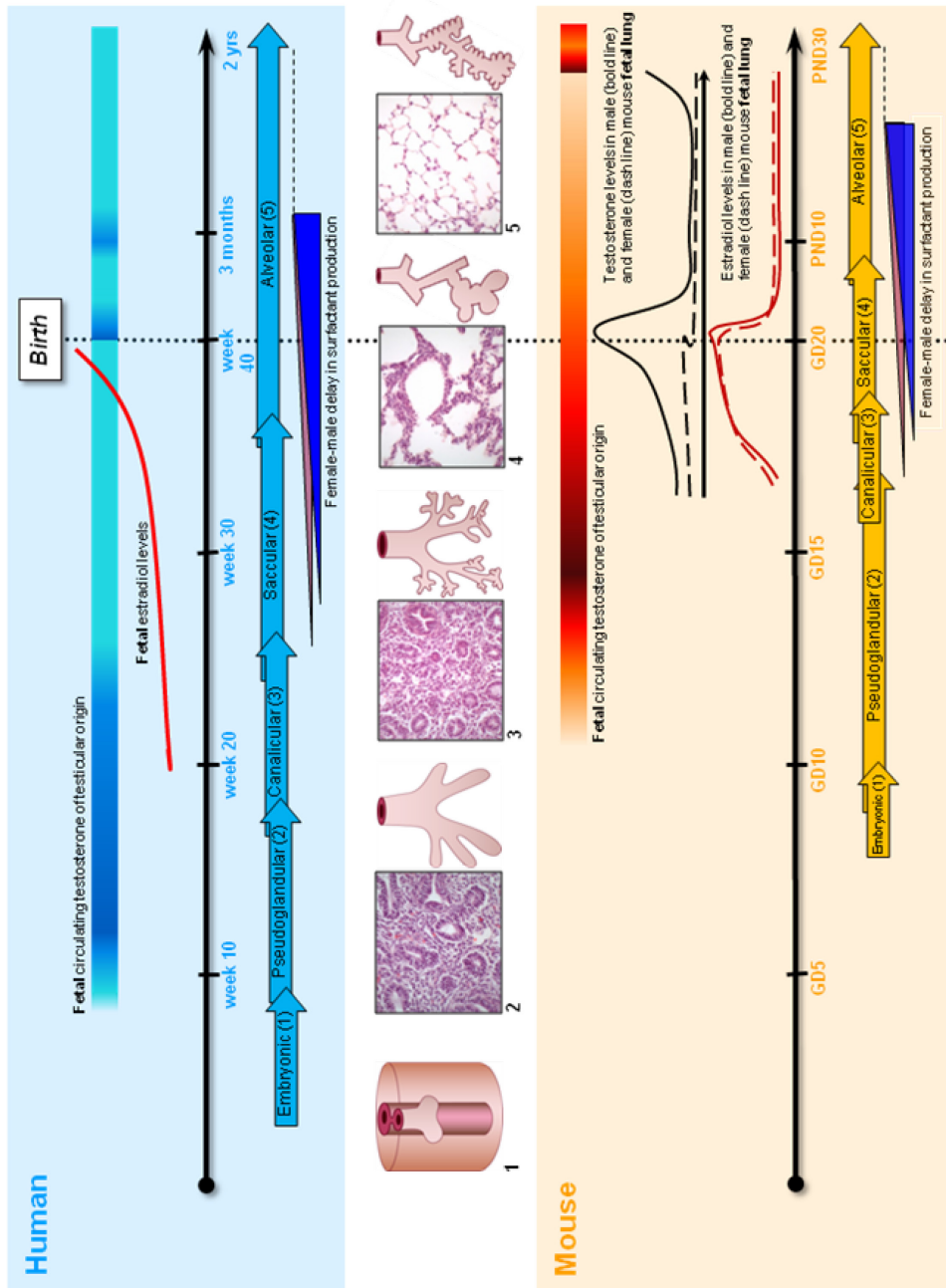
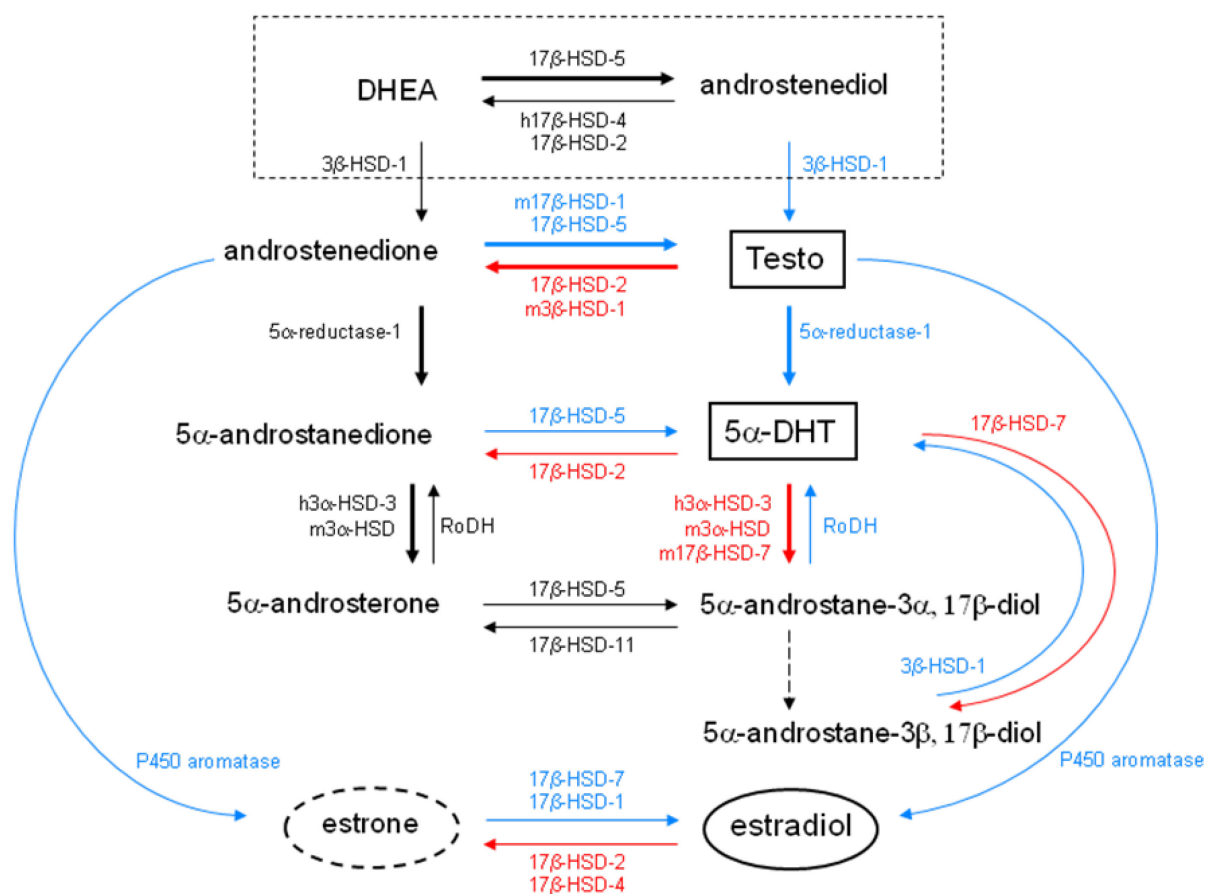


Figure 2



Table

Table 1. Summary of the reviewed data on steroidogenic enzymes involved in androgen and estrogen metabolism in human and mouse developing lungs, and in human lung cell lines.

	Human fetal lung ^a	Mouse fetal lung (mid-late gestation)	PTII-like cell line A549	Normal lung fibroblast cell lines
Androgen (A) and/or estrogen (E) synthesis				
17 β -HSD type 1 (E)	n/a	QPCR	[65] NB-RNase protection (n/d)	[28] n/a
m17 β -HSD type 1 (A, E)	n/a	QPCR (barely detected)	[29] NB-RNase protection (n/d)	[28] n/a
17 β -HSD type 3 (A)	n/a	QPCR ^b	[29] NB-RNase protection, enzymatic activity	[28] n/a
17 β -HSD type 5 (A)	QPCR, IHC	[30]	n/a	n/a
17 β -HSD type 7 (E)	NB	[44] n/a	n/a	n/a
P450 aromatase (E)	PCR QPCR	[66] n/a [21]	n/a	n/a
5 α -reductase type 1 (A)	RTPCR, IHC	[33] QPCR	[34] NB-RNase protection (very low) ^c , enzymatic activity	[28] NB, enzymatic activity [32]
5 α -reductase type 2 (A)	RTPCR, IHC (n/d)	[33] n/a	NB (n/d)	[28] NB (n/d) [32]
3 β -HSD type 1 ^d (A)	QPCR	[21] QPCR ^e microarrays ^f	[22] NB (n/d)-RNase protection (very low), enzymatic activity (barely detected)	[28] Enzymatic activity (3 β -HSD-like) (barely detected) [32]
3 β -HSD type 2 (A)	QPCR (n/d)	[21] n/a	[56] n/a	
Androgen (A) and/or estrogen (E) inactivation				
17 β -HSD type 2 (A, E)	RTPCR, enzymatic activity (n/d) QPCR, IHC, ISH, Western blot	[42] QPCR ^b [30] IHC, ISH	[29] NB-RNase protection (n/d) [43]	[28] NB, enzymatic activity [32]
17 β -HSD type 4 (E)	n/a	n/a	NB, enzymatic activity	[28] n/a
17 β -HSD type 7 (A)	NB	[44] n/a	n/a	n/a
17 β -HSD type 11 (A)	IHC	[19] –	n/a	n/a
3 α -HSD type 3 (A)	n/a	–	NB-RNase protection, enzymatic activity	[28] Enzymatic activity (3 α -HSD-like) [32]
m3 α -HSD (A)	–	QPCR	[34] –	–

^a Gestational age of fetuses (weeks of gestation): 17–25 (17–40 for QPCR) [30]; 13–16 [33]; 15–19 [21]; 20 [42]; 13–20 [66]; unspecified [44].

^b Differential expression levels between sexes are observable at GD15.5 (females > males), and at GD17.5 (favoring males or females depending on the litter).

^c 5 α -reductase type 1 mRNA is also detected in A549 cells by Northern blot [32].

^d There is no DHEA or androstenediol in the mouse circulation, therefore 3 β -HSD type 1 is unlikely to participate in testosterone synthesis in the mouse lung. However, a role for this enzyme was suggested in glucocorticoid synthesis from cholesterol in the fetal lung using pregnenolone as the substrate [22].

^e Differential expression levels between sexes is seen at GD15.5 (favoring males or females depending on the litter).

^f Differential expression levels between sexes is seen at GD15.5 (detected only in males).

Abbreviations: GD: gestational day; PTII: type II pneumocyte; HSD: hydroxysteroid dehydrogenase; IHC: immunohistochemistry; ISH: in situ hybridization; NB: northern blot; QPCR: quantitative polymerase chain reaction; RTPCR: reverse transcription polymerase chain reaction; n/a: not available; n/d: not detected; –: not relevant (the enzyme does not exist in the species concerned).

Textboxes

Box 1. Regulation of lung maturation by sex hormones

Involvement of androgens in sex differences during fetal development has been extensively described ([67] and references therein), notably by the pioneering studies of H.C. Nielsen and J.S. Torday. In human, rodents, and rabbit, the surge of surfactant synthesis occurring at mid-late gestation (Box 2) is delayed in males and is linked to androgen levels. In animal models, 5α -DHT administration induces a similar delay in female fetuses. Fibroblast-pneumonocyte factor (FPF) was among the first identified factors mediating androgen effects on lung maturation; its activity can be measured by the ability of conditioned media from fetal lung fibroblasts to promote the production of surfactant by PTII cells. FPF production is delayed in vivo in male fibroblasts, whereas in vitro 5α -DHT has no effect on the basal sex difference in FPF production, but blocks the stimulation of FPF activity by glucocorticoids, which are positive regulators of lung maturation. Because it is secreted by fetal lung fibroblasts and mimics FPF activity, neuregulin-1 β is proposed to contribute to FPF activity [68]. Neuregulin-1 β mRNA levels do not differ between male and female mouse lungs over the period GD15.5 to GD18.5 [29]. Androgens are also involved in the regulation of EGF and TGF- β pathways which are positive and negative regulators of lung maturation, respectively ([53] and references therein). Indeed, there is an androgen-induced delay in EGF receptor-binding activity during rabbit lung development, whereas exposure of fetal female fibroblasts to 5α -DHT results in a dose-dependent increase of TGF- β 1 binding in mice. In addition to their delaying effects on PTII cell maturation, androgens stimulate proliferation and fetal lung growth. Conversion of testosterone into 5α -DHT is not a prerequisite for the sex difference in lung maturation, suggesting that both steroids could be responsible for androgenic effects in the fetal lung.

ER α and ER β are expressed in mouse fetal lung at higher levels than in early postnatal and adult lungs, suggesting a role for estrogens in lung development [69]. Several studies ([69] and references therein) in rat and rabbit fetal lungs demonstrated that estrogens stimulate both the formation and release of surface-active phospholipids, enhance the phospholipid and phosphatidylcholine contents, and stimulate expression of surfactant protein A and B

mRNAs, thus promoting the production of surfactant components. Estrogens also increase the number of PTII cells and the formation of lamellar bodies (surfactant secretory organelles) which tend to be decreased in RDS.

Box 2. Lung development and fetal circulating sex hormones

Lung development starts with evagination of the lung primordium from the ventral foregut into the surrounding splanchnic mesoderm (embryonic stage). The primitive lung epithelium grows and branches during the pseudoglandular stage until it forms the proximal conducting airways and the terminal acinar buds. The terminal buds then progressively dilate to form the future alveoli, the mesenchyme becomes thinner, and blood capillaries become closely apposed with the future alveoli. These latter events occur during the canalicular and saccular stages. The lung becomes fully mature during the alveolar stage.

Concurrent with these developmental processes the fetal lung is exposed to circulating sex hormones. During human pregnancy, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulphate produced by maternal and fetal adrenals are the pre-eminent circulating C19 steroid precursors for the synthesis of active sex hormones [70]. In mice the maternal ovary is the primary source of C19 steroids until mid-gestation when there is a switch toward placental production of androstenedione [37] and [71]. Estradiol is produced by the placenta in human and by the maternal ovary in mouse. Male sex differentiation leads to testosterone secretion by fetal testes. In the human, this secretion begins around 8 weeks of pregnancy, is high between 10 and 17 weeks of gestation, and the maximal fetal male-to-female ratio in testosterone serum levels occurs between 12–18 weeks of pregnancy [72] and [73]. After 24 weeks of pregnancy, testosterone levels are low in both sexes. Fetal testosterone secretion by the mouse testis begins around GD12.5–13.0, peaks at GD15.5–16.0, and then declines [73]. In the human and mouse fetal circulation the peak of testicular androgen production occurs before the surge of surfactant production by mature PTII cells, which takes place on GD17.5 in the mouse and at around the 28th and 34th weeks of pregnancy in the human. Dihydrotestosterone, testosterone, androstenedione, and estradiol were quantified in male and female fetal mouse lungs from GD16.5 to postnatal

day 30 [65], and a sex difference was observed for testosterone and androstenedione, with higher levels for males.

The male lung is exposed to higher levels of testosterone than females in the period preceding the surge of surfactant production, whereas during mid–late gestation both sexes are exposed to increasing levels of estradiol. Thus, hormonal pressures in the fetal lung during critical periods of maturation are dependent on these circulating levels of active hormones and on locally synthesized/inactivated steroids.

Box 3. Outstanding questions

Sex hormone synthesis and inactivation have been shown to take place within the developing lung itself, raising the following question – what are the respective contributions of pulmonary metabolized and circulating sex hormones in the processes of lung development and maturation?

This issue implies some underlying specific questions – do the circulating and pulmonary metabolized sex hormones exert their effects on lung development in a simultaneous or sequential manner, or by a combination of the two? Do they act on different developmental and maturational targets? Are the relative contributions of pulmonary metabolized and circulating hormones similar for androgens and estrogens?

Answering these questions is fundamental to elucidating new therapeutic target(s) for the development of potential strategies for treating lung immaturity – should these treatments target the pulmonary metabolism of sex hormones by directly and specifically modulating steroidogenic enzymes and/or sex hormone targets within the lung?

Glossary

A549 cells: human alveolar epithelial cells derived from an adenocarcinoma considered to be an in vitro model of PTII cells, principally because they synthesize lecithin, contain a high percentage of disaturated fatty acids, and have the ability to synthesize surfactant, store it in lamellar bodies, and secrete it under appropriate culture conditions.

Alveolar septation: a process taking place at the final stage of lung development (alveolar stage) in which secondary septa grow between the walls of the terminal sacs, partitioning the more primitive pouches into alveolar ducts and sacs. This results in the maturation of saccules into alveoli, thereby significantly increasing the blood–gas interface and the exchange surface area.

Alveologensis: a general term describing the formation of mature pulmonary gas-exchange units, the alveoli, by the process of alveolar septation. In human, alveologensis starts prenatally and continues postnatally; in rodents it is completely achieved postnatally. Also referred to as alveogenesis, alveolization, and/or alveolarization.

Bronchopulmonary dysplasia (BPD): a chronic lung disease (CLD) occurring generally in babies who are born prematurely with RDS and who received prolonged mechanical ventilation to treat RDS. This results in severe inflammation and scarring of the pulmonary tissue. On the other hand, new BPD is a pathology occurring in preterm babies, either with or without postnatal RDS, but who present with similar clinical features. New BPD results from an aberration of lung development or from an impairment of alveolar and vascular development.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): a transmembrane channel transporting Cl⁻ ions across epithelial cell membranes. In lung, CFTR is expressed in epithelial cells. Mutations in the CFTR gene lead to cystic fibrosis.

Epithelial sodium channel (ENaC): a heterotrimeric protein forming a membrane-bound ion channel that is permeable to Na⁺ ions. ENaC is expressed in the epithelial cells of several tissues and is involved in transepithelial transport of Na⁺ ions in conjunction with the Na⁺/K⁺-ATPase pump. In perinatal lung, ENaC is responsible for lung fluid reabsorption needed for fluid clearance at birth. Also known as the amiloride sensitive sodium channel.

Fibroblast pneumocyte factor (FPF): an organ-specific combination of differentiation factors produced by fetal lung fibroblasts during a discrete period in development, under glucocorticoid regulation. FPF activity can be measured as the ability of conditioned media derived from fetal lung fibroblasts to promote the production of surfactant by immature PTII cells. FPF synthesis in the fetal rat lung increases during gestation in the presence of cortisol. Injection of partially purified FPF into fetal rats augments surfactant phospholipid synthesis, whereas FPF inactivation blocks lung maturation *in vivo* and *in vitro*, as determined by decreased amounts of surfactant phospholipids. FPF production is delayed in male-derived lung fibroblasts.

Glucocorticoid antenatal therapy: therapy administered to women at risk of preterm delivery to accelerate lung maturation and to reduce the incidence of RDS in neonates. This results in decreased requirements for surfactant therapy and prolonged mechanical ventilation in the neonatal period and generally improves both the short- and long-term outcome. This therapy improves neonatal lung function by enhancing maturational changes in lung architecture and phenotypic cellular maturation.

Lamellar bodies: secretory organelles found in alveolar PTII cells that are involved in the storage and secretion of lipid and surfactant-associated proteins. They contain multilamellar lipid membranes constituting the storage form of the lung surfactant lipids and they secrete surfactant on the surface of lung alveoli.

Lung fluid: this is secreted by fetal epithelial pulmonary cells, via active chloride transport, through the airway epithelium into the lung lumen, filling the fetal lung and providing support for its shaping and a mechanical stimulus for epithelial cell differentiation. At birth, in response to hormonal stimuli, lung fluid transport is inverted and the pulmonary epithelium reabsorbs fluid via the transport of ions by lung epithelial sodium channels, a process which is crucial for the clearance of fetal lung fluid.

Parenchymal thinning: a process by which the terminal air space area gradually increases while the thickness of the mesenchyme between the terminal air spaces decreases. This takes place after the period of branching morphogenesis, during the saccular stage of lung development. Also named mesenchymal thinning.

Phosphatidylcholine-sphingomyelin ratio (PC/S ratio): often named the lecithin-sphingomyelin ratio (L/S ratio), this test is performed on an amniotic fluid sample to assess

the degree of fetal lung maturity. As the lung matures and starts to produce surfactant the ratio of phosphatidylcholine to sphingomyelin increases in the amniotic fluid. Thus, an amniotic fluid sample with a higher ratio indicates that there is more surfactant in the lungs and that the baby will have less difficulty breathing at birth.

PTII cells: one of the two types of pneumocytes (also named pneumocytes) comprising the pulmonary alveoli, the other being PTI cells. PTII cells are bigger than PTI cells and present a granular and cuboidal shape. They are typically found at the alveolar–septal junction, are much less numerous than PTI cells, and cover a very limited proportion of the lung surface area. PTII cells are responsible for the production, storage (in lamellar bodies), and secretion of surfactant.

Respiratory distress syndrome (RDS): also named hyaline membrane disease, this is one of the most common lung diseases in premature infants and affects about 10% of premature babies. Most cases occur in babies born before 28 weeks of gestation. RDS occurs in infants whose lungs have not yet fully developed and, although it can result from genetic problems with lung development, the disease is primarily caused by a lack of surfactant, making breathing difficult for the baby and compromising respiratory gas exchange. RDS can be an early phase of BPD, another breathing disorder that affects premature babies.

Saturated phosphatidylcholine (SPC): determination of SPC can be used as a predictor of RDS and is more specific and more sensitive than the PC/S ratio. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) is the major surface-active component of lung surfactant, representing more than 90% of the SPC species.

Stages of lung development: lung development is usually described as a succession of 5 stages according to lung histological modifications occurring during embryonic, fetal, and postnatal life. (i) Embryonic stage (GD9.0 to GD9.5 in the mouse; 3–8 weeks of pregnancy in the human). Formation of the major airways occurs first by the formation of the primitive lung bud from the foregut and then through dichotomous branching of this diverticulum. (ii) Pseudoglandular stage (GD9.5 to GD16.5 in the mouse; 8–16 weeks of pregnancy in the human). Budding and branching of the airways continue and result in the formation of small airways including the terminal bronchioles. At the end of this stage four bronchiolar epithelial cell types are differentiated: ciliated, non-ciliated, secretory, and early basal cells. (iii) Canalicular stage (GD16.5 to GD17.5 in the mouse; 16–25 weeks of

pregnancy in the human). Respiratory structures and the surrounding vasculature begin to develop. Capillaries are positioned in close proximity to the airway epithelium to allow future gas exchange. The terminal bronchioles evolve into primitive respiratory bronchioles containing terminal sacs that later give rise to alveoli. (iv) Saccular stage (GD17.5 to postnatal day 5 in the mouse; 25–36 weeks of pregnancy in the human). Development of the alveoli begins with the subdivision of saccules, resulting in primitive alveoli which are pouches in the walls of saccules and respiratory bronchioles and are lined by PTI cells. (v) Alveolar stage (postnatal day 5 to 30 in the mouse; from 36 weeks of pregnancy to 2 years after birth in the human). Development of true vascularized alveoli takes place. These alveoli are lined by PTI cells and contain PTII cells necessary for surfactant production. Secondary septa grow into the airspaces, partitioning the more primitive pouches into alveolar ducts and sacs, increasing the exchange surface area of the lung.

Surfactant: a compound synthesized in PTII cells. It is stocked in lamellar bodies and secreted into the pulmonary lumen. It is composed of 80% phospholipids, principally dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), but also phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylglycerol (PG), 5% surfactant-associated proteins (SP-A, SP-B, SP-C, and SP-D), and less than 5% neutral lipids, mainly cholesterol. Surfactant forms a thin layer on the alveolar surface, preventing alveolar collapse by decreasing surface tension within the alveoli. Lack of surfactant results in collapse of the alveoli upon expiration and requires excessive force to re-expand on inspiration, leading to the development of RDS. Surfactant also has an immunomodulatory function, acting in pulmonary host defense.

Surfactant therapy: reduces mortality and several aspects of morbidity in babies with RDS. It is administered by direct tracheal instillation either as a rescue treatment (i.e. after the initiation of mechanical ventilation in infants with clinically confirmed RDS) or as a prophylactic therapy (i.e. soon after birth to infants at high risk of RDS). Exogenous surfactant used for therapy can be extracted from animal lung lavage and from human amniotic fluid or produced from synthetic materials.

Vascular endothelial growth factor (VEGF): homodimeric glycoprotein produced by cells in response to tissue oxygen demand. VEGF is a potent endothelial cell mitogen and a pro-angiogenic factor regulating vascular growth. During development, VEGF is a crucial mediator of lung vascularization and of airway–blood-vessel interactions required for the

establishment of lung architecture. VEGF also stimulates lung epithelial cell growth and differentiation and acts as a maturational stimulus for surfactant production.