



## REVUE GENERALE

# Les modèles animaux de BPCO

## *Animal models of COPD*

M. Dagouassat, J. Boczkowski

Inserm U955, Equipe 04  
Institut Mondor de Recherche Biomédicale  
Université Paris Est Créteil - France

### SUMMARY

There are few animal models of COPD secondary to exposure to particle pollution, dust and smoke from biomass fuels. Most models use exposure to cigarette smoke or other approaches (elastase administration, for example), and genetically modified animals.

The exposure of animals to cigarette smoke seems to be the best model for COPD currently. It reproduces a form of emphysema, small airway remodeling, and pulmonary hypertension. In contrast, induction of mucus hypersecretion is more problematic. A major inconvenience of this model is the induction of emphysema and small airway remodeling that can take several months to develop (about 6 months of exposure), which makes this model very expensive and time consuming.

Although the results indicate that elastase induced emphysema is simple to make, this model is not mechanistically simple. At best, emphysema caused by elastase is a technique for testing mechanisms that could be applied to smokers, but this approach is still far from human exposure to cigarette smoke. The elastase-induced emphysema model seems to be inferior to cigarette smoke exposed model.

Results obtained by using gene modified mice should be interpreted with caution since we are interested in the pathophysiology of human COPD.

**KEYWORDS:** COPD, animal model, cigarette smoke, elastase, emphysema, gene modification

### RESUME

Il existe peu de modèles animaux de la BPCO secondaires à l'exposition à des particules de la pollution, des poussières et des fumées issues des carburants de biomasse. La plus grande partie des modèles utilise l'exposition à la fumée de cigarette ou d'autres approches (administration d'élastase, par exemple), et des animaux modifiés génétiquement.

L'exposition des animaux à la fumée de cigarette semble être le meilleur modèle de BPCO à l'heure actuelle. Il reproduit une forme d'emphysème, le remodelage des petites voies aériennes et l'hypertension pulmonaire. En revanche, l'induction d'une hypersécrétion de mucus est plus problématique. Un inconvénient important de ce modèle est l'induction de l'emphysème et le remodelage des petites voies aériennes qui peut prendre plusieurs mois avant de se développer (environ 6 mois d'exposition), ce qui rend le modèle très coûteux et chronophage.

Bien que ses résultats indiquent que l'emphysème induit par l'élastase soit simple à réaliser, le modèle n'est pas mécaniquement simple. Au mieux, l'emphysème causé par l'élastase est une technique de dépistage des mécanismes qui pourraient s'appliquer aux sujets fumeurs, mais cette approche reste éloignée de l'exposition humaine à la fumée de cigarette. Le modèle semble inférieur au modèle d'exposition à la fumée de cigarette.

les résultats obtenus en utilisant des souris modifiées génétiquement doivent être interprétés avec prudence dès lors qu'on s'intéresse à la physiopathologie de la BPCO humaine.

**MOTS CLES:** BPCO, model animal, fumée de cigarette, élastase, emphysème, modification génique

*Auteur correspondant:* Dr Jorge BOCZKOWSKI. Inserm U955, Equipe 04. Institut Mondor de Recherche Biomédicale. Université Paris Est Créteil - France. E-mail: [jorge.boczkowski@inserm.fr](mailto:jorge.boczkowski@inserm.fr)

## INTRODUCTION

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une cause de plus en plus importante de morbidité et de mortalité. Cette pathologie est à l'heure actuelle la cinquième cause de décès dans le monde [58], et les estimations récentes suggèrent que sa prévalence est en constante augmentation et touche 9 - 10% des adultes de plus de 40 ans [48]. Dans les pays développés, le tabagisme est de loin le facteur de risque le plus important. Néanmoins, d'autres facteurs interviennent tels que l'exposition aux particules de la pollution atmosphérique, les expositions professionnelles à des poussières et des fumées [20].

Dans les pays en développement, l'exposition à des combustibles de la biomasse utilisés pour la cuisson est également soupçonnée d'être des agents étiologiques de la maladie [48].

Il existe peu de modèles animaux de la BPCO secondaires à l'exposition à des particules de la pollution, des poussières et des fumées issues des carburants de biomasse. La plus grande partie des modèles utilise l'exposition à la fumée de cigarette ou d'autres approches (administration d'élastase, par exemple), et des animaux modifiés génétiquement. Dans cet article, nous allons nous concentrer sur les avantages et les inconvénients de ces différents modèles animaux.

La première question à se poser dans ce contexte, c'est la constitution du modèle le plus proche de la BPCO humaine. Ce n'est pas une question simple, parce que la BPCO humaine est composée d'au moins quatre lésions anatomiques : l'emphysème pulmonaire, remodelage des voies aériennes de petite taille (y compris la métaplasie des cellules caliciformes), la bronchite chronique et l'hypertension artérielle pulmonaire. Un patient donné peut avoir tout ou partie de ces lésions. En outre, les patients atteints de BPCO peuvent développer des exacerbations aiguës dont l'étiologie est souvent infectieuse. Pour compliquer encore les choses, quelques soient les lésions présentes, la BPCO se développe de manière lente et progressive sur plusieurs années.

Un bon modèle animal de BPCO devrait présenter des similitudes: avec l'anatomie pulmonaire de l'homme, la pathologie étant étroitement liée à l'anatomie du poumon et avec les mécanismes physiopathologiques de la BPCO humaine. Le modèle idéal devrait permettre de reproduire les diverses lésions anatomiques énumérées ci-dessus, le tout dans un court laps de temps. Malheureusement, tous les modèles animaux connus répondent seulement à

quelques-uns de ces critères. Nous analyserons les modèles les plus utilisés dans la littérature.

## MODELE DE BPCO SECONDAIRE A L'EXPOSITION A LA FUMEE DE CIGARETTE

Compte tenu de son rôle en tant que principale cause de la maladie, les modèles animaux utilisant l'exposition à la fumée semblent être le choix logique pour l'étude de la physiopathologie de la maladie. Ces modèles ont été développés récemment.

### Induction d'emphysème par exposition à la fumée de cigarette

La plupart des modèles animaux se sont focalisés sur l'emphysème, lésion anatomique qui, historiquement, a été la plus étudiée chez les patients atteints de BPCO. A l'exception des souris déficitaires en  $\alpha$ 1-antitrypsine (« pallid mouse ») [6, 67], les modèles d'emphysème induits par la fumée de cigarette sont caractérisés par une dilatation de canaux alvéolaires. Ces changements sont corrélés au degré d'intoxication tabagique et sont anatomiquement similaires à des formes modérées d'emphysème centrolobulaire chez l'homme. Cependant le degré de destruction tissulaire est plus important chez l'homme que chez les animaux de laboratoire [6].

Le parenchyme entre les canaux alvéolaires dilatés est anormal, avec des augmentations de la taille et du nombre des pores de Kohn qui connectent les alvéoles adjacentes [71]. Ce phénomène se retrouve dans les poumons de sujets fumeurs [10, 54]. Un faisceau d'arguments tend à montrer que les femmes sont plus sensibles aux effets de la fumée que les hommes [16, 37, 50]. En effet, les souris A/J femelles développent un emphysème induit par la fumée de cigarette plus précocement que les souris mâles [49].

Les lésions induites par l'exposition à la fumée de cigarette chez les animaux de laboratoire peuvent être subtiles, même à l'examen microscopique. Ainsi l'analyse morphométrique est nécessaire pour évaluer et quantifier le degré d'emphysème.

Les cobayes et les souris exposés à la fumée de cigarette montrent des changements physiologiques qui sont proches d'une BPCO modérée chez l'homme [9, 49, 67, 72]. Ainsi, le volume résiduel augmente, de même que la capacité résiduelle fonctionnelle et la capacité pulmonaire totale. La courbe pression-volume est décalée vers le haut et la gauche, la compliance pulmonaire augmente, et la courbe débit / volume montre une diminution des débits pour les petits volumes pulmonaires. Le rapport VEMS/CVF diminue également.

Ces anomalies sont d'autant plus importantes que la durée de l'exposition à la fumée de cigarette est longue [72].

### **Induction du remodelage des petites voies aériennes par l'exposition à la fumée de cigarette**

Le remodelage des petites voies aériennes se caractérise par une augmentation des composants de la matrice extracellulaire et des cellules inflammatoires, par une métaplasie des cellules caliciformes dans la paroi des voies aériennes avec rétrécissement de la lumière et obstruction par le mucus. Ce remodelage est maintenant accepté comme une cause importante de l'obstruction bronchique chez les sujets fumeurs [22, 53, 56]. Ces changements augmentent avec le stade de la maladie défini par la «Global Initiative on Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)» [22]. De plus, la sécrétion exagérée de mucus est également considérée comme importante dans la physiopathologie des exacerbations aiguës de la BPCO [38].

Chez les animaux, les premières études d'inhalation de la fumée de cigarette ont montré une augmentation du nombre de cellules caliciformes dans la trachée proximale chez une grande variété d'espèces [1, 21, 36, 57, 60]. Cependant, il existe des variations considérables de ces effets selon les espèces. Chez le cobaye, l'exposition chronique à la fumée induit une métaplasie des cellules sécrétoires dans les petites voies aériennes [73], et l'arrêt du tabac réduit le degré de cette métaplasie [74], ce qui est également observé chez l'homme.

Un intérêt modéré a été accordé au remodelage de la paroi des petites voies aériennes dans des modèles animaux, probablement parce que ces changements sont trop subtils pour être détectés par l'observation microscopique standard ; certains auteurs nient même leur existence [49]. Néanmoins, l'analyse morphométrique confirme que la paroi des petites voies aériennes est épaissie chez les souris et les cobayes après exposition chronique à la fumée de cigarette [3, 8, 9, 74]. Cette paroi remodelée est composée en grande partie de collagène et de fibronectine, le nombre de cellules musculaires lisses n'étant pas augmenté [3, 8, 52, 74]. Il existe également un changement de la disposition des fibres de collagène qui deviennent alignées et forment des paquets de fibres très denses. Ces changements suggèrent une augmentation de la rigidité de la paroi des voies aériennes [74]. Chez les cobayes, le degré de changement de la structure du collagène est corrélé négativement aux débits aériens et positivement à la résistance des voies aériennes.

Par ailleurs, un faible nombre de lymphocytes est détecté autour des bronchioles chez les souris et les

cobayes, comparable aux agrégats lymphoïdes observés chez les sujets fumeurs [2, 3, 68].

### **Conclusions concernant le modèle d'exposition à la fumée de cigarette**

L'exposition des animaux à la fumée de cigarette semble être le meilleur modèle de BPCO à l'heure actuelle. Il reproduit une forme d'emphysème, le remodelage des petites voies aériennes et l'hypertension pulmonaire. En revanche, l'induction d'une hypersécrétion de mucus est plus problématique. Un inconvénient important de ce modèle est l'induction de l'emphysème et le remodelage des petites voies aériennes qui peut prendre plusieurs mois avant de se développer (environ 6 mois d'exposition), ce qui rend le modèle très coûteux et chronophage. Toutefois, la limitation la plus marquante de ce modèle, quelque soit l'espèce animal et la durée de l'exposition utilisés, est qu'il induit une maladie modérée, probablement équivalente au stade 1-2 de la classification de la pathologie humaine [12, 59].

Chez l'homme, la majorité de la morbidité et de la mortalité attribuables à la BPCO survient chez les patients avec un stade GOLD 3 ou 4 (FEV1 < 50% théorique), mais le degré d'emphysème et de remodelage des petites voies aériennes observables chez des patients, à ce stade de la maladie, ne peuvent pas être reproduits chez les animaux exposés à la fumée de cigarette. Enfin, chez les patients avec un stade GOLD avancé, la BPCO progresse souvent même après l'arrêt du tabac, ce qui n'a pas été observé chez les animaux. En effet, chez des animaux exposés à la fumée de cigarette, l'arrêt de l'exposition est associé à une absence de progression de l'emphysème et à une régression de la métaplasie de cellules caliciformes [74].

### **MODELE DE BPCO SECONDAIRE A L'ADMINISTRATION PULMONAIRE D'ELASTASE**

Le déséquilibre protéases-antiprotéases constitue l'hypothèse physiopathologique la plus ancienne de l'emphysème pulmonaire causé par la fumée de cigarette. Cette hypothèse a été formulée pour une large part, à partir d'expériences dans lesquelles l'emphysème a été induit par l'administration d'enzymes élastolytiques, soit par instillation intratrachéale ou l'inhalation d'aérosols. Ainsi, pour reproduire cet effet, différentes enzymes ont été utilisées [28, 39, 40], et l'un des principaux résultats montre que seuls les enzymes capables de dégrader l'élastine conduisent à un emphysème, les collagénases étant inefficaces [40, 66]. Ces constatations amènent à postuler que la dégradation du réseau d'élastine pulmonaire constitue l'altération pathologique

fondamentale dans l'emphysème pulmonaire.

Presque toutes les études expérimentales récentes ont utilisé soit l'élastase pancréatique porcine (EPP) ou l'élastase neutrophilique humaine (ENH). L'EPP offre les avantages d'être peu coûteuse et facile à obtenir. D'un point de vue pratique, il est important de noter que les EPP et ENH n'ont pas le même spectre protéolytique, et ont différents inhibiteurs endogènes ( $\alpha$ 1-antitrypsine pour ENH, et  $\alpha$ 2-macroglobuline pour les EPP, même si  $\alpha$ 1-antitrypsine est également efficace [64]), et plus important encore, un inhibiteur particulier exogène pouvant inhiber les deux enzymes [34, 35]. Ceci constitue un point crucial à l'heure d'examiner l'efficacité d'un nouvel inhibiteur des protéases.

Une grande variété d'espèces animales a été utilisée dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase [27, 28, 40]. Différents travaux initiaux et d'autres plus récents, ont été effectués chez le hamster, car cette espèce animale est encline à développer une maladie plus grave que d'autres animaux de laboratoire en raison des niveaux relativement faibles de  $\alpha$ 1-antitrypsine [27, 28, 40]. A l'inverse, plusieurs études ont montré que l'administration de  $\alpha$ 1-antitrypsine ou de sérum normal, prévient ou atténue l'emphysème induit par l'élastase. Cet effet n'est pas retrouvé en utilisant le sérum de personnes déficientes en  $\alpha$ 1-antitrypsine [29, 51].

Les principaux avantages du « modèle élastase » sont que *i*) l'emphysème peut être induit rapidement par un traitement unique avec un réactif peu onéreux, plus facile à mettre en place que l'exposition à la fumée de cigarette sur une longue période (6 mois), et *ii*) la sévérité de l'emphysème peut être modulée en fonction de la dose enzymatique. Contrairement à la fumée de cigarette, il est relativement simple d'induire un emphysème sévère avec l'élastase, ce qui facilite la détection des anomalies de la fonction pulmonaire, en particulier lors de l'évaluation des effets d'un inhibiteur pharmacologique ou d'interventions telle que la chirurgie de réduction du volume pulmonaire [7, 26]. Par ailleurs, des études biochimiques et d'hybridation *in situ* ont montré qu'il existe une induction de la synthèse d'élastine et dans une moindre mesure de collagène avec le temps [42], ce qui rend le modèle intéressant pour des études sur la réparation et la régénération alvéolaire. Néanmoins, certains travaux utilisant l'acide rétinoïque et/ou l'instillation de cellules souches ou divers facteurs de croissance ont montré des résultats contradictoires dans ce domaine [24, 25, 41, 55, 75]. Plus récemment Houghton et al. [23] ont montré que des anticorps contre des fragments d'élastine améliorent la réponse inflammatoire et l'emphysème chez les souris instillées avec de l'EPP.

Les inconvénients majeurs du modèle d'emphysème causés par l'élastase sont centrés autour de deux problèmes liés entre eux : *i*) bien que l'élastase et la fumée de cigarette induisent un emphysème secondaire à une attaque protéolytique de la matrice pulmonaire, les mécanismes sous-jacents ce processus sont probablement très différents dans les deux modèles, et *ii*) les mécanismes conduisant à un emphysème induit par l'élastase n'ont pas été clairement établis ou ne sont pas tout à fait clairs. En effet, des études de microscopie optique et électronique [27, 28, 33, 76] montrent une dégradation rapide de l'élastine après l'instillation de l'élastase, mais la maladie progresse (en fonction de l'espèce animale et de la dose) bien après que l'activité élastasique ait disparu.

En effet, la mesure de la demi-vie de la ENH ou EPP dans le modèle est d'environ 45 - 50 min [64]. Il a donc été suggéré que la progression de la maladie est provoquée par l'enzyme, liée à la matrice et non détectable par des tests classiques. Cependant, l'injection tardive (20<sup>ème</sup> jour après administration) d'un inhibiteur de l'élastase n'est pas capable d'empêcher la progression de l'emphysème [44], suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués dans le développement de l'emphysème après l'instillation d'élastase. Toutefois, une dose unique d'inhibiteurs de l'élastase semble atténuer ou prévenir l'emphysème lorsqu'elle est administrée immédiatement avant ou après l'administration de l'enzyme, mais ces mêmes inhibiteurs ne sont pas efficaces s'ils sont administrés 4 ou 8 heures après instillation de l'élastase [18, 31, 65].

Cependant, une étude du groupe de Williams et al. a montré que deux inhibiteurs synthétiques d'élastases (ICI 200800 et 200855 [69]) sont capables de bloquer le développement de l'emphysème induit par la ENH et la EPP, lorsqu'ils ont été administrés 24h après l'instillation d'élastase et cet effet est maintenu si cette administration est quotidienne. De nouveaux inhibiteurs de l'élastase ont également conféré un certain degré de protection lorsqu'ils étaient administrés par instillation de l'enzyme [5, 34, 45].

En fait, le modèle est certainement plus compliqué que la seule dégradation de l'élastase. L'emphysème induit par l'élastase est subtilement différent de l'emphysème humain, avec prédominance de l'élargissement alvéolaire pour l'emphysème induit par l'élastase et la destruction alvéolaire pour l'homme [11] et dans une certaine mesure dans le modèle murin d'exposition à la fumée de cigarette [49]. Chez l'animal, peu de temps après l'administration de l'enzyme, se produit une hémorragie et un exsudat inflammatoire dans les voies aériennes inférieures qui comprend des neutrophiles et des

macrophages, et une augmentation d'une variété de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 [15]. Il a été également démontré qu'il existe une augmentation du nombre de cellules parenchymateuses apoptotiques [61, 75], mais ces études ne se sont basées que sur la technique TUNEL (méthode permettant de détecter les cellules apoptotiques par marquage fluorescent de l'ADN clivé par les nucléases) et par conséquent ne sont pas concluantes. Le processus inflammatoire joue un rôle important dans le modèle, car les souris délétées pour le TNF- $\alpha$  ou les récepteurs à l'IL-1 sont presque entièrement protégées contre l'emphysème induit par la EPP [43]. Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris ayant été injectées avec un adénovirus contenant un plasmide codant pour la protéine anti-inflammatoire HO-1 [62] ou surexprimant l'enzyme anti-oxydante CuZnSOD [13]. L'elgin-C, qui inhibe l'élastase chez le rat mais pas l'EPP, possède un effet protecteur dans le modèle, suggérant un rôle de l'élastase endogène [35].

Un point pratique important du modèle est l'âge des animaux, avec des résultats contradictoires, qui montrent soit une diminution ou une aggravation de l'emphysème induit par la EPP selon l'âge [17, 30].

### Conclusions sur le modèle d'emphysème induit par l'élastase

Dans l'ensemble, bien que ses résultats indiquent que l'emphysème induit par l'élastase soit simple à réaliser, le modèle n'est pas mécaniquement simple. Au mieux, l'emphysème causé par l'élastase est une technique de dépistage des mécanismes qui pourraient s'appliquer aux sujets fumeurs, mais cette approche reste éloignée de l'exposition humaine à la fumée de cigarette. Le modèle semble inférieur au modèle d'exposition à la fumée de cigarette.

### ANIMAUX MODIFIES GENETIQUEMENT COMME MODELES DE BPCO

Une partie importante de la littérature récente sur la physiopathologie de la BPCO repose sur des modèles basés sur l'utilisation d'animaux modifiés génétiquement, ou sur/ sous-exprimant naturellement certains gènes. Différents articles de synthèse ont été publiés dans ce domaine [4, 47, 72, 70]. Nous exposerons ici quelques avantages et inconvénients de ces modèles.

Différentes souches de souris répondent différemment à la fumée de cigarette, en fonction des niveaux d'antioxydants et antiprotéases endogènes et en fonction de facteurs génétiques contrôlant la réponse immunitaire innée et acquise [6, 46].

Il est à noter que les souches de souris présentent plusieurs différences génétiques et il est difficile d'attribuer une réponse différente à la fumée de cigarette à une seule différence génétique (il existe des exceptions à cette règle, comme par exemple la souris « pallid lice », déficiente seulement en  $\alpha$ 1-antitrypsine) [6, 67].

Des animaux modifiés génétiquement présentent l'avantage de permettre la recherche ou l'investigation de l'effet d'un seul gène dans les différentes altérations constituant la BPCO. Cependant, la plus grande partie des études utilisant ces animaux ont évalué le développement de l'emphysème et ne se sont pas intéressées aux autres altérations constituant la BPCO [32]. Ces modèles doivent être interprétés avec précaution car la surexpression ou sous-expression constitutive d'un gène et de la protéine résultante peut interférer avec le développement pulmonaire et aboutir à des anomalies de la structure pulmonaire similaires à celles observées dans l'emphysème.

Différentes approches ont été proposées pour contourner ce problème. Certains modèles transgéniques constitutifs d'emphysème font appel à des souches de souris dans lesquelles le transgène s'exprime à un très faible niveau, avec apparition de l'emphysème, seulement à l'âge adulte (14). Ces modèles donnent des informations sur le rôle du gène en question dans le développement de l'emphysème, mais par définition il est difficile d'exclure des anomalies subtiles du développement pulmonaire.

Une approche plus sélective pour obtenir une sur ou sous-expression d'un gène dans le poumon à l'âge adulte consiste à utiliser une construction sensible à la doxycycline (molécule appartenant à la famille des tétracyclines). Dans ce cas, l'administration de doxycycline chez la souris aboutit à la sur ou sous-expression du gène dans le poumon. Bien qu'en théorie cette technique permet de s'affranchir du rôle du gène en étude dans le développement pulmonaire, il peut exister une « fuite » de l'expression du transgène même en l'absence de doxycycline. De plus, certains auteurs ont décrit que le transactivateur dépendant de la tétracycline utilisée pour générer les modèles de surexpression inductible peut créer un emphysème *per se* [63]. Finalement, la doxycycline peut inhiber certaines métalloprotéinases matricielles (MMPs) comme MMP-2 et MMP-9, qui jouent un rôle dans la physiopathologie de la BPCO [19]. Cet ensemble d'éléments incite à la plus grande prudence lors de l'utilisation de modèles transgéniques inductibles, avec nécessité d'utiliser tous les contrôles nécessaires. Il faut aussi signaler que ces modèles de surexpression génique peuvent aboutir à

des niveaux d'expression très élevés de la protéine étudiée, qui peuvent conduire à des effets différents de ceux observés dans un contexte physiologique. En conclusion, les résultats obtenus en utilisant des souris modifiées génétiquement doivent être interprétés avec prudence dès lors qu'on s'intéresse à la physiopathologie de la BPCO humaine.

## CONCLUSIONS

Différents modèles animaux ont été et sont utilisés

## CONFLIT D'INTERÊT

Aucun.

## REFERENCES

1. P Bernfeld, F Homburger, E Soto, and KJ Pai. Cigarette smoke inhalation studies in inbred Syrian golden hamsters. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63: 675-689.
2. KR Bracke, I D'Hulst A, T Maes, IK Demedts, KB Moerloose, WA Kuziel, GF Joos, and GG Brusselle. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation, but not airway remodelling, is attenuated in chemokine receptor 5-deficient mice. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1467-1479.
3. KR Bracke, I D'Hulst A, T Maes, KB Moerloose, IK Demedts, S Lebecque, GF Joos, and GG Brusselle. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol* 2006; 177: 4350-4359.
4. GG Brusselle, KR Bracke, T Maes, I D'Hulst A, KB Moerloose, GF Joos, and RA Pauwels. Murine models of COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2006; 19: 155-165.
5. JO Cantor, B Shteyngart, JM Cerreta, M Liu, G Armand, and GM Turino. The effect of hyaluronan on elastic fiber injury in vitro and elastase-induced airspace enlargement in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225: 65-71.
6. E Cavarra, B Bartalesi, M Lucattelli, S fineschi, B Lunghi, F Gambelli, L Ortiz, P Martorana, and G Lungarella. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 886-890.
7. JC Chen, M Brenner, FE Kafie, B Yoong, M Budd, A Gassel, TA Waite, J Millikan, J Huh, NS Wang, R McKenna, A Gelb, AF Wilson, and MW Berns. An animal model for lung volume reduction therapy of pulmonary emphysema. *J Invest Surg* 1998; 11: 129-137.
8. A Churg, H Tai, T Coulthard, R Wang, and JL Wright. Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1327-1334.
9. A Churg, R Wang, X Wang, PO Onnervik, K Thim, and JL Wright. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax* 2007; 62: 706-713.
10. MG Cosio, RJ Shiner, M Saetta, NS Wang, M King, H Ghezzi, and E Angus. Alveolar fenestrae in smokers. Relationship with light microscopic and functional abnormalities. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 126-131.
11. DH Eidelman, S Bellofiore, D Chiche, MG Cosio, and JG Martin. Behavior of morphometric indices in pancreatic elastase-induced emphysema in rats. *Lung* 1990; 168: 159-169.
12. L Fabbri, RA Pauwels, and SS Hurd. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary updated 2003. *COPD* 2004; 1: 105-141; discussion 103-104.
13. RF Foronjy, O Mirochnitchenko, O Propokenko, V Lemaitre, Y Jia, M Inouye, Y Okada, and JM D'Armiento. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 623-631.
14. RF Foronjy, Y Okada, R Cole, and J D'Armiento. Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L727-737.
15. K Gamze, HM Mehmet, F Deveci, T Turgut, F Ilhan, and I Ozercan. Effect of bosentan on the production of proinflammatory cytokines in a rat model of emphysema. *Exp Mol Med* 2007; 39: 614-620.
16. WQ Gan, SF Man, DS Postma, P Camp, and DD Sin. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res* 2006; 7: 52.
17. RH Goldstein. Response of the aging hamster lung to elastase injury. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 295-298.
18. SR Gudapaty, IE Liener, JR Hoidal, RV Padmanabhan, DE Niewoehner, and J Abel. The prevention of elastase-induced emphysema in hamsters by the intratracheal administration of a synthetic elastase inhibitor bound to albumin microspheres. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 159-163.

19. TL Haas, JL Doyle, MR Distasi, LE Norton, KM Sheridan, and JL Unthank. Involvement of MMPs in the outward remodeling of collateral mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2429-2437.
20. P Harber, DP Tashkin, M Simmons, L Crawford, E Hnizdo, and J Connett. Effect of occupational exposures on decline of lung function in early chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 994-1000.
21. M Hayashi, GC Sornberger, and GL Huber. Differential response in the male and female tracheal epithelium following exposure to tobacco smoke. *Chest* 1978; 73: 515-518.
22. JC Hogg, F Chu, S Utokaparch, R Woods, WM Elliott, L Buzatu, RM Cherniack, RM Rogers, FC Sciruba, HO Coxson, and PD Pare. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653.
23. AM Houghton, PA Quintero, DL Perkins, DK Kobayashi, DG Kelley, LA Marconcini, RP Mecham, RM Senior, and SD Shapiro. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 2006; 116: 753-759.
24. T Ishikawa, K Aoshiba, N Yokohori, and A Nagai. Macrophage colony-stimulating factor aggravates rather than regenerates emphysematous lungs in mice. *Respiration* 2006; 73: 538-545.
25. K Ishizawa, H Kubo, M Yamada, S Kobayashi, M Numasaki, S Ueda, T Suzuki, and H Sasaki. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett* 2004; 556: 249-52.
26. S Ito, EP Ingenito, KK Brewer, LD Black, H Parameswaran, KR Lutchen, and B Suki. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol* 2005; 98: 503-511.
27. A Janoff, B Sloan, G Weinbaum, V Damiano, R Sandhaus, J Elias, and P Kimbel. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 461-478.
28. A Janoff, R White, H Carp, S Harel, R Dearing, and D Lee. Lung injury induced by leukocytic proteases. *Am J Pathol* 1979; 97: 111-136.
29. PD Kaplan, C Kuhn, and JA Pierce. The induction of emphysema with elastase. I. The evolution of the lesion and the influence of serum. *J Lab Clin Med* 1973; 82: 349-56.
30. JB Karlinsky, RH Goldstein, A Catanese, and GL Snider. Young hamsters are more resistant than adults to endotracheally instilled porcine pancreatic elastase. *Exp Lung Res* 1986; 11: 229-243.
31. J Kleinerman, V Ranga, D Rynbrandt, J Sorensen, and JC Powers. The effect of the specific elastase inhibitor, alanyl alanyl prolyl alanine chloromethylketone, on elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121: 381-387.
32. C Kuhn, R Homer, Z Zhu, N Ward, R Flavell, G Geba, and J Elias. Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 289-295.
33. C Kuhn, SY Yu, M Chraplyvy, HE Linder, and RM Senior. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976; 34: 372-380.
34. C Lafuma, E Frisdal, A Harf, L Robert, and W Hornebeck. Prevention of leucocyte elastase-induced emphysema in mice by heparin fragments. *Eur Respir J* 1991; 4: 1004-1009.
35. YL Lai and L Diamond. Inhibition of porcine pancreatic elastase-induced emphysema by eglin-c. *Exp Lung Res* 1990; 16: 547-557.
36. D Lamb and L Reid. Goblet cell increase in rat bronchial epithelium after exposure to cigarette and cigar tobacco smoke. *Br Med J* 1969; 1: 33-35.
37. A Langhammer, R Johnsen, A Gulsvik, TL Holmen, and L Bjermer. Sex differences in lung vulnerability to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2003; 21: 1017-1023.
38. GD Leikauf, MT Borchers, DR Prows, and LG Simpson. Mucin apoprotein expression in COPD. *Chest* 2002; 121: 166S-182S.
39. M Lesser, ML Padilla, and C Cardozo. Induction of emphysema in hamsters by intratracheal instillation of cathepsin B. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 661-668.
40. J Lieberman. Elastase, collagenase, emphysema, and alpha1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1976; 70: 62-67.
41. EC Lucey, RH Goldstein, R Breuer, BN Rexer, DE Ong, and GL Snider. Retinoic acid does not affect alveolar septation in adult FVB mice with elastase-induced emphysema. *Respiration* 2003; 70: 200-205.
42. EC Lucey, RH Goldstein, PJ Stone, and GL Snider. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 555-564.
43. EC Lucey, J Keane, PP Kuang, GL Snider, and RH Goldstein. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. *Lab Invest* 2002; 82: 79-85.
44. EC Lucey and PJ Stone. Effect of chloromethyl ketone on the progression of elastase-induced emphysema in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 174-175.
45. G Lungarella, C Gardi, L Fonzi, L Comparini, NN Share, M Zimmerman, and PA Martorana. Effect of the novel synthetic protease inhibitor furoyl saccharin on elastase-induced emphysema in rabbits and hamsters. *Exp Lung Res* 1986; 11: 35-47.
46. T Maeno, AM Houghton, PA Quintero, S Grumelli, CA Owen, and SD Shapiro. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol* 2007; 178: 8090-6.
47. R Mahadeva and SD Shapiro. Chronic obstructive pulmonary disease \* 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002; 57: 908-914.
48. DM Mannino and AS Buist. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765-773.
49. TH March, JA Wilder, DC Esparza, PY Cossey, LF Blair, LK Herrera, JD McDonald, MJ Campen, JL Mauderly, and J Seagrave. Modulators of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in A/J mice. *Toxicol Sci* 2006; 92: 545-59.

50. FJ Martinez, JL Curtis, F Sciruba, J Mumford, ND Giardino, G Weinmann, E Kazerooni, S Murray, GJ Criner, DD Sin, J Hogg, AL Ries, M Han, AP Fishman, B Make, EA Hoffman, Z Mohsenifar, and R Wise. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 243-252.
51. PA Martorana and NN Share. Effect of human alpha-antitrypsin in papain-induced emphysema in the hamster. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 607-612.
52. MG Min, DJ Song, M Miller, JY Cho, S McElwain, P Ferguson, and DH Broide. Coexposure to environmental tobacco smoke increases levels of allergen-induced airway remodeling in mice. *J Immunol* 2007; 178: 5321-5328.
53. JB Mullen, JL Wright, BR Wiggs, PD Pare, and JC Hogg. Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function. *Thorax* 1987; 42: 843-848.
54. A Nagai, H Inano, K Matsuba, and WM Thurlbeck. Scanning electronmicroscopic morphometry of emphysema in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1411-1415.
55. Y Nishi, V Boswell, T Ansari, F Piprawala, S Satchi, and CP Page. Elastase-induced changes in lung function: relationship to morphometry and effect of drugs. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16: 221-229.
56. PD Pare, BR Wiggs, A James, JC Hogg, and C Bosken. The comparative mechanics and morphology of airways in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1189-1193.
57. SS Park, Y Kikkawa, IP Goldring, MM Daly, M Zelefsky, C Shim, M Spierer, and T Morita. An animal model of cigarette smoking in beagle dogs: correlative evaluation of effects on pulmonary function, defense, and morphology. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 971-979.
58. R Pauwels and K Rabe. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 2004; 364: 613-620.
59. KF Rabe, S Hurd, A Anzueto, PJ Barnes, SA Buist, P Calverley, Y Fukuchi, C Jenkins, R Rodriguez-Roisin, C van Weel, and J Zielinski. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.
60. DF Rogers and PK Jeffery. Inhibition by oral N-acetylcysteine of cigarette smoke-induced "bronchitis" in the rat. *Exp Lung Res* 1986; 10: 267-283.
61. M Sawada, Y Ohno, BL La, N Funaguchi, T Asai, H Yuhgetsu, G Takemura, S Minatoguchi, H Fujiwara, and T Fujiwara. The Fas/Fas-ligand pathway does not mediate the apoptosis in elastase-induced emphysema in mice. *Exp Lung Res* 2007; 33: 277-288.
62. T Shinohara, T Kaneko, Y Nagashima, A Ueda, A Tagawa, and Y Ishigatsubo. Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lungs attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 318-327.
63. TH Sisson, JM Hansen, M Shah, KE Hanson, M Du, T Ling, RH Simon, and PJ Christensen. Expression of the reverse tetracycline-transactivator gene causes emphysema-like changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 552-560.
64. PJ Stone, EC Lucey, JD Calore, MP McMahon, GL Snider, and C Franzblau. Defenses of the hamster lung against human neutrophil and porcine pancreatic elastase. *Respiration* 1988; 54: 1-15
65. PJ Stone, EC Lucey, JD Calore, GL Snider, C Franzblau, MJ Castillo, and JC Powers. The moderation of elastase-induced emphysema in the hamster by intratracheal pretreatment or post-treatment with succinyl alanyl alanyl prolyl valine chloromethyl ketone. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 56-59
66. M Takamoto, N Miyazaki, T Ishibashi, and K Sugiyama. Protease-induced experimental emphysema: the relationship between elastolytic activity and emphysema induction. *Jpn J Exp Med* 1978; 48: 419-425
67. Y Takubo, A Guerassimov, H Ghezzeo, A Triantafilopoulos, J Bates, J Hoidal, and MG Cosio.  $\alpha_1$ -antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice. Parallels with human disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1596-1603
68. BW van der Strate, DS Postma, CA Brandsma, BN Melgert, MA Luinge, M Geerlings, MN Hylkema, A van den Berg, W Timens, and HA Kerstjens. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 751-758
69. JC Williams, RC Falcone, C Knee, RL Stein, AM Strimpler, B Reaves, RE Giles, and RD Krell. Biologic characterization of ICI 200,880 and ICI 200,355, novel inhibitors of human neutrophil elastase. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 875-883
70. J Wright and A Churg. Animal models of cigarette smoke-induced COPD. *Chest* 2002; 122: 301S-306S
71. JL Wright. The importance of ultramicroscopic emphysema in cigarette smoke-induced lung disease. *Lung* 2001; 179: 71-81
72. JL Wright, M Cosio, and A Churg. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L1-15
73. JL Wright, T Ngai, and A Churg. Effect of long-term exposure to cigarette smoke on the small airways of the guinea pig. *Exp Lung Res* 1992; 18: 105-114
74. JL Wright, DS Postma, HA Kerstjens, W Timens, P Whittaker, and A Churg. Airway remodeling in the smoke exposed guinea pig model. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 915-923
75. H Yuhgetsu, Y Ohno, N Funaguchi, T Asai, M Sawada, G Takemura, S Minatoguchi, H Fujiwara, and T Fujiwara. Beneficial effects of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation against elastase-induced emphysema in rabbits. *Exp Lung Res* 2006; 32: 413-426
76. A Zapletal, J Houstek, M Samanek, V Vavrova, and J Srajer. Lung function abnormalities in cystic fibrosis and changes during growth. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1979; 15: 575-592